



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS



ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE
GLUCOCORTICOIDES Y SU ASOCIACIÓN CON EL
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS EN
HÍGADO DE RATAS NEONATAS EXPUESTAS A
CADMIO DURANTE LA GESTACIÓN.**

MARCIA LÍA DURÁN BRITO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.

Departamento Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: DRA. ANA MARIA RONCO.

Proyecto Fondecyt N° 1071110

SANTIAGO, CHILE

2011



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES Y
SU ASOCIACIÓN CON EL METABOLISMO DE
CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS EN HÍGADO DE RATAS
NEONATAS EXPUESTAS A CADMIO DURANTE LA
GESTACIÓN.**

MARCIA LÍA DURÁN BRITO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA : ANA MARÍA RONCO M .

PROFESOR CONSEJERO: MARÍA SOL MORALES S.

PROFESOR CONSEJERO: HECTOR ADARMES A

SANTIAGO, CHILE

2011

En especial a mis padres, quienes siempre me han apoyado en cada decisión que he
tomado.

Mi papi, un hombre implacable, luchador y fuerte, el hombre con la sonrisa más dura
del oeste, el cual ha salido adelante de numerosas adversidades, quien ha sobrevivido
múltiples enfermedades sólo para seguir con nosotros.

Mi pachita loca, mi mamá hermosa, una mujer fuerte y luchadora, capaz de enfrentar
todo lo que le ha tocado y seguir adelante, con su sonrisa y sus bailes locos, siempre
cuidándonos de este mundo como una loba. Pachita, estoy segura que despertarás
para disfrutar de este momento conmigo, así como siempre lo has hecho.

LOS AMO POR SIEMPRE.

Índice

	Página
Resumen y Abstract	3
Introducción	6
Revisión bibliográfica	
Metabolismo y efectos adversos de Cadmio	7
- Glucocorticoides; funciones y mecanismos de acción	10
- Acción de Glucocorticoides en dos genes blanco: Fosfoenol piruvato carboxiquinasa y Acetil Co-A oxidasa	12
- Mecanismo de control fetal a una sobreexposición temprana a glucocorticoides	13
- Programación fetal	14
Hipótesis y objetivos	16
Materiales y Métodos	17
- Modelo de estudio y tratamiento	17
- Determinación de la abundancia del receptor de glucocorticoides en tejido hepático por Western Blot	20
- Determinación cuantitativa de la expresión de los genes de receptor de glucocorticoides, fosfoenol piruvato carboxiquinasa y acetil Co-A	

oxidasa por Real Time PCR (qRT-PCR)	21
- Determinación de triacilglicerol y colesterol en tejido hepático	23
- Determinación de la concentración de glicógeno hepático	23
- Análisis estadístico	24
Resultados y Discusión	25
- Abundancia de la proteína del receptor de glucocorticoides en tejido hepático	25
- Expresión de mRNA de los genes de receptor de glucocorticoides, Fosfoenol piruvato carboxiquinasa y acetil Co-A oxidasa	27
- Concentración de triacilglicéridos en tejido hepático	32
- Concentración de colesterol en tejido hepático	33
- Concentración de glicógeno en tejido hepático	34
Conclusiones	37
Bibliografía	38
Anexo: Carta comité Bioética animal INTA	48

Resumen

El Cadmio (Cd^{2+}) es un contaminante ampliamente distribuido en el ambiente; la exposición de la población ocurre principalmente a través del humo de tabaco. Se han descrito efectos adversos en la salud, algunos de los cuales son dependientes del sexo. Específicamente, en crías expuestas durante la gestación, disminuye el peso de nacimiento (PN) lo que se asocia a una exposición fetal aumentada a glucocorticoides (GC).

Los GC actúan a través de sus receptores específicos (GR) localizados en los tejidos blancos; en el hígado, la unión GC-GR activa la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos (CH) y lípidos. Entre éstos se encuentra el gen de la enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK, limitante en el proceso de gluconeogénesis) y el de la enzima acetil Co-A oxidasa (AOX, limitante en el proceso de β -oxidación peroxisomal).

En este estudio, se postuló que el Cd^{2+} administrado durante la gestación induce en las crías neonatas una alteración en la expresión hepática del GR y consecuentemente, de sus genes blancos, PEPCK y AOX, con una concomitante alteración en los niveles hepáticos de glicógeno, triacilglicerol (TAG) y colesterol, de manera diferenciada en machos y hembras.

El modelo de estudio utilizado fue ratas de la cepa *Wistar* tratadas con 10 ppm de Cd^{2+} (como CdCl_2 en el agua de bebida) desde el destete hasta el cruzamiento, y luego con 50 ppm de Cd^{2+} durante toda la gestación. Posteriormente, en el hígado de las crías neonatas se determinó la expresión de GR (proteína, mediante Western Blot y mRNA por qRT-PCR), PEPCK (mRNA) y AOX (mRNA). También se analizó el contenido de glicógeno, TAG y colesterol.

Los resultados indican que GR hepático aumenta su expresión en hembras y en machos disminuye. También hay efectos diferenciados en los niveles de mRNA para PEPCK, y AOX.

Se concluye que la exposición a Cd^{2+} durante el desarrollo induce alteraciones tempranas en el patrón de expresión de genes relacionados con el sistema GC y metabolismo

de CH y lípidos. Los efectos son dependientes del sexo y pueden inducir una reprogramación fetal a largo plazo explicando el desarrollo de ciertas patologías.

Abstract

Cadmium (Cd^{2+}) is a widely distributed pollutant in the environment, although the exposure to the population is mainly through the tobacco smoke. Adverse toxic health effects have been described in the human population; which some of them are sex-dependent. Specifically, in offspring exposed throughout the pregnancy period, the birth weight is lower compared to non-exposed offspring, which is associated to an increased fetal exposure to glucocorticoids (GC).

GC acts through specific receptors (GR) located in the target tissues; in the liver, the GC-GR binding activates the expression of genes involved in the carbohydrate (CH) and lipid metabolism. Some of these target genes are: the phosphoenolpyruvate carboxykinase enzyme (PEPCK, a limiting step in the gluconeogenesis pathway) and acyl Co-A oxidase enzyme (AOX, a limiting step in the peroxisomal β -oxidation pathway).

In this study, we postulate that a Cd^{2+} administered during gestation induces an alteration in the hepatic expression of GR and consequently, of their target genes: PEPCK and AOX concomitantly to modify hepatic levels of glycogen, triacylglycerol (TAG) and cholesterol. These responses may be differentially expressed in males and females.

The animal model to test the hypothesis was the *Wistar* rat. After weaning, females were treated with Cd^{2+} (10 ppm, as CdCl_2 in the drinking water) until mating. After pregnancy detection, Cd^{2+} doses were increased to 50 ppm and continued throughout all the pregnancy period (21 days). At delivery, offspring livers were collected and frozen until determinations of GR expression (protein, by Western Blot and mRNA by qRT-PCR), PEPCK (mRNA), AOX (mRNA). Also, the amounts of glycogen, TAG and cholesterol were analyzed.

Results indicate that GR expression (mRNA and protein) was higher in female, and lower in males, compared to their respective controls. Also, levels of PEPCK and AOX mRNA were differentially expressed.

It is concluded that prenatal exposure to 50 ppm of Cd²⁺ induces early alterations in the expression pathway of genes related with the GC system, affecting also the CH and lipid metabolism. The effects are sex-dependent and may induce a long time fetal programming, which may explain the development of some diseases.

Introducción

El cadmio (Cd^{2+}) es un metal pesado ampliamente distribuido en el medio ambiente y al cual se le han comprobado numerosos efectos adversos en la salud. Existen dos vías de exposición a este metal: una es la oral, a través de la ingestión de alimentos contaminados y la otra es por la inhalación (fundamentalmente por el humo del cigarro).

Se han realizado estudios en los cuales se ha demostrado que las personas fumadoras tienen una exposición más alta a este metal, y por lo tanto, un mayor riesgo; y además, que existe una diferencia entre sexos, observándose que las mujeres poseen una mayor concentración de este metal que los hombres.

Al exponer ratas gestantes a altas dosis de Cd^{2+} , se observó efectos adversos en sus crías, dentro de los cuales podemos mencionar un menor peso de nacimiento (PN) y una mayor exposición de las crías a glucocorticoides (GC).

El aumento en la exposición a GC podría inducir alteraciones importantes en el metabolismo de hidratos de carbono (CH) y lípidos a nivel hepático de las crías. La respuesta metabólica a un exceso de GC está mediada por el receptor de glucocorticoide (GR) en el tejido hepático, quien al activarse por la unión de la hormona induciría cambios en la expresión de sus genes blanco comprometidos en el metabolismo hepático de CH y lípidos.

El objetivo de esta memoria de título fue estudiar el efecto de la exposición prenatal a Cd^{2+} en la expresión del GR hepático de ratas neonatas y su asociación con el metabolismo de CH y lípidos, específicamente en la expresión de dos importantes enzimas: fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK), que participa en la gluconeogénesis y acetil Co-A oxidasa (AOX), que ejerce un rol fundamental en la β -oxidación peroxisomal. Además, de evaluar cómo se ven afectadas las concentraciones de triacilglicerol (TAG), colesterol y glicógeno en tejido hepático. Debido a que algunos efectos pueden ser diferentes de acuerdo al sexo del animal, estos efectos se estudiaron por separado.

Revisión bibliográfica

Generalidades

El Cd^{2+} es un elemento que se encuentra en forma natural en la corteza terrestre; cuando está en estado puro es un metal suave y de color blanco plateado, pero por lo general se encuentra como un mineral combinado con otros elementos como el oxígeno (óxido de Cd^{2+}), el cloro (cloruro de Cd^{2+}) o el sulfuro (sulfato o sulfuro de Cd^{2+}) (ATSDR, 2008). Es un metal pesado muy tóxico, dañino para el medio ambiente y para los seres humanos, debido a que posee una prolongada persistencia en el cuerpo humano. Es tóxico como un contaminante industrial, asociado a la producción de zinc (Bernard, 2008) y como contaminante de los alimentos, y es uno de los mayores componentes del humo del tabaco (Morselt, 1991).

Los seres humanos tienen dos vías de exposición a Cd^{2+} : una es oral, a través de ingestión de agua y alimentos que contengan el metal (alrededor de 10%) y la otra por inhalación, principalmente a través del humo de tabaco (ATSDR, 2008; Fowler, 2009).

Metabolismo y efectos adversos de Cadmio

Una vez absorbido, el Cd^{2+} se acumula en los organismos por largos períodos, debido a su vida media de entre 15 a 30 años; y en animales, en órganos vitales como riñones, hígado y pulmón, causando daños irreversibles (Henson y Anderson, 2000; Bernard, 2008). Se excreta principalmente a través de la orina (Bhattacharyya *et al.*, 2000).

Es altamente tóxico en el riñón, especialmente en las células tubulares que son su principal sitio de acumulación, por lo que también puede causar, a través de un daño indirecto, desmineralización de los huesos. En el pulmón, puede alterar sus funciones, aumentando los riesgos de aparición de cáncer (Bernard, 2008). En el sistema vascular, provoca daños morfológicos e hipertensión (Fowler, 2009). Todos estos efectos han sido descritos en animales de laboratorio y en poblaciones expuestas a concentraciones relativamente altas de Cd^{2+} (Bernard, 2008).

Alvarez *et al.*, (2007), observaron que Cd^{2+} provoca una alteración en la síntesis de lípidos. Dado que los lípidos son el principal componente de las membranas celulares, estas

alteraciones pueden modificar la permeabilidad de la célula y generar la entrada de elementos adversos a la célula.

La exposición a Cd^{2+} está asociada con la inducción de ciertos tipos de cánceres en animales y humanos (Fowler, 2009) por lo que está catalogado por la Agencia Internacional del Cáncer (IARC) como agente cancerígeno.

Lall y Dan (1999) demostraron que el Cd^{2+} induce una estimulación de la secreción de GC en numerosas especies, específicamente, su activación es en el eje pituitaria-adrenal, lo que genera un aumento en las concentraciones de GC plasmáticos (Hidalgo y Armario, 1987), es decir, posee efectos como “*disruptor-endocrino*”, afectando principalmente el sistema endocrino-reproductivo y los efectos son mayores si la exposición ocurre en etapas tempranas del desarrollo (Henson y Chedrese, 2004). Debido a que el humo del tabaco es una importante fuente de contaminación de Cd^{2+} , los órganos reproductivos de los fumadores pueden estar más expuestos a niveles tóxicos de Cd^{2+} y se pueden producir alteraciones reproductivas. Se ha demostrado que los niveles de progesterona son menores en placentas de madres fumadoras comparadas con las no-fumadoras (Piasek *et al.*, 2001).

Se ha descrito que los efectos de Cd^{2+} son dependientes del género: en general, las mujeres acumulan mayores concentraciones de Cd^{2+} en su organismo (Oskarsson *et al.*, 2004) y en consecuencia, poseen un riesgo mayor de efectos adversos para la salud; y se ha observado que, dentro de su acción como “*disruptor-endocrino*” posee efectos estrogénicos, afectando las crías hembras de madres gestantes expuestas (Vahter *et al.*, 2007). Estas diferencias de género se han explicado en estudios en los cuales se observó que existe una relación inversa, donde al existir una menor concentración orgánica de hierro la absorción intestinal de Cd^{2+} es mayor, lo que es común en mujeres en edad reproductiva y, específicamente durante el embarazo (Kippler *et al.*, 2009). Además se ha postulado que existen diferencias en la cinética, modo de acción y susceptibilidad al Cd^{2+} entre hembras y machos (Niedhammer *et al.*, 2000). Se observó, que el Cd^{2+} induce una disminución en la tasa de filtración glomerular en mujeres expuestas a niveles más bajos que aquellos que afectan a los hombres (Akesson *et al.*, 2005).

Estudios anteriores (Liu *et al.*, 2001), han demostrado que los efectos de la exposición prenatal a GC dependen del momento de exposición en el cual se ve afectada la cría y además de su sexo, siendo las hembras más resistentes que los machos. Clifton y Murphy

(2004), postularon que placentas de fetos humanos de crías hembra poseen una mayor inactivación de GC y una menor cantidad de GR que los machos.

En estudios realizados por Nordberg *et al.*, (2007), se observó que el Cd^{2+} no atraviesa fácilmente la placenta ni la barrera hematoencefálica, lo que explicaría la baja toxicidad que provoca en los fetos y sistema nervioso central (SNC), comparado con otros metales pesados.

Sin embargo, se han observado efectos deletéreos de una exposición prenatal a este metal, asociados principalmente a sus efectos como “*disruptor-endocrino*”. Dentro de los efectos prenatales, se encuentra la disminución del PN de la cría expuesta y nacimientos prematuros. Estudios epidemiológicos en humanos, mostraron una relación inversa entre niveles de Cd^{2+} placentario y el PN (Ronco *et al.*, 2009). Además el bajo PN está asociado al riesgo de desarrollar ciertas patologías crónicas en la adultez, como diabetes, hipertensión y enfermedad coronaria. Este concepto, al cual se le conoce como “reprogramación fetal” implica que un estímulo adverso durante la gestación induce en la cría mecanismos que programan la regulación de la expresión de genes, lo que les permite crecer y desarrollarse hasta el nacimiento. Sin embargo, en la edad adulta, al no existir ese estímulo, y al mantenerse la programación, se pueden originar ciertas patologías. Es así como, el sobrepeso/obesidad/ enfermedad coronaria podrían ser programables en la vida temprana, ya que factores ambientales adversos durante este período causan una alteración en el crecimiento y desarrollo normal, generándose un fenotipo adulto más susceptible de desarrollar estas patologías crónicas (Barker y Osmond, 1986).

Estudios anteriores demostraron que ratas preñadas tratadas con Cd^{2+} durante toda la gestación tienen crías de menor PN (Ronco *et al.*, 2009); además, cuando la exposición prenatal fue de 50 ppm de Cd^{2+} se indujo un incremento materno en las concentraciones de GC, el que también se observó en las crías (Cottrell y Seckl, 2009; Seckl y Holmes, 2007). Asimismo, esta sobreexposición a GC puede programar la fisiología de las crías incrementando la posibilidad de presentar desórdenes en las funciones cardiovasculares, homeostasis de la glucosa, actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y conductas de ansiedad durante la vida adulta (Cottrell y Seckl, 2009).

La exposición fetal a GC está controlado en parte por la presencia de la enzima 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11β -HSD2) en la placenta, donde se encuentra

presente en grandes concentraciones y es la responsable de inactivar los GC activos, regulando la exposición fetal a estas hormonas (Seckl y Holmes, 2007).

Por otra parte, el Cd^{2+} puede modificar la actividad de numerosas enzimas relacionadas con el metabolismo de los CH en mamíferos (Long, 1997), entre las cuales se ha observado que ejerce un efecto estimulador en la gluconeogénesis hepática (Chapatwala *et al.*, 1982), como también induce una alteración en la capacidad de las funciones celulares de GR hepático (Elez *et al.*, 2001) y provoca alteraciones en el metabolismo de lípidos, las que pueden modificar la permeabilidad celular (Alvarez *et al.*, 2007).

Glucocorticoides; funciones y mecanismo de acción.

Los GC son hormonas esteroidales producidas mayoritariamente por las glándulas adrenales y son mediadores de la respuesta al estrés. Son segregadas en la zona fasciculada de la corteza suprarrenal, donde no existe un almacenamiento en cantidades importantes desde un punto de vista fisiológico, por lo que su biosíntesis a partir de colesterol equivale a su secreción. El cortisol más importante en el hombre es el GC y su secreción es regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa con participación del eje HPA. En los roedores, el GC más importante es la corticosterona (Velazco, 1992; Flores *et al.*, 2003).

La secreción de GC por la corteza adrenal está bajo un control neuroendocrino, mediante el eje HPA y es regulado mediante un sistema de “retroalimentación”. La activación de este eje comienza con la secreción hipotalámica del factor liberador de hormona corticotropina (CRH) el cual estimula a la pituitaria a que secrete la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la que finalmente ejerce un efecto en las glándulas adrenales que culmina con la síntesis de GC. Los GC son los reguladores de la actividad de este eje y ejercen su acción a través de uniones celulares específicas con su receptor (GR), y actúan a través de centros extra-hipotalámicos, hipotálamo y pituitaria, limitando una sobreexposición sistémica del organismo a GC y estableciendo así la “retroalimentación” regulatoria (Malkoski y Dorin, 1999; Cole *et al.*, 1995).

Los GC son regulados por la actividad de dos enzimas; 11β -HSD1 la cual se encarga de su activación y la 11β -HSD2, que es responsable de su inactivación. Ambas se encuentran en la mayoría de los tejidos, pero la segunda se encuentra principalmente en el tejido

placentario de humanos y roedores, regulando el transporte de GC al feto evitando una exposición temprana excesiva de GC activos (Beek *et al.*, 2004).

Los GC también actúan controlando la síntesis de proteínas. En los tejidos blanco interactúan con una proteína receptora situada en el citoplasma denominada GR al que se unen con elevada afinidad formando un complejo esteroide-receptor. En consecuencia, el complejo hormona-receptor se activa, translocándose al núcleo, donde se fija a la cromatina y regula la transcripción de genes específicos que codifican la síntesis de algunas enzimas (Hayne, 1991; Flores *et al.*, 2003).

La expresión del GR hepático puede ser determinada por los GC mediante una activación ligando-dependiente, ya que se ha observado que una disminución en los niveles de GC está asociado a una disminución en la actividad de GR (De Martino *et al.*, 2004). Como consecuencia, la disponibilidad de GC representa el primer punto crítico en la activación de GR (London y Castonguay, 2009). Los GC en su forma activa (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) juegan un rol fundamental en la mantención de los niveles de glucosa sanguínea durante el ayuno a través de su interacción con GR (De Martino *et al.*, 2004; Zhou y Cidlowski, 2005), mediante la estimulación de la enzima PEPCK, que potencia la producción de glucosa hepática a través de la gluconeogénesis (Valera *et al.*, 1994), ya que según estudios anteriores (Gumy *et al.*, 2008; Nyirenda *et al.*, 1998) GC y GR ejercen un efecto positivo en la síntesis de mRNA de esta enzima, elevando así los niveles plasmáticos de glucosas para abastecer los mayores requerimientos durante el estrés (Mommsen *et al.*, 1999), a través de una compleja unidad de respuesta a GC mediada por el GR (Hall *et al.*, 2000).

Los GR actúan como factores transcripcionales activados por el ligando (la hormona correspondiente) regulando, por diversos mecanismos, la transcripción génica y están presentes en todas las células nucleadas (Munck *et al.*, 1990).

Durante el desarrollo, el GR es expresado desde el inicio de la vida embrionaria en la mayoría de los tejidos. Es esencial para la sobrevivencia de las crías, como se pudo comprobar en estudios realizados en ratones, donde su fenotipo para GR fue anulado, los cuales no sobrevivieron luego del parto (Cole *et al.*, 1995).

Las principales funciones de los GC son mantener la glicemia y evitar la hipotensión arterial, así como modular la respuesta inmune e inflamatoria, y los mecanismos de

adaptación al estrés (Kemp, 2000). Son cruciales durante el desarrollo fetal para la maduración de los tejidos, y su acción más notable durante la gestación tardía es estimular la producción de surfactante pulmonar, que es una acción crítica para preparar al feto a la vida extrauterina. Por esta razón, para aumentar la viabilidad postnatal en partos prematuros se utilizan GC exógenos (Roberts y Dalziel, 2006), lo que a su vez aumenta el riesgo de producir efectos adversos en la vida adulta. Entre los efectos agudos y crónicos por un exceso de GC exógenos se encuentran: la inducción de hiperglicemia, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, hipertensión, disforia y supresión de procesos inmunológicos, inflamatorios y cognitivos (Munck y Naray-Fejes-Toth, 1994; McEwen, 2007).

Acción de glucocorticoides sobre genes blanco de la unión glucocorticoides-receptor de glucocorticoide: fosfoenol piruvato carboxiquinasa y acetil Co-A oxidasa

La enzima PEPCK participa en la primera etapa de la vía metabólica de la gluconeogénesis, es regulada y limitante, por lo tanto es irreversible y cataliza la conversión del intermediario oxalacetato, que a su vez proviene del precursor piruvato, en fosfoenolpirúvico (PEP) (Utter y Kolenbrander, 1972). Las reacciones posteriores de la vía conducen a la obtención de glucosa, por lo tanto, es una enzima que participa activamente en la mantención de los niveles sanguíneos de glucosa frente a estrés y ayunos prolongados.

La β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga se realiza en los peroxisomas. AOX es la primera enzima de la β -oxidación peroxisomal (Poulos *et al.*, 1989). Al modificar genéticamente ratas, haciéndolas deficientes en AOX, se observó esteatosis y una espontánea proliferación de peroxisomas en el hígado (Cole *et al.*, 1993).

Burgess *et al.*, (2007) han propuesto que PEPCK además de su participación en la gluconeogénesis, tiene un rol en la regulación de ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la generación de glicerol-3-fosfato, que sirve como columna para la síntesis de TAG, observando She *et al.*, (2000) que frente a una completa ausencia de PEPCK hepática, el hígado acumula TAG.

Mecanismo de control fetal a una sobreexposición temprana a glucocorticoide

Durante el desarrollo fetal, la enzima 11 β -HSD2 placentaria provee una barrera a los GC maternos, inactivándolos y evitando así alteraciones en las crías (Cottrell y Seckl, 2009). En el humano, la inactivación del cortisol por la 11 β -HSD2 conduce a la formación de cortisona; en roedores, la inactivación de la corticosterona por la 11 β -HSD2 conduce a la formación de la 11 dihidro corticosterona. Una alteración en la actividad de la 11 β -HSD2 en mujeres gestantes tendrá los mismos efectos que una administración materna de GC o un estrés prenatal (Seckl y Holmes, 2007; Seckl, 2004), siendo una pieza clave en la programación fetal, ya que puede ser el integrador crucial de las influencias ambientales maternas que proveen al feto una predicción sobre cuáles serán las circunstancias en las que nacerá (Seckl y Holmes, 2007).

Se ha observado que los efectos de una exposición prenatal a GC, además de depender del momento en el cual afecta a la cría, depende de su sexo (Liu *et al.*, 2001), siendo las hembras más resistentes que los machos, tal como se observó en estudios anteriores, en donde placentas de fetos humanos femeninos poseen una mayor inactivación de GC y menor cantidad de receptores para corticosteroide que los machos (Clifton y Murphy, 2004).

En estudios realizados por Ronco *et al.*, (2009) no se encontró diferencias en la expresión ni actividad de la enzima placentaria 11 β -HSD2 de ratas al momento del parto (entre control y expuestas a dosis altas de Cd²⁺). Estos resultados hacen pensar que las placentas de madres expuestas a Cd²⁺ son incapaces de inactivar el exceso de GC provocado, con la consecuente sobreexposición del feto a elevadas concentraciones de GC. También la fisiología placentaria puede ser dañada por Cd²⁺ aún cuando éste no sea capaz de atravesar la barrera placentaria.

Debido a un ambiente perturbador durante la gestación, se ven alteradas la función placentaria y la entrega de nutrientes al feto, siendo los más críticos la glucosa y el oxígeno. Se ha observado que al aumentar la exposición a GC y disminuir o bloquear la actividad placentaria de 11 β -HSD2, se reduce el crecimiento fetal (Cottrell y Seckl, 2009; Seckl y Holmes, 2007) y existe un mayor riesgo de partos prematuros (Rondo *et al.*, 2003).

Es posible que el menor PN de neonatos de madres expuestas sea concomitante con alteraciones metabólicas o de otras funciones de algunos órganos como hígado, riñón y

corazón lo que puede llevar al desarrollo de ciertas patologías a largo plazo. (Cottrell y Seckl, 2009).

Programación fetal

Mecanismos moleculares tales como el estrés y GC ejercen efectos en la programación del feto incluyendo cambios epigenéticos en la cromatina y fenotípicos, los que afectan notablemente la expresión de GR en tejidos específicos. El estrés prenatal o la exposición a GC nos puede proveer la conexión entre la maduración fetal y la fisiopatología en la vida adulta (Seckl y Holmes, 2007), ya que este exceso de GC en la vida temprana puede alterar permanentemente las señales de GC en los tejidos. Sus efectos pueden ser beneficiosos, pero a largo plazo incrementan el riesgo de desarrollar patologías, ya que el feto se adapta modificando su tamaño, estructuras y funciones (Cottrell y Seckl, 2009).

La administración de dexametasona a hembras gestantes induce en sus crías a los 6 meses de edad, un incremento en la expresión de GR y una reducción en la expresión de 11 β -HSD2 renal. Cabe destacar que este último efecto es prevenido al proporcionar una dieta con un alto contenido de omega-3 (Wyrwoll *et al.*, 2007).

Al exponer a ratas gestantes a GC o una nutrición materna deficiente en proteínas, se observó un bajo PN, una alteración en GR y como consecuencia, un incremento en la expresión y actividad de PEPCK y la programación de la resistencia a la insulina y problemas de tolerancia a la glucosa en la vida adulta (Hales *et al.*, 1996; Ozanne *et al.*, 1996; Nyirenda *et al.*, 1998, Lillycrop *et al.*, 2005).

Entre las enfermedades que se pueden presentar durante la vida adulta, debido al estrés prenatal al cual fue sometido el individuo, se encuentran los desórdenes en el eje HPA, tanto en su función como en su regulación. (Cottrell y Seckl, 2009; Seckl, 2004; Mueller y Bale, 2008), además de hipertensión, diabetes tipo 2, obesidad y síndrome metabólico, enfermedad coronaria cardíaca, osteoporosis, depresión y psicosis, falla renal crónica y respuesta gonadal e inmune alterada (Seckl y Holmes, 2007).

Existen evidencias que la programación fetal específica por sexo comienza muy temprano en la gestación, dependiendo del tiempo de exposición y vulnerabilidad del feto a insultos maternos. Crías expuestas a una deficiencia proteica dietaria durante la gestación, poseen alteraciones en GR hepático, alterando la expresión de genes blanco relacionados con el metabolismo de lípidos y CH, como PEPCK y AOX. Específicamente, se observó una

alteración del gen de receptor activado de proliferación peroxisomal (PPAR- α) lo que se traduce en un incremento en la expresión de su gen blanco, AOX (Lillicrop *et al.*, 2007; Mueller y Bale., 2008). Así también, en crías adultas de ratas expuestas a dexametasona durante la gestación tardía, la expresión hepática y actividad del mRNA del GR y de PEPCK se ven incrementadas (Nyirenda *et al.*, 1998). Por otra parte, en condiciones de restricción energética, tales como el ayuno o el ejercicio, las concentraciones sistémicas de GC se elevan, y esto es detectado por GR hepático, el cual coordina cambios en el metabolismo para movilizar glucosa a otros tejidos, como por ejemplo cerebro y músculo esquelético a través de una “regulación positiva” del mRNA de PEPCK (Opherk *et al.*, 2004).

Un ciclo importante del metabolismo de CH es la gluconeogénesis a partir de intermediarios como lactato y aminoácidos que mantiene los niveles circulantes de glucosa durante la ausencia de ingesta de comida (Chandramouli *et al.*, 1997). PEPCK es una de las enzimas catalizadoras, la cual se encuentra en mayor proporción en la mitocondria, y parcialmente en citosol en humanos (Van den Berghe, 1996). El mRNA de PEPCK es inducido por GC, hormona tiroidea y glucagón (Loose *et al.*, 1985), mientras que la insulina es un represor importante de la actividad del promotor (Kioussis *et al.*, 1978). Desai *et al.*, (1997) observaron que en ratas gestantes sometidas a un régimen nutricional con restricción proteica, sus crías muestran un incremento en la gluconeogénesis hepática, lo que refleja un incremento en la expresión hepática de GR y la expresión de PEPCK (Lillicrop *et al.*, 2005).

Hipótesis

En ratas, la exposición prenatal a cadmio induce una alteración en la expresión del receptor de glucocorticoide hepático, lo que altera la expresión de sus genes blanco relacionados con el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos.

Objetivo general

Demostrar que la exposición a cadmio durante la gestación en ratas, induce en las crías alteraciones del metabolismo hepático.

Objetivos específicos

1.- Evaluar el efecto de la exposición a cadmio (50 ppm) durante la gestación sobre la expresión del receptor de glucocorticoide (mRNA y proteína) en tejido hepático de neonatos machos y hembras.

2.- Evaluar el efecto de la exposición a cadmio (50 ppm) durante la gestación, sobre la expresión (mRNA) de dos genes blanco del receptor de glucocorticoide en tejido hepático de neonatos machos y hembras:

a.- Fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK, metabolismo de carbohidratos)

b.- Acetil CoA oxidasa (AOX; metabolismo de lípidos)

3.- Determinar el efecto de la exposición a cadmio (50 ppm) durante la gestación, sobre las concentraciones de triacilglicerol y colesterol en tejido hepático de neonatos machos y hembras.

4.-Determinar el efecto de la exposición a cadmio (50 ppm) durante la gestación sobre la concentración de glicógeno en tejido hepático de neonatos machos y hembras.

5.-Establecer las correlaciones existentes entre la expresión de receptor de glucocorticoide y sus genes blanco con los niveles hepáticos de triacilglicerol, colesterol y glicógeno.

Materiales y Métodos

Modelo de estudio y tratamientos

Este estudio se realizó en ratas de la cepa *Wistar*. Ratas hembra recién destetadas (21 días de edad) fueron expuestas a 10 ppm de CdCl₂ (tratadas) o no (controles) en el agua de bebida desde el destete hasta la edad de 2 meses. Durante este período, ratas controles y tratadas se alimentaron con la dieta AIN-76 (Diet Research, USA, composición en Tabla 1). Los animales controles recibieron agua destilada.

Se cruzaron 10 hembras vírgenes (200-250 g) de cada grupo (control y tratadas); la monta se determinó por visualización de espermatozoides en fluido vaginal en el microscopio (día 0). Las ratas preñadas fueron sometidas a un tratamiento con 50 ppm de Cd²⁺ (como CdCl₂ en el agua de bebida) durante todo el período de gestación y fueron alimentadas *ad libitum* con dietas isocalóricas (AIN-93G, ver tabla 2 de composición). Los animales controles recibieron agua destilada. El régimen de los animales fue de 12 h de luz y 12 h de oscuridad para todos los grupos de estudio.

Un día antes del parto (día 20 de gestación) se realizó una cesárea, insensibilizándolas con CO₂. Todas las cesáreas se realizaron en la mañana (9:00-11:00 h), se colectaron las crías y órganos los que se mantuvieron congelados a -80°C hasta las determinaciones posteriores.

Los procedimientos con los animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del INTA cuyo certificado se adjuntó al proyecto al momento de ser presentado al Concurso Regular de Fondecyt el año 2007 (Anexo).

A las crías se les determinó el peso y talla (Tabla 3). Además, el peso y talla se determinó por separado en hembras y machos (Tabla 4). Estas mediciones fueron realizadas previamente por alumnos memoristas de Laboratorio de Hormonas y Receptores, INTA en el año 2009.

Tabla 1: Composición dieta AIN-76A

Producto	G (%)	Kcal (%)
Proteína	20.3	20.8
Carbohidrato	66	67.7
Grasa	5.0	11.5
Total	91.3	100
Kcal/g	3.9	
Ingrediente	Gr	Kcal
Caseína	200	800
DL-Metionina	3	12
Almidón de maíz	150	600
Sacarosa	500	2000
Celulosa	50	0
Aceite de maíz	50	450
Mezcla de minerales	35	0
Mezcla de vitaminas	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Total	1000	3902

Tabla 2: Composición dieta AIN-93G

Producto	G (%)	Kcal (%)
Proteína	20.0	20.3
Carbohidrato	64.0	63.9
Grasa	7.0	15.8
Total	91.0	100
Kcal/g	3.9	
Ingrediente	G	Kcal
Caseína	200	800
L-Cistina	3	12
Almidón de maíz	397	1590
Maltodextrin 10	132	528
Sacarosa	100	400
Celulosa	50	0
Aceite de soya	70	630
t-Butilhidroquinona	0.014	0
Mezcla de minerales	35	0
Mezcla de vitaminas	10	40
Bitartrato de colina	2.5	0
Total	1000	4000

Tabla 3: Antecedentes de las crías (promedio \pm DE).

	Control	Tratado (50 ppm Cd ²⁺ durante la gestación)
Peso corporal (g)	3.3 \pm 0.4	2.9 \pm 0.4*
Tamaño corporal(cm) ^y	3.8 (3.6-3.9)	3.6 (3.4-3.8) *
Peso de hígado (g) ^y	0.28 (0.26-0.30)	0.18 (0.16-0.20) *

Los resultados representan determinaciones realizadas en 140 crías de 10 hembras gestantes. Sólo el peso corporal al nacimiento tiene una distribución normal y los datos se expresan como promedio \pm DE. ^yResultados expresados en medianas y percentiles (25-75), *p<0.001 test de Kruskal-Wallis.

Tabla 4: Antecedentes de las crías hembra y macho (promedio \pm DE).

	HEMBRAS		MACHOS	
	CONTROL	TRATADO	CONTROL	TRATADO
Peso de nacimiento (g)	3.0 \pm 0.7	2.9 \pm 0.4*	3.2 \pm 0.8	3.0 \pm 0.7*
Talla (cm)	3.5 \pm 0.5	3.3 \pm 0.3*	3.6 \pm 0.5	3.4 \pm 0.5*

Los resultados representan determinaciones medidas en aproximadamente 60 crías hembras y 60 crías macho provenientes de 10 madres gestantes expuestas (50 ppm Cd²⁺) y controles. Los datos se expresan como promedio \pm DE, *p<0.001 test de Kruskal-Wallis.

El presente estudio se realizó con los hígados de los neonatos los que fueron separados por sexo y estuvieron almacenados a -80°C en los que se determinó la expresión de genes asociados al metabolismo de hidratos de carbono y lípidos.

Determinación de la abundancia de receptor de glucocorticoide en tejido hepático por Western Blot

La expresión del GR en tejido hepático neonato de ratas tratadas y no tratadas con Cd²⁺ durante la gestación se realizó por la técnica de Western Blot (WB).

Las muestras de hígado congeladas se molieron en un mortero de vidrio en hielo seco (para tener una mezcla homogénea del tejido) y las proteínas se extrajeron con 5 ml de buffer RIPA (compuesto por 150 mM cloruro de sodio, 1.0% NP-40 o Triton X-100, 0.5% deoxycolato de sodio, 0.1% SDS (dodecil sulfato de sodio) y 50 mM Tris pH 8.0) por gramo de tejido. Se agregó inhibidor de proteasas en una proporción de 100 µl de inhibidor por cada 1 ml de RIPA. Se homogenizó el tejido para su posterior centrifugación a 12.000 rpm por 15 minutos. Se rescató el sobrenadante.

Las proteínas se cuantificaron con un kit (Bio-Rad), utilizando una placa de ELISA de 96 pocillos, en donde se le agregó a cada 20µl de muestra y su respectivo reactivo. La placa se dejó en agitación por 15 minutos y se determinó la absorbancia en un lector de ELISA a 630 nm.

Las proteínas obtenidas de cada muestra se corrieron en un gel de acrilamida/poliacrilamida al 10% (electroforesis). Luego se transfirieron a una membrana de Polivinilidenedifloride (PVDF) y se incubaron por 12 hrs a 4°C.

La membrana se lavó con una solución suave y se agitó por 5 a 10 minutos. Luego se lavó dos veces por 10 minutos con una solución y dos veces con otra por 5 minutos. Se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en T-TBS durante 1 hora (para evitar la unión de proteínas inespecíficas).

La membrana se incubó por otras 12 horas a 4°C con los anticuerpos primarios preparados en leche descremada al 5% en T-TBS: anti β-Actina (Abcam, # ab6276) dilución 1:7000 que se usó para normalizar la carga de la proteína, o anti GR (Abcam, # ab2768) a una concentración de 5 µg/ml. Después, se lavó la membrana cuatro veces por 5 minutos cada una con T-TBS para remover los residuos del anticuerpo primario y realizar la incubación con el anticuerpo secundario cabra anti ratón (Chemicon, # 12-349) durante 1 hora a temperatura ambiente, usando una dilución 1:1500 en leche descremada al 5% en T-TBS.

Finalmente, se lavó la membrana cuatro veces por 5 minutos cada una con T-TBS y se reveló con un kit de quimioluminiscencia “Western lightning plus-ECL” de Perkin Elmer

NEL103001EA). La densidad de las bandas fue cuantificada con el programa computacional Gel-Pro Analyzer.

Determinación cuantitativa de la expresión de los genes de receptor de glucocorticoide, fosfoenol piruvato carboxiquinasa y acetil Co-A oxidasa por Real Time PCR (qRT-PCR)

La concentración de mRNA para estos tres genes se realizó por Reacción de la Polimerasa en Cadena en tiempo real (qRT-PCR). Se usó el kit “Lightcycler FastStar DNA Master SYBR Green I” (ROCHE).

Este método se basa en la detección y amplificación de fragmentos específicos de DNA, mediante la medición de la fluorescencia emitida por una sonda específica del DNA diana marcada con un fluorocromo. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto formado en cada ciclo de qRT-PCR. Para normalizar estas mediciones (para los 3 genes: GR, AOX Y PEPCK) se utilizó el gen de Actina-2 de *Rattus norvegicus*.

El qRT-PCR consta de tres pasos que se repiten un número determinado de ciclos dependiendo del gen a medir: separación del DNA para que se encuentre en forma de cadena sencilla, unión de los partidores a esta cadena y síntesis de la cadena complementaria a partir de los cebadores.

El fluorocromo utilizado fue SYBR-Green I (agente intercalante que aumenta la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice). A medida que aumenta el DNA en cada ciclo, existe un aumento proporcional de la fluorescencia emitida.

La repetición de estos ciclos hace que la cantidad del fragmento de DNA que se está amplificando aumente de manera exponencial, de modo que aunque se parta de una cantidad muy pequeña al final de un número determinado de ciclos se obtendrá una cantidad muy importante.

El diseño de los partidores es muy importante y su especificidad dependerá del tipo de amplificación que se desee hacer.

La primera etapa de este proceso consiste en la extracción del RNA total de la muestra de tejido, el que posteriormente se convierte en DNA (cDNA) con la transcriptasa reversa. Polimerasa es la enzima que sintetiza una cadena de DNA complementaria (cDNA) para lo que necesita la presencia de pequeñas secuencias de ADN denominadas partidores que deben ser complementarios de los extremos de la secuencia que se desea ampliar.

El RNA se extrajo desde las muestras de hígado fetal pulverizado utilizando Trizol (Invitrogen). En tubos eppendorf libre de nucleasas se depositaron 10 a 50 mg de tejido

pulverizado. Se agregó 1 ml de Trizol y se homogenizaron las muestras dejándolas a temperatura ambiente por alrededor de 5 minutos para luego agregar cloroformo y agitar. Se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, donde se le añadió 600 µl de isopropanol. Nuevamente fue centrifugada a 12.000 x g a 4°C por 10 minutos para obtener un pellet de color blanco o transparente, el cual se lavó con 1 ml de etanol 75% (diluido con agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC)) para evitar la degradación del RNA y se centrifugó a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C.

El precipitado de RNA se resuspendió con agua de DEPC y se incubó a 55 – 60°C. Se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm para conocer su concentración. Se sintetizó el cDNA utilizando la enzima M-MLV (Promega), para lo que se colocó en un tubo eppendorf el volumen equivalente a 1 µg de RNA, se diluyó con agua libre de nucleasas y agregó 1 µl de oligo dT (oligo-desoxitimidinas) para luego incubarlo a 70°C en un termociclador por 5 minutos.

La muestra se dejó en hielo y se mezcló con 8 µl de Mix (compuesto por solución 5X M-MLV y una mezcla de dNTPs). Se incubó en termociclador a 42°C por 60 minutos y luego se inactivó la enzima incubando a 70°C durante 10 minutos.

Se preparó la mezcla de PCR que contiene 1 µl del cDNA , 1 µl de Master Mix (mezcla de reacción que contiene la enzima), 6 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl de partidador Forward (Fw) y 0.5 µl de partidador Reverse (Rv; ambos partidores son específicos para cada gen) y fueron depositadas en capilares, los que fueron centrifugados por un minuto a 12.000 rpm a 4°C, luego fueron introducidos en el equipo LyghtCycler para la realización de la amplificación, de donde se obtuvieron los datos utilizando el programa Lyghtcycler 3. El kit comercial utilizado fue “Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I” de Roche.

Los partidores utilizados fueron:

GR Rv 5'- CTC CCT CTG CTA ACC TGT G-3'
GR Fw 5'- CCT CCC ATT CTA ACC ATC CT-3'

AOX Rv 5'- GTG GTT CTG GTT CGC TTT GC-3'
AOX Fw 5'-ACA AGC TGA CGT ATG GGA CC-3'

PEPCK Rv 5'- TGC CTT CGG GGT TAG TTA TGC-3'
PEPCK Fw 5'- ACG GTG GGA ACT CAC TGC TTG-3'

β-Actina Rv 5'- AAG AAA GGG TGT AAA ACG CA-3'
β-Actina Fw 5'- CCG TAA AGA CCT CTA TGC CA-3'

Determinación de triacilglicerol y colesterol en tejido hepático

Para la medición de TAG y colesterol en la fracción lipídica extraída del tejido hepático, se utilizaron los kit TG COLOR (GPO/PAP/AA) y COLESTAT (ENZIMATICO /AA) de Wiener Lab, respectivamente.

Para la extracción de los lípidos se pulverizó el tejido hepático en hielo seco. Se tomaron 0.1-0.5 g de tejido y se depositaron en un tubo agregándole 8 ml de cloroformo/metanol (2:1). Se homogenizó y agregaron 2 ml de NaCl 0.9% y 200 µl de ácido acético y se centrifugó a 2.500 rpm por 5-10 minutos. Se colectó la fase inferior (fase clorofórmica) y fue transferida a un tubo de vidrio pequeño y secado bajo N₂. Posteriormente, se agregaron 4 ml de cloroformo 100% a la fase superior remanente fue agitado vigorosamente y centrifugado a 2.000-3.000 rpm. La fase inferior se colectó y juntó con la previamente colectada, y se dejó evaporar a sequedad bajo N₂ gaseoso para evitar la oxidación. Las muestras se guardaron a -20°C.

Una vez obtenidos los lípidos, se cuantificaron con los kits mencionados, para ello se disolvieron previamente en 1-2 ml de cloroformo/metanol 2:1 y se sonicaron en sonicador de baño 30 segundos. Se tomaron 10 y 20 µl y se secó bajo N₂ gaseoso. Finalmente, se le agregó Tritón X100 al 0.05% y se sonicó con sonicador de vástago hasta la total resuspensión.

La muestra se tomó y midió con el kit a través de una reacción colorimétrica específica para TAG y colesterol.

Determinación de la concentración de Glicógeno hepático

La concentración de glicógeno en el hígado de neonatos se determinó por un kit comercial que se basa en la medición de la glucosa liberada por hidrólisis enzimática (glucoamilasa) del glicógeno almacenado, obteniendo productos que reaccionaron con prueba de OXIRED para generar color y fluorescencia. El ensayo puede detectar glicógeno desde 0.0004 a 2 mg/ml. Se utilizó el kit "Glycogen Assay" (BioVision).

Las muestras de tejido hepático congelado se homogenizaron con 200 µl de agua destilada fría a 4°C y luego se colocaron a 100 °C por 5 minutos para inactivar las enzimas. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos para remover el material insoluble. Se agregaron 50 µl de muestra o buffer (BLANCO) a los pocillos de test y luego se agregó la mezcla enzimática de hidrólisis y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se determinó la glucosa liberada por colorimetría leyendo la absorbancia a 570 nm.

Análisis estadístico

Se utilizaron 8 muestras para cada determinación. Para definir la normalidad de los datos se usó el test de normalidad Shapiro-Wilk en todas las variables.

Las variables no paramétricas, es decir, aquellas que no presentaron una distribución normal, fueron, tanto en hembras como machos: expresión de GR (proteína y mRNA), expresión de mRNA de PECK y AOX y finalmente, concentración de TAG, colesterol y glicógeno. En las que se utilizó el test de Mann-Whitney para ver diferencias entre dos grupos independientes. Para buscar diferencias entre múltiples grupos independientes se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados diferencias estadísticas significativas.

Para ver las asociaciones entre todas las variables medidas se usó el test de correlación de Spearman.

Resultados y Discusión

La diferente susceptibilidad de hembras y machos a GC, sumado a la dependencia de efectos adversos por diferencias sexuales en el caso de ingesta y absorción de Cd^{2+} motivó estudiar los efectos en crías hembra y macho de madres expuestas durante la gestación a 50 ppm de Cd^{2+} por separado.

Abundancia de la proteína de receptor de glucocorticoide en tejido hepático

En la figura 1 se presenta la abundancia de GR (proteína de 97 kDa) en hígado de neonatos hembra (a) y macho (b), provenientes de madres tratadas con CdCl_2 durante la gestación. Se observó una mayor abundancia de GR (proteína de 97 kDa) en hígado de neonatos hembra tratadas, en comparación con las crías hembra de ratas control (Figura 1,a).

En los neonatos macho, se observó que en el grupo tratado tuvo una menor abundancia relativa que sus respectivos controles (Figura 1,b).

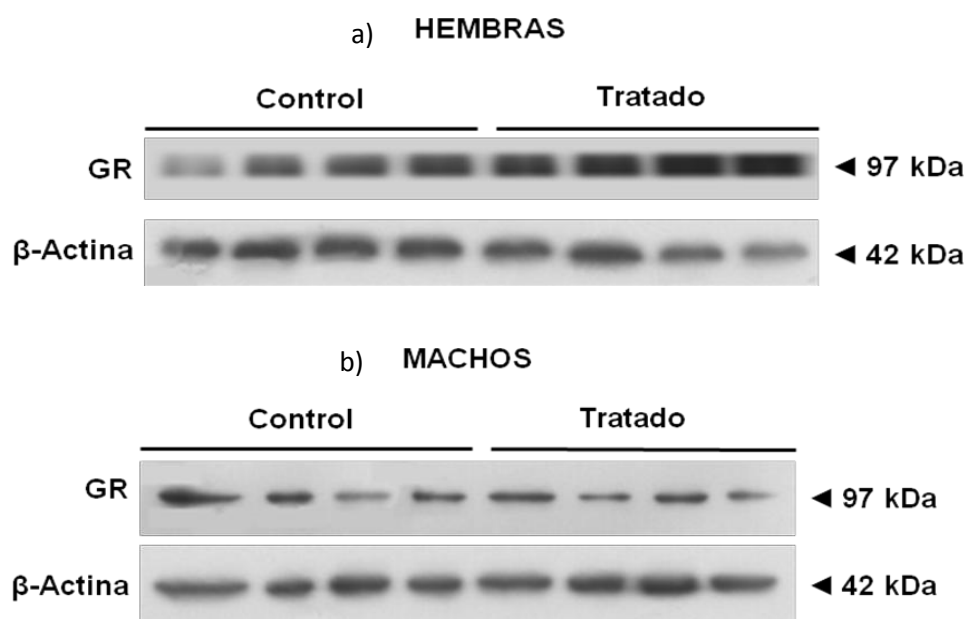


Figura 1. Western Blot de GR en hígado de crías hembra (a) y macho (b) expuestas a Cd^{2+} (50 ppm), y sus respectivos controles relativo a β -actina.

La densidad de las bandas de GR y actina fue cuantificada con el programa computacional Gel – Pro Analyzer lo que permitió realizar gráficos de barra con sus respectivas desviaciones estándares (DE) para facilitar el análisis estadístico

Se observa en la Figura 2, que la abundancia relativa GR en hembras del grupo tratado fue significativamente mayor que la abundancia relativa de GR de sus controles respectivos (*p=0.0008).

Sin embargo, en machos, la abundancia relativa de GR en el grupo tratado resultó significativamente menor que sus respectivos controles (Figura 2, * p= 0.0011)

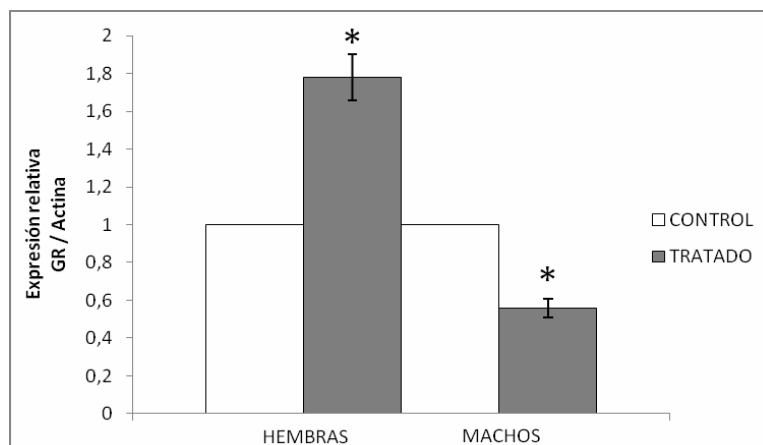


Figura 2. Cuantificación de proteína hepática de GR relativo a β -actina, de crías neonatas hembras y machos, control y tratadas con Cd^{2+} (50 ppm) durante el desarrollo. Los datos se expresan como el promedio \pm DE de 8 muestras por grupo, *p <0.05, Mann-Whitney U.

Al analizar la abundancia de GR entre los diferentes grupos: hembras, machos, tratados o controles, se observaron diferencias significativas ($p < 0.004$) entre hembras controles vs hembras tratadas ($p = 0.000293$), hembras controles vs machos controles ($p = 0.003$), hembras tratadas vs machos tratados ($p = 0.000029$) y machos controles vs machos tratados ($p = 0.0005$).

En estudios anteriores (Ronco *et al.*, 2009) se observó que ratas neonatas expuestas a 50 ppm de Cd^{2+} durante la gestación presentaron un aumento de los niveles plasmáticos circulantes de GC (corticoesterona), lo que, según otros autores (Vijayan *et al.*, 2003; Nyirenda *et al.*, 1998), sería un efecto ligado a un aumento en la abundancia de proteína de GR, tal como lo observamos en hembras. Estas respuestas específicas en hembras y machos en relación a la expresión de GR hepático por efecto prenatal de Cd^{2+} constituyen un

hallazgo novedoso de este estudio y confirman el dimorfismo sexual frente a una exposición a metales pesados.

La disminución de GR en machos concuerda con los resultados reportados por Vijayan *et al.*, (2003), donde un aumento de GC resultó en una disminución en la proteína de GR.

Expresión de mRNA de los genes de receptor de glucocorticoides, fosfoenol piruvato carboxiquinasa y acetil Co-A oxidasa en tejido hepático

Se utilizó qRT-PCR y los valores fueron relativizados con β -actina para las mediciones de todos los genes mencionados. A los controles se les asignó un valor de 1 (control =100%) y los resultados fueron expresados como un porcentaje relativo al control.

Dado que el sistema GC regula el metabolismo de lípidos y CH, se quiso estudiar las consecuencias metabólicas de estos cambios en la expresión de GR hepático, analizando, mediante este método, dos de sus enzimas limitantes: PEPCK y AOX.

Se observó mayor cantidad de mRNA para GR en hembras tratadas con Cd^{2+} al compararlas con sus controles (Figura 3). Estos valores presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($*p < 0.0002$), (Figura 3).

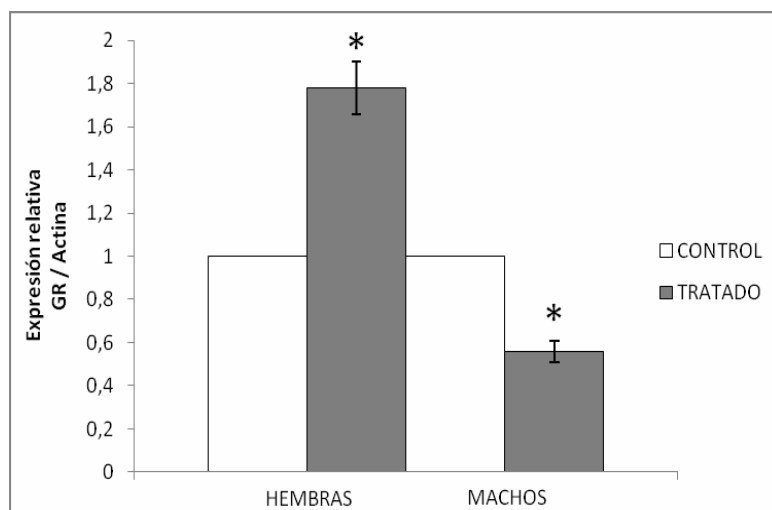


Figura 3. Expresión de GR hepático (mRNA) relativo a β -actina por qRT-PCR en crías hembras y machos, controles y tratadas con Cd^{2+} (50 ppm). Los datos se expresan como el promedio \pm DE relativo al control (Control=100%) de 8 muestras por grupo $*p < 0.05$, Mann-Whitney U.

En crías neonatas macho, el grupo tratado presentó una menor expresión de GR en comparación a su respectivo control (Figura 3). Esos valores presentaron una diferencia estadística significativa (* $p < 0.002$).

Con estos resultados se demostró que existe una alteración en la expresión (mRNA) de GR hepático, confirmándose el dimorfismo sexual entre hembras y machos.

Es probable que esta alteración en las hembras, donde hubo un aumento significativo, al igual que en el caso de la proteína, sea una consecuencia del aumento de corticoesterona plasmática observada en las crías expuestas a Cd^{2+} , ya que de acuerdo a los estudios realizados por Henson y Chedresse (2004) el Cd^{2+} actúa como “*disruptor-endocrino*”, afectando el sistema endocrino, principalmente en etapas tempranas del desarrollo (durante la gestación) dando como resultado un aumento en la expresión del GR hepático.

En el caso de la disminución del valor en machos no existen datos similares en la literatura, ya que lo común es que estos niveles aumenten.

En resumen, los resultados de expresión de GR (proteína y mRNA) indican que los niveles de proteína reflejan exactamente los niveles de transcripción del gen, tanto en machos como en hembras, por lo que se puede descartar que la exposición prenatal Cd^{2+} induzca en el hígado de neonatos alteraciones post transcripcionales y post traduccionales del GR.

En el caso de PEPCCK, las hembras tratadas mostraron una menor expresión del mRNA que sus respectivos controles (Figura 4). Estos valores presentaron una diferencia estadísticamente significativa (* $p = 0.03$).

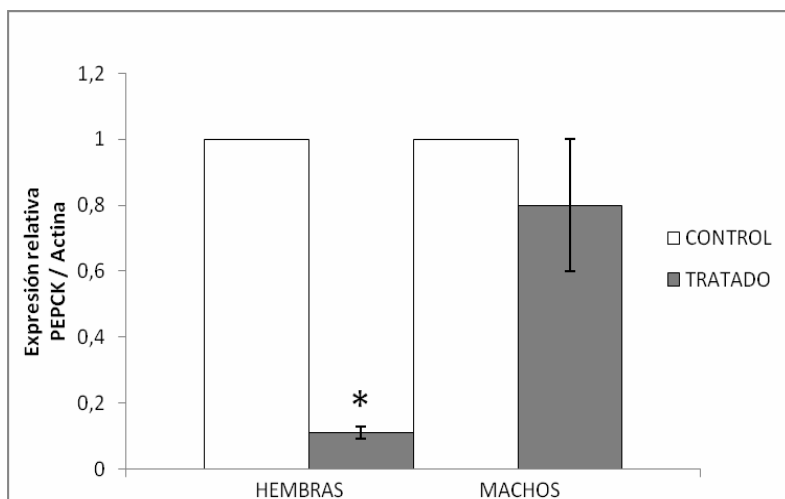


Figura 4. Expresión de PEPCK hepático (mRNA) relativo a β -actina por qRT-PCR en crías hembras y machos, controles y tratadas con Cd^{2+} (50 ppm). Los datos se expresan como el promedio \pm DE relativo al control (Control=100%) de 8 muestras por grupo * $p < 0.05$, Mann-Whitney U.

En los neonatos macho la expresión de PEPCK no mostró diferencias significativas entre los grupos control y tratados (Figura 4), ($p > 0.28$).

Dado que PEPCK es un gen blanco del GR, se debería haber esperado que un aumento en los niveles de GR indujera un aumento en la expresión de PEPCK, y una disminución de GR provocara una disminución de PEPCK (Lillicrop *et al.*, 2005). Dundjersky *et al.*, (1992), reportó que Cd^{2+} causa una disminución en la capacidad de GC de unirse a GR, alterando las respuestas activadoras resultantes de la unión GC-GR. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concordantes con esta observación.

En machos, la reducción de GR no afectó la expresión de PEPCK. En hembras, el aumento de GR inhibió la expresión de PEPCK.

Una hipótesis para explicar estos valores sería que, tal como se ha observado en estudios anteriores, la activación de esta enzima comienza con el nacimiento, observándose en algunos estudios que se encuentra ausente en hígado fetal (Hanson y Reshef, 1997); además, en hígado fetal de rata, el gen de PEPCK a los 19 días se encuentra inactivo (Benvenisty y Reshef, 1987) y que sus niveles y actividad aumentan marcadamente después del nacimiento (Hanson *et al.*, 1973). La actividad de esta enzima es mayor durante el ayuno,

cuando los niveles sanguíneos de glucosa están disminuidos y se requiere liberación a la sangre de glucosa a través de la gluconeogénesis hepática para mantener la glicemia, como se observó en estudios de Girard *et al.*, (1977) con hembras gestantes sometidas a ayunos de 96 hrs en las cuales se logra estimular la expresión de PEPCK en sus crías desde el día 17 de gestación. También, se observó en estudios realizados por Nyirenda *et al.*,(1998) que la estimulación de PEPCK es a largo plazo, y en aquellas crías adultas de madres expuestas a dexametasona (esteroide sintético) durante el último tercio de gestación, la expresión de mRNA de GR hepático y PEPCK, y su actividad estuvieron aumentadas significativamente en comparación a sus controles, por lo tanto, una sobreexposición programada de PEPCK hepática puede ser mediado por el incremento de GR, lo que finalmente desencadenaría una hiperglicemia (Liu *et al.*, 2005).

No se puede descartar que en el neonato las señales intracelulares que vinculan al GR con sus genes blanco estén aún poco desarrolladas y que las expresiones de PEPCK en el neonato estén solamente reguladas por los niveles de glucosa plasmáticas.

El hecho que en las hembra esté inhibida la expresión de PEPCK confirma que son más sensibles al efecto del Cd^{2+} que los machos (Vahter *et al.*, 2002).

En este estudio, a las madres no se le realizaron mediciones ni un tratamiento aparte del consumo de Cd^{2+} , sólo se estandarizó el tratamiento para todas, por lo que previo a la cesárea no se les estimuló con GC exógeno, por lo que podría resultar interesante realizar un estudio comparando a las crías tratadas y controles de diferentes grupos de madres: con ayunos prolongados, con GC exógeno y con alimento *ad libitum* hasta la cesárea.

Al evaluar la expresión de AOX, las hembras tratadas mostraron un valor menor que sus respectivos controles (Figura 5). Estos valores presentaron una diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.01$).

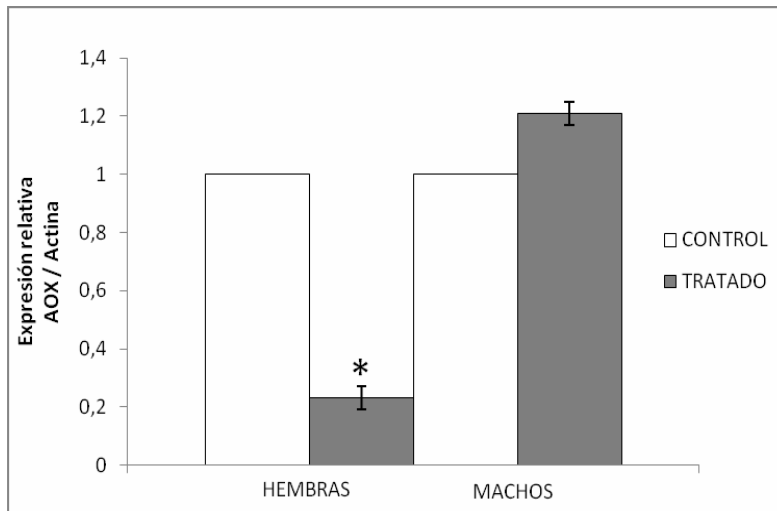


Figura 5. Expresión de AOX hepático (mRNA) relativo a β -actina por qRT-PCR en crías hembras y machos, controles y tratadas con Cd^{2+} (50 ppm). Los datos se expresan como el promedio \pm DE relativo al control (Control=100%) de 8 muestras por grupo * $p < 0.05$, Mann-Whitney U.

En machos se observó que la expresión de AOX no mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.28$) entre grupo control y tratado (Figura 5).

La enzima AOX fue escogida como marcador del metabolismo lipídico debido a que es limitante en la β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos en hígado (Mandard *et al.*, 2004), encargándose de catalizar el primer paso, en el cual las grasas son oxidadas a 2-trans-enoil CoA (Miyazawa *et al.*, 1987).

Dado que el gen AOX también es un gen blanco del GR, se esperaba un aumento en su expresión de mRNA en las crías hembra, debido a que en ellas aumentó la expresión de GR hepático comparado al control. Sin embargo, se observó un efecto opuesto, similar al encontrado con PEPCCK, que hasta el momento no se puede explicar midiendo sólo los niveles del mRNA. No se puede descartar que los niveles de proteína estén aumentados.

Según investigaciones de Hashimoto *et al.*, (1999), el efecto del bloqueo de AOX sería el desarrollo de esteatosis hepática acompañada de una activación sostenida de PPAR α hepático, por lo tanto esta disminución de AOX en hembras tratadas, concuerda con sus valores incrementados de colesterol.

En ratas genéticamente modificadas, deficientes en AOX, Cole *et al.*, (1993) también evidenciaron esteatosis y una espontánea proliferación de peroxisomas en el hígado.

Concentración de triacilglicerol en tejido hepático

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones hepáticas de TAG ni en hembras ni en machos tratados al compararlos con sus respectivos controles. (Figura 6, (p=0.88) y (p=0.59) respectivamente).

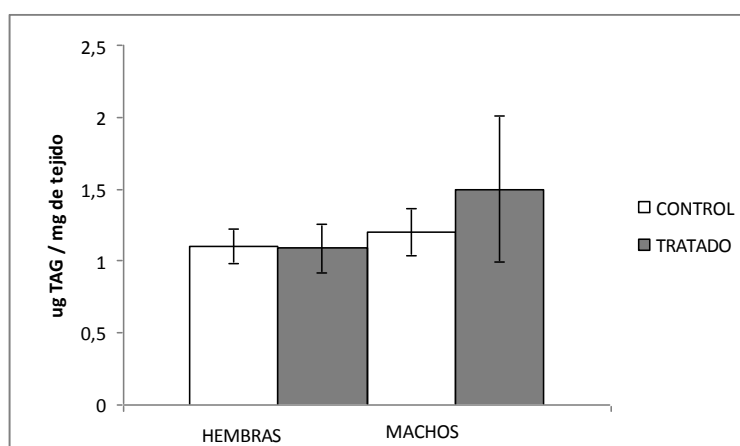


Figura 6. Concentración de TAG hepático en crías hembras y machos, controles y tratadas con Cd²⁺ (50 ppm). Los datos se expresan como el promedio \pm DE de 8 muestras por grupo.

Al evaluar asociaciones entre los distintos grupos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p=0.88).

En estudios realizados por Stael *et al.*, (1991) y Koliwad *et al.*, (2009) se observó que al administrar dexametasona, se incrementan los niveles de TAG. Por otra parte, al tratar ratas macho con hidrocortisona, no se observan cambios en los niveles plasmáticos de TAG, lo que se puede observar en estudios realizados por Mitamura (1987), en donde se observó que la administración de GC resulta en un selectivo incremento en los niveles de TAG plasmático. Por otro lado, Vegiopoulos y Herzig (2007) y Rose *et al.*, (2010) observaron que el uso crónico de GC provoca un exceso de reservas hepáticas de TAG.

Según estudios realizados por She *et al.*, (2000) existe una correlación entre los niveles de PEPCK y TAG hepáticos, evidenciado por una acumulación de TAG en hígado

frente a una ausencia de esta enzima hepática. Por lo tanto, en el caso de los datos obtenidos en hembras, los resultados concuerdan con la literatura, ya que hubo una diferencia significativa respecto a sus controles en hembras tratadas, sumado a un aumento en las concentraciones de TAG hepático, lo que no sucedió en el caso de los machos tratados, en donde al existir una disminución en las concentraciones de PEPCK hepática, se evidenció también una disminución en la concentración de TAG hepático.

Según reportes de Hu *et al.*, (2010), al proporcionar una dieta con saponinas de pepinos marinos, la cual estimula la expresión de mRNA de AOX, se atenúa la acumulación de TAG hepático, lo que concuerda con los valores obtenidos en ratas macho, pudiéndose pensar que el Cd²⁺ produce algún efecto parecido al provocado por la dieta nombrada, que provoca un aumento en esta enzima.

Concentración de Colesterol en tejido hepático

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones hepáticas de colesterol en hembras ni en machos (Figura 7, p=0.66 y p=0.51 respectivamente) tratados al compararlos con sus respectivos controles.

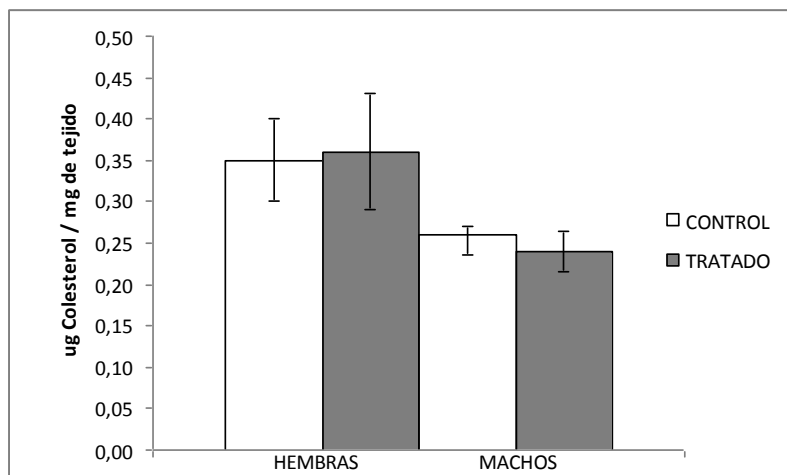


Figura 7. Concentración de Colesterol hepático en crías hembras y machos, controles y tratadas con Cd²⁺ (50 ppm). Los datos se expresan como el promedio ± DE de 8 muestras por grupo.

Al realizar la evaluación de los valores obtenidos de Colesterol entre hembras, machos y sus respectivos controles, se observó que no existe una diferencia significativa ($p > 0.004$).

Nashel (1986) observó que el tratamiento con GC, además de causar hipertensión y afectar el metabolismo de glucosa, provoca alteraciones en el metabolismo de lípidos: induciendo una acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos (Cheng *et al.*, 1995) y un incremento en los niveles séricos de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad) (Zimmerman *et al.*, 1984). Otros autores observaron que al tratar ratas macho con hidrocortisona (esteroide de acción corta) provoca una disminución, dependiente de la dosis y el tiempo, en las concentraciones de colesterol plasmático, sumado a estudios realizados por Staels *et al.*, (1991) en ratas *Wistar* donde también se evidenció una disminución de colesterol plasmático al ser tratadas con el mismo esteroide. Por el contrario, al administrar triamcinolona (esteroide sintético) se incrementan los niveles de colesterol plasmático. Sumado a esto, Mitamura (1987), evidenció en sus estudios que al administrar GC se produce un selectivo aumento de colesterol plasmático.

Los datos obtenidos en este estudio, en el caso de machos, donde los valores de colesterol fueron menores que sus controles, se observa una similitud a los efectos provocados por dexametasona. En el caso de las hembras, donde estos valores fueron mayores que sus controles, hay similitud con lo observado al utilizar hidrocortisona (Staels *et al.*, 1991).

Al comparar los datos informados por la literatura, con los resultados obtenidos, en donde los niveles de colesterol en crías neonatas hembra expuestas a Cd^{2+} son menores que sus controles, se aprecia una similitud con los efectos provocados por hidrocortisona en estudios de Staels *et al.*, (1991) y Koliwad *et al.*, (2009). En el caso de los machos, los resultados obtenidos podrían ser similares a lo sucedido con tratamientos con triamcinolona, (Staels *et al.*, 1991).

Concentración de Glicógeno en tejido hepático

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones hepáticas de glicógeno en hembras (Figura 8, $p = 0.51$) tratadas al compararlas con sus respectivos controles.

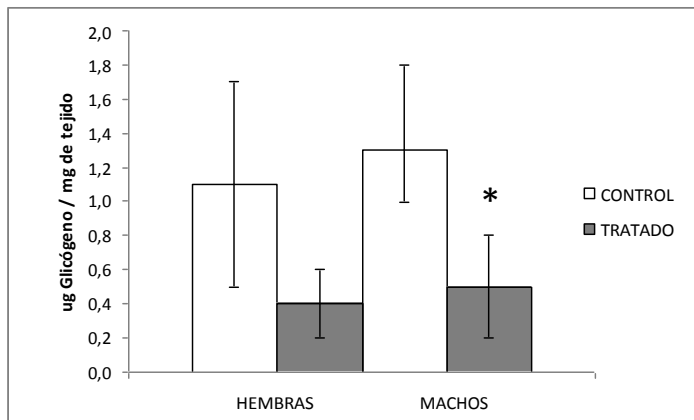


Figura 8. Concentración de glicógeno hepático en crías hembras y machos, controles y tratadas con Cd^{2+} (50 ppm). Los datos se expresan como el promedio \pm DE de 8 muestras por grupo. * $p=0.02$ entre tratados y controles, * $p=0.0004$ entre machos y hembras tratados con Cd^{2+} .

En machos tratados, la concentración de glicógeno hepático fue significativamente menor que sus respectivos controles (Figura 8, * $p=0.02$).

Al evaluar si existe una diferencia significativa de glicógeno hepático entre los distintos grupos, se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre hembras tratadas con machos tratados (* $p=0.0004$).

Los resultados obtenidos, tanto en machos (significativa) como hembras, con valores menores en tratados que en controles, son concordantes con los entregados en la literatura por Chapatawala *et al.*,(1982) en donde se observó que el Cd^{2+} modifica la actividad de numerosas enzimas, ejerciendo un efecto estimulador en la gluconeogénesis hepática y por lo tanto, una disminución en las concentraciones de glicógeno hepático. Además, los datos obtenidos por Opherk *et al.*,(2004) concuerdan con los valores obtenidos, ya que procesos de estrés o ayunos prolongados, provocarían un exceso de GC , los cuales estimularían la gluconeogénesis, produciendo mayores niveles de glucosa para su liberación a sangre, y de esta manera suplir las deficiencias, por lo tanto, habría una disminución en las reservas hepáticas de glicógeno.

Cabe mencionar, que según investigaciones anteriores, las crías de ratas no poseen grandes reservas hepáticas de glicógeno al momento del nacimiento, por lo que la actividad enzimática de la gluconeogénesis debe comenzar rápidamente (activando la expresión de sus enzimas, entre ellas PEPCK) y además debe existir una rápida movilización de las escasas reservas de glicógeno producidas durante el último tercio de gestación, para evitar caídas bruscas de glicemia (Ballard, 1967).

Al realizar una evaluación de las correlaciones existentes entre todas las variables medidas, tanto en controles como en tratados, en machos y hembras se observó que sólo en el caso de GR hepático (mRNA) en hembras tratadas y concentración de TAG hepático de hembras tratadas existe una correlación negativa ($Rho = -0.7857$) estadísticamente significativa ($*p < 0.03$) (Figura 9).

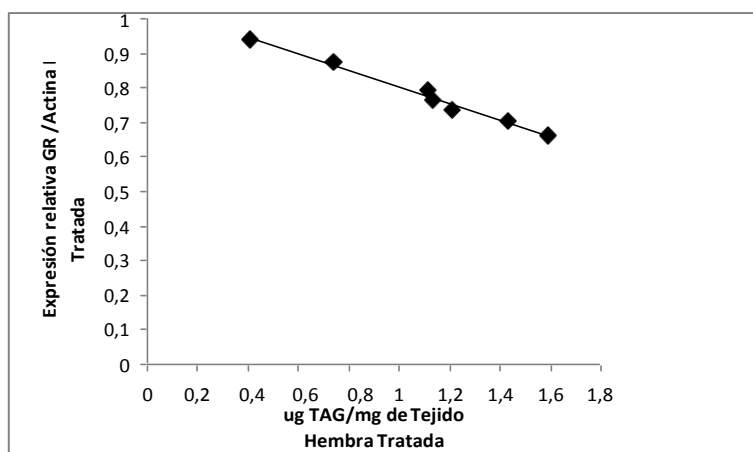


Figura 9. Prueba de correlación de Spearman ($Rho = -0.7857$) existente entre expresión de GR (mRNA) hepático y concentración de TAG hepático en hembras tratadas con Cd^{2+} (50 ppm), $*p < 0.05$, Mann-Whitney U.

Tal como se ha observado en la literatura (Vahter *et al.*, 2007), los resultados obtenidos en todos los estudios realizados pueden deberse al dimorfismo sexual de la exposición a metales pesados que existe en la mayoría de los mamíferos, siendo más afectadas hembras que machos.

Conclusiones

- 1.- La exposición a Cd^{2+} durante el período de gestación provoca alteraciones en la expresión hepática de GR de las crías y consecuentemente, una alteración en el metabolismo hepático de CH y lípidos lo que se demuestra por los cambios en la expresión del mRNA para los genes PEPCK y AOX.
2. Las alteraciones en la expresión de genes hepáticos de las crías neonatas son sexo-dependiente: en las hembras hubo un aumento significativo en los niveles de GR (proteína y mRNA) y una disminución significativa en la expresión de sus genes blanco AOX y PEPCK (mRNA). En machos, hubo una disminución significativa en GR (proteína y mRNA) y una menor concentración en los niveles hepáticos de glicógeno al compararlos con sus respectivos controles.
3. La exposición prenatal a Cd^{2+} puede inducir a una programación temprana del sistema GC.

Bibliografía

AKESSON, A; LUNDH, T; VAHTER, M; BJELLERUP, P; LIDFELDT, J; NERBRAND, C; SAMSIOE, G; STRÖMBERG, U; SKERFVING, S. 2005. Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environ. Health. Perspect.* 113: 1627–1631.

ALVAREZ, S; GOMEZ, N; SCARDAPANE, L; FORNES, M; GIMENEZ, M. 2007. Effects of chronic exposure to cadmium on prostate lipids and morphology. *Biometals* 20:727-741.

ATSDR AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. 2008. Cadmio (Cadmium). Atlanta, G.A.: Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU. Servicio de salud pública.

BALLARD, F. 1967. *Physiology of the Perinatal Period.* Editorial U Stave. New York, USA. 457 p.

BARKER, D; OSMOND, C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1: 1077-81.

BHATTACHARYYA, M; WILSON, A; RAJAN, S; JONAH, M. 2000. Biochemical pathways in cadmium toxicity. **In:** Zalup R.K, Koropatnick D.J. *Molecular Biology and Toxicology of Metals.* Editorial R.K. London, England. 596 p.

BEEK, J; GUAN, H; JULAN, L; YANG, K. 2004. Glucocorticoids Stimulate the Expression of 11- Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Cultured Human Placental Trophoblast Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 5614–5621.

BENVENISTY, N; RESHEF, L. 1987. Developmental expression and modification of genes. *Biol. Neonate.* 52:61-9.

BERNARD, A. 2008. Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J. Med. Res.* 128: 557-564.

BURGESS, S; HE, T; YAN, Z; LINDNER, J; SHERRY, A; MALLOY, C; BROWNING, J; MAGNUSON, M. 2007. Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metab.* 5: 313–320.

CHANDRAMOULI, V; EKBERG, K; SCHUMANN, W; KALHAN, S; WAHREN, J; LANDAU, B. 1997. Quantifying gluconeogenesis during fasting. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 273:1209–1215.

CHAPATAWALA, K; HOBSON, M; DESAIAH, D; RAJANNA, B. 1982. Effect of cadmium on hepatic and renal gluconeogenic enzymes in female rats. *Toxicol. Lett.* 12:27-34.

CHENG, W; KVILEKVAL, K; ABUMRAD, N. 1995. Dexamethasone enhances accumulation of cholesteryl esters by human macrophages. *Am. J. Physiol.* 269:642–648.

CLIFTON, V; MURPHY, V. 2004. Maternal asthma as a model for examining fetal sex-specific effects on maternal physiology and placental mechanisms that regulate human fetal growth. *Placenta* 25: 45–52.

COLE, T; BLENDY, J; SCHMID, W; STRAHLE, U; SCHUTZ, G. 1993. Expression of the mouse glucocorticoid receptor and its role during development. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 47: 49–53.

COLE, T; BLENDY, J; MONAGHAN, A; KRIEGLSTEIN, K; SCHMID, W; AGUZZI, A; FANTUZZI, G; HUMMLER, E; UNSICKER, K; SCHUTZ, G. 1995. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9:1608–1621.

COTTRELL, E; SECKL, J. 2009. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front. Behav. Neurosci.* 3:19.

DE MARTINO, M; ALESCI, S; CHOROUSOS, G; KINO, T. 2004. Interaction of the glucocorticoid receptor and the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII): implications for the actions of glucocorticoids on glucose, lipoprotein, and xenobiotic metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024:72–85.

DESAI, M; BYRNE, C; MEERAN, K; MARTENZ, N; BLOOM, S; HALES, C. 1997. Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rats dams fed a reduced-protein diet. *Am. J. Physiol.* 273: 899-904.

DUNDJERSKY, J; BUTORIVIC, B; KIPIC, J; TRAJKOVIC, D; MATIC, G. 1992. *In vivo* effects of cadmium on rat liver glucocorticoid receptor functional properties. *Int. J. Biochem.* 24: 1065-72.

ELEZ, D; DUNDJERSKI, J; MATIC, G. 2001. Cadmium affects the redox state of rat liver glucocorticoid receptor. *Cell Biol. Toxicol.* 17: 169-177.

FLORES, J; ARMIJO, J; MEDIAVILLA, A. 2003. *Farmacología humana.* 4^o Edición. Editorial Masson Barcelona ,España. 1400p.

FOWLER, B. 2009. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: A review 2009. *Toxicol.App.Pharmacol.* 238:294–300.

GIRARD, J; GILBERT, M; KERVRAN, A; ASSAN, R; MARLISS, E. 1977. Fetal metabolic response to maternal fasting in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. Gastrointest. Physiol.* 232: 456-463.

GUMY, C; CHANDSAWANGBHUWANA, C; DZYAKANCHUK, A; KRATSCHMAR, D; BAKER, M; ODERMATT, A. 2008. Dibutyltin Disrupts Glucocorticoid Receptor Function and Impairs Glucocorticoid-Induced Suppression of Cytokine Production. *PLoS ONE* 3: e3545.

HALES, C; DESAI, M; OZANNE, S; CROWTHER, N. 1996. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 341–350.

HALL, R; YAMASAKI, T; KUCERA, T; WALTNER-LAW, M; O'BRIEN, R; GRANNER, D. 2000. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 30169–30175.

HANSON, R; FISHER, L; BALLARD, F; RESHEF, L. 1973. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in fetal rat liver. *Enzyme* 15:97–110.

HANSON, R; RESHEF, L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 66 :581-611.

HASHIMOTO, T; FUJITA, T; USUDA, N; COOK, W; QI, C; PETERS, J; GONZALEA, F; YELDANDI, A; RAO, M; REDDY, J. 1999. Peroxisomal and mitochondrial fatty acid β -oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor α and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *J. Biol. Chem.* 274: 19228–19236.

HAYNE, R. 1991. Hormona adrenocorticorrófica, esteroides corticosuprarrenales y sus análogos sintéticos, inhibidores de la síntesis y acciones de las hormonas corticosuprarrenales. **In:** Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8° Edición. Editorial Médica Panamericana. México pp: 385-414.

HENSON, M; ANDERSON, M. 2000. The effects of cadmium on placental endocrine function. *Recent Res. Dev. Endocrinol.* 1:37–47.

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

HIDALGO, J; ARMARIO, A. 1987. Effect of Cd administration on the pituitary –adrenal axis. *Toxicol.* 45: 113-116.

HU, X; WANG, Y; WANG, J; XUE, Y; LI, Z; NAGAO, K; YANAGITA, T; XUE, C. 2010. Dietary saponins of sea cucumber alleviate orotic acid-induced fatty liver in rats via PPAR α and SREBP-1c signaling. *Lipids Health Dis.* 9:25.

KEMP, J. 2000. Guidelines update: where do the new therapies in the management of asthma? *NHLBI and WHO Global Initiative for Asthma Drugs* 59 :23-28.

KIOUSSIS, D; RESHEF, L; COHEN, H; TILGHMAN, S; IYNEDJIAN, P; BALLARD, F; HANSON, R. 1978. Alterations in translatable messenger RNA coding for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat liver cytosol during deinduction. *J. Biol. Chem.* 253:4327–4332.

KIPPLER, M; GOESSLER, W; NERMELL, B; EKSTRÖM, E; LÖNNERDAL, B; EL ARIFEEN, S; VAHTER, M. 2009. Factors influencing intestinal cadmium uptake in pregnant Bangladeshi women—A prospective cohort study. *Environ. Res.* 109: 914-921.

KOLIWAD, S; KUO, T; SHIPP, L; GRAY, N; BACKHED, F; SO, A; FARESE, R; WANG, J. 2009. Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4/FIAF) is a direct glucocorticoid receptor target and participates in glucocorticoid-regulated triglyceride metabolism. *J. Biol. Chem.* 284: 25593–25601.

LALL, S; DAN, G. 1999. Role of corticosteroids in cadmium induced immunotoxicity. *Drug Chem. Toxicol.* 22: 401-409.

LILLYCROP, K; PHILLIPS, E; JACKSON, A; HANSON, M; BURDGE, G. 2005. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J. Nutr.* 135:1382-1386.

LILLYCROP, K; SLATER-JEFFERIES, J; HANSON, M; GODFREY, K; JACKSON, A; BURDGE, G. 2007. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggest that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br. J. Nutr.* 97: 1064-1073.

LIU, L; LI, A; MATTHEWS, S. 2001. Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: 729–739.

LIU, Y; NAKAGAWA, Y; WANG, Y; SAKURAI, R; TRIPATHI, P; LUTFY, K; FRIEDMAN, T. 2005. Increased glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice. *Diabetes* 54: 32–40.

LONG, G. 1997. Cadmium perturbs calcium homeostasis in rat osteosarcoma ((ROS 17/2.8) cells: a possible role for protein kinase C. *Toxicol. Lett.* 91: 91-97.

LOOSE, D; CAMERON, D; SHORT, H; HANSON, R. 1985. Thyroid hormone regulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat liver. *Biochem.* 24:4509–4512.

MALKOSKI, S; DORIN, R. 1999. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol. Endocrinol.* 13:1629–1644.

MANDARD, S; MÜLLER, M; KERSTEN, S. 2004. Peroxisome proliferator receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life. Sci.* 61:393-416.

MC EWEN, B. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 87: 873–904.

MIYAZAWA, S; HAYASHI, H; HIJIKATA, M; ISHII, N; FURUTA, S; KAGAMIYAMA, H; OSUMI, T; HASHIMOTO, T. 1987. Complete nucleotide sequence of cDNA and predicted amino acid sequence of rat acyl-CoA oxidase. *J. Biochem.* 262:8131–8137.

MITAMURA, T. 1987. Glucocorticoid-induced elevation of serum highdensity lipoprotein-cholesterol and its reversal by adrenocorticotrophin in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 917:121-130.

MOMMSEN, T; VIJAYAN, M; MOON, T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 9: 211–268.

MORSELT, A. 1991. Environmental pollutants and diseases. A cell biological approach using chronic cadmium exposure in the animal model as a paradigm case. *Toxicol.* 70: 1–132.

MUELLER, B; BALE, T. 2008. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress in pregnancy. *J. Neurosci.* 28: 9055-9056.

MUNCK, A; MENDEL, D; SMITH, L; ORTI, E. 1990. Glucocorticoid receptors and actions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:2-10.

MUNCK, A; NARAY-FEJES-TOTH, A. 1994. Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 746: 115–30; discussion 131–133.

NASHEL, D. 1986. Is atherosclerosis a complication of long-term corticosteroid treatment? *Am. J. Med.* 80:925–929.

NIEDHAMMER, I; SAUREL-CUBIZOLLES, M; PICIOTTI, M; BONENFANT, S. 2000. How is sex considered in recent epidemiological publications on occupational risks? *Occup. Environ. Med.* 57: 521–527.

NORDBERG, G; NOGAWA, K; NORDBERG, M; FRIBERG, L. 2007. Cadmium. **In:** *Handbook on toxicology of metals.* 3^o Edición. Editorial Academic Press. New York, USA. p. 65-78.

NYIRENDA, M; LINDSAY, R; KENYON, C; SECKL, J. 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J. Clin. Invest.* 101: 2174-2181.

OPHERK, C; TRONCHE, F; KELLENDONK, C; KOHLMULLER, D; SCHULZE, A; SCHMID, W; SCHUTZ, G. 2004. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes

leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol. Endocrinol.* 18: 1346–1353.

OSKARSSON, A; WIDELL, A; OLSSON, I; PETERSSON, K. 2004. Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. *BioMetals* 17: 531–534.

OZANNE, S; SMITH, G; TIKERPAE, J; HALES, C. 1996. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am. J. Physiol.* 270: 559–564.

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

POULOS, A; SHARP, P; JOHNSON, D. 1989. Plasma polyenoic very-long-chain fatty acids in peroxisomal disease: biochemical discrimination of Zellweger's syndrome from other phenotypes. *Neurology* 39: 44–47.

ROBERTS, D; DALZIEL, S. 2006. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 3: CD004454.

RONCO, A; URRUTIA, M; MONTENEGRO, M; LLANOS, M. 2009. Cadmium exposure during pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids. *Toxicol. Lett.* 188: 186-191.

RONDO, P; FERREIRA, R; NOGUEIRA, F; RIBEIRO, M; LOBERT, H; ARTES, R. 2003. Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57: 266–272.

ROSE, A; VEGIOPOULOS, A; HERZIG, S. 2010. Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: Insights from genetic manipulations. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jsbmb.2010.02.010.

SECKL, J. 2004. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *European Journal of Endocrinology* 164: 49-62.

SECKL, J; HOLMES, M. 2007. Mechanism of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal “programming” of adult pathophysiology. *Nature Reviews Endocrinology* 3: 479–488.

SHE, P; SHIOTA, M; SHELTON, K; CHALKLEY, R; POSTIC, C; MAGNUSON, M. 2000. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 20:6508–6517.

STAELS, B; VAN TOL, A, CHAN, L; VERHOEVEN, G; AUWERX, J. 1991. Variable Effects of Different Corticosteroids on Plasma Lipids, Apolipoproteins, and Hepatic Apolipoprotein mRNA Levels in Rats. *Arterioscler. Thromb.* 11:760-769.

UTTER, M; KOLENBRANDER, H. 1972. Formation of Oxalacetate by CO₂ Fixation on Phosphoenolpyruvate. **In:** *The enzymes*. Editorial Academic Press INC. New York, USA. pp. 117-168.

VAHTER, M; BERGLUND, M; AKESSON, A; LIDÉN, C. 2002. Metals and women’s health. *Environ. Res.* 88: 145-155.

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.

VALERA, A; PUJOL, A; PELEGRIN, M; BOSCH, F. 1994. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9151–9154.

VAN DEN BERGHE, G. 1996. Disorders of gluconeogenesis, *J. Inher. Metab. Dis.* 19: 470-477.

VEGIOPOULOS, A; HERZIG, S. 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275: 43–61.

VELAZCO, A. 1992. *Compendio de farmacología aplicada y terapéutica clínica*. Editorial Prous. Barcelona, España. 510p.

VIJAYAN, M; RAPTIS, S; SATHIYAA, R. 2003. Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 256–263.

WYRWOLL, C; MARK, P; WADDELL, J. 2007. Developmental programming of renal glucocorticoid sensitivity and the renin-angiotensin system. *Hypertension* 50: 579-584.

ZHOU, J; CIDLOWSKI, J. 2005. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70:407–417.

ZIMMERMAN, J; FAINARU, M; EISENBERG, S. 1984. The effects of prednisone therapy on plasma lipoproteins and apolipoproteins: a prospective study. *Metab.* 33:521–526.

ANEXO:

Carta del comité de Bioética animal INTA.



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