

Tesis Doctoral

# El cadmio como disruptor endocrino. Estudios de la exposición al cadmio sobre la adenohipófisis de rata

Miler, Eliana Andrea

2012

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

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

Cita tipo APA:

Miler, Eliana Andrea. (2012). El cadmio como disruptor endocrino. Estudios de la exposición al cadmio sobre la adenohipófisis de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Miler, Eliana Andrea. "El cadmio como disruptor endocrino. Estudios de la exposición al cadmio sobre la adenohipófisis de rata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Química Biológica**

**El cadmio como disruptor endocrino**  
**Estudios de la exposición al cadmio sobre la**  
**adenohipófisis de rata**

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

**Lic. Eliana Andrea Miler**

**Directora de Tesis: Dra. Beatriz Haydeé Duvilanski.**

**Consejera de estudios: Dra. María del Carmen Ríos de Molina.**

**Lugar de Trabajo:** Cátedra de Química Biológica Patológica. Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012

# El cadmio como disruptor endocrino

## Estudios de la exposición al cadmio sobre la adenohipófisis de rata

### *Resumen*

#### *Introducción:*

El cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) es un contaminante ambiental que produce numerosos efectos tóxicos en los organismos. Este metal puede actuar como un disruptor endocrino en diferentes tejidos. La adenohipófisis es la glándula directriz y presenta una alta sensibilidad al  $\text{Cd}^{2+}$ .

#### *Objetivos:*

- 1) Investigar posibles formas de tratamiento que reviertan los efectos inducidos por la exposición crónica al  $\text{Cd}^{2+}$  en la adenohipófisis de rata *in vivo*.
- 2) Investigar el papel xenoestrogénico del  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel adenohipofisario.

#### *Resultados:*

1) La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  *in vivo* induce estrés oxidativo y disminuye los niveles séricos de prolactina (PRL) y de hormona luteinizante (LH). La melatonina, administrada *a posteriori* de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , revierte los efectos del metal sobre la expresión de la hemo-oxigenasa-1, mientras que tiene un efecto *per se* sobre la expresión de la metalotioneína-1 y de la óxido nítrico sintasa 1. El cese de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , en cambio, revierte totalmente los efectos del metal sobre los marcadores de estrés oxidativo y sobre los niveles séricos de PRL y LH.

2) El  $\text{Cd}^{2+}$ , en concentraciones nanomolares, es capaz de inducir la proliferación celular y la secreción de PRL en las células adenohipofisarias. Ambos efectos son mediados por el receptor de estrógenos alfa ( $\text{RE}\alpha$ ). Este metal también regula la expresión proteica del  $\text{RE}\alpha$  y de sus variantes truncadas. El  $\text{Cd}^{2+}$  y el estradiol muestran un efecto cooperativo sobre la expresión del mensajero del  $\text{RE}\alpha$  y del de PRL.

*Conclusión:*

**El  $\text{Cd}^{2+}$  es un disruptor endocrino que inhibe o estimula la secreción hormonal adenohipofisaria, efecto que depende del mecanismo involucrado: generación de estrés oxidativo o efecto xenoestrogénico.**

**Palabras claves:**

Cadmio, adenohipófisis, estrés oxidativo, melatonina, disruptor endocrino, xenoestrógeno, prolactina, receptor de estrógenos alfa.

# Cadmium as an endocrine disruptor

## Studies of cadmium exposure in the rat anterior pituitary gland

### ***Abstract***

#### *Introduction:*

Cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) is an environmental contaminant that produces many toxic effects on organisms. This metal can act as an endocrine disruptor in different tissues. The anterior pituitary gland is the directive gland and presents high sensitivity to  $\text{Cd}^{2+}$ .

#### *Objectives:*

- 1) To investigate possible forms of treatments those reverse the effects induced by  $\text{Cd}^{2+}$  chronic exposure in the rat anterior pituitary gland *in vivo*.
- 2) To investigate  $\text{Cd}^{2+}$  xenoestrogenic role at anterior pituitary level.

#### *Results:*

1)  $\text{Cd}^{2+}$  exposure *in vivo* induces oxidative stress and decreases prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH) serum levels. Melatonin, administered *a posteriori* of  $\text{Cd}^{2+}$  exposure, reverses metal effects on heme oxygenase-1 expression, while having a *per se* effect on metallothionein-1 and nitric oxide synthase 1 expression. Suspension of  $\text{Cd}^{2+}$  exposure, instead, completely reverses metal effects on oxidative stress markers and serum levels of PRL and LH.

2) Cd<sup>2+</sup>, in nanomolar concentrations, is able to induce cellular proliferation and PRL secretion in anterior pituitary gland cells. Both effects are mediated by the estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). The metal also regulates protein expression of ER $\alpha$  and its truncated variants. Cd<sup>2+</sup> and estradiol show a cooperative effect on ER $\alpha$  and PRL mRNA expression.

*Conclusion:*

**Cd<sup>2+</sup> is an endocrine disruptor that inhibits or stimulates anterior pituitary gland hormonal secretion and its action depends on the involved mechanism: oxidative stress generation or xenoestrogenic effect.**

**Key words:**

Cadmium, anterior pituitary gland, oxidative stress, melatonin, endocrine disruptor, xenoestrogen, prolactin, estrogen receptor alpha.

## ***Agradecimientos:***

*A Beatriz por brindarme un espacio en su grupo de investigación, por compartir y enseñarme sus amplios conocimientos científicos y por ayudarme a llegar finalmente a este momento.*

*A TODOS y CADA UNO de mis compañeros de la cátedra de Química Biológica Patológica que de una u otra forma han colaborado conmigo y con los que compartí lindos momentos durante el doctorado. En especial les quiero agradecer a mis AMIGAS Fer, Vani y Flor con quienes siempre pude contar!!!!.*

*A los Doctores Stella Campo, Ma. del Carmen Ríos de Molina, Liliana Guerra, Graciela Díaz-Torga y Juan Carlos Calvo por sus enseñanzas, consejos y siempre buena predisposición.*

*A la Universidad de Buenos Aires y a la Escuela Técnica ORT por mi formación académica.*

*A los organismos y fundaciones (UBA, CONICET, ANPCYT, HARRISON) que me beneficiaron con diferentes becas para que pueda llevar adelante el doctorado.*

*A mis profesores del colegio y de la facultad que han sido y son un EJEMPLO a seguir para mí y en especial por su calidad humana.*

*A Ema por su colaboración y cuidar de Iara.*

*A mis AMIGOS de la VIDA: Matilde, Miri y Seba. Gracias por ESTAR SIEMPRE.*

*A mi hermana Melisa. Maunly: Gracias por tu APOYO INCONDICIONAL y por tu toque de humor ácido de cada día!!!. También a mi "cuña" favorito Gaby!!!.*

*A Daniel. Gracias por tu ayuda durante todos estos años. Por ESCUCHARME, ACOMPANARME y ACONSEJARME SIEMPRE.*

*A mis papás. Sin Uds. la realización de esta Tesis hubiera sido imposible. Gracias por su ESFUERZO, PACIENCIA, por BANCARME y ESTAR SIEMPRE.*

*A mi SOL Iara. Mi AMOR: sos lo más HERMOSO que tengo en la vida!!!!!!.*



A Iara

# *Índice*

1. Introducción	Pág. 1
2. Objetivos	Pág. 33
3. Materiales & Métodos	Pág. 34
4. Estudio de posibles tratamientos que reviertan los efectos del Cd <sup>2+</sup> a nivel adenohipofisario	Pág. 54
4.1. Objetivo	Pág. 54
4.2. Resultados	Pág. 55
4.3. Discusión	Pág. 71
5. Papel xenoestrogénico del Cd <sup>2+</sup> a nivel adenohipofisario	Pág. 78
5.1. Objetivo	Pág. 78
5.2. Resultados	Pág. 79
5.3. Discusión	Pág. 112
6. Conclusión	Pág. 121
7. Referencias	Pág. 123
Apéndice: Abreviaturas	Pág. 140

# ***1. Introducción***

## ***El Cadmio***

### ***Generalidades***

El cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) forma parte de la familia de metales pesados que existen como componentes naturales de la corteza terrestre. Este metal está ampliamente disperso en todo el ecosistema y se encuentra a menudo combinado con otros elementos, como el cinc, el plomo y el cobre.

El  $\text{Cd}^{2+}$ , debido a sus propiedades altamente tóxicas, es un contaminante ambiental que produce numerosos efectos adversos sobre los organismos, aún en concentraciones muy pequeñas (Satarug y col., 2003).

### ***Fuentes de liberación de $\text{Cd}^{2+}$ al ambiente***

La mayor fuente natural de liberación de  $\text{Cd}^{2+}$  a la atmósfera es la actividad volcánica. Otras fuentes naturales son la erosión de las rocas y los incendios forestales. Sin embargo, actualmente, gran parte del  $\text{Cd}^{2+}$  liberado al ambiente proviene de diferentes actividades humanas (Thornton, 1992).

El uso de  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel industrial se ha expandido notablemente a partir de la mitad del siglo pasado y su eliminación se ha convertido en un serio problema ambiental. El  $\text{Cd}^{2+}$  es utilizado en la elaboración de algunos plaguicidas y fertilizantes, en la galvanoplastia, en la fabricación de pilas y baterías, en la estabilización de algunos plásticos y en la industria minera (Goering y col., 1995; Satarug y col., 2003). Otras importantes fuentes de descarga de  $\text{Cd}^{2+}$  al ambiente son la quema de combustibles fósiles (como el carbón o el petróleo) y la incineración de la basura doméstica común.

Como consecuencia de todos estos procesos antropogénicos, ya sean de manufacturación o de descarte, ha aumentado muchísimo el nivel de  $\text{Cd}^{2+}$  en el medio ambiente.

### ***Vías de intoxicación por $\text{Cd}^{2+}$***

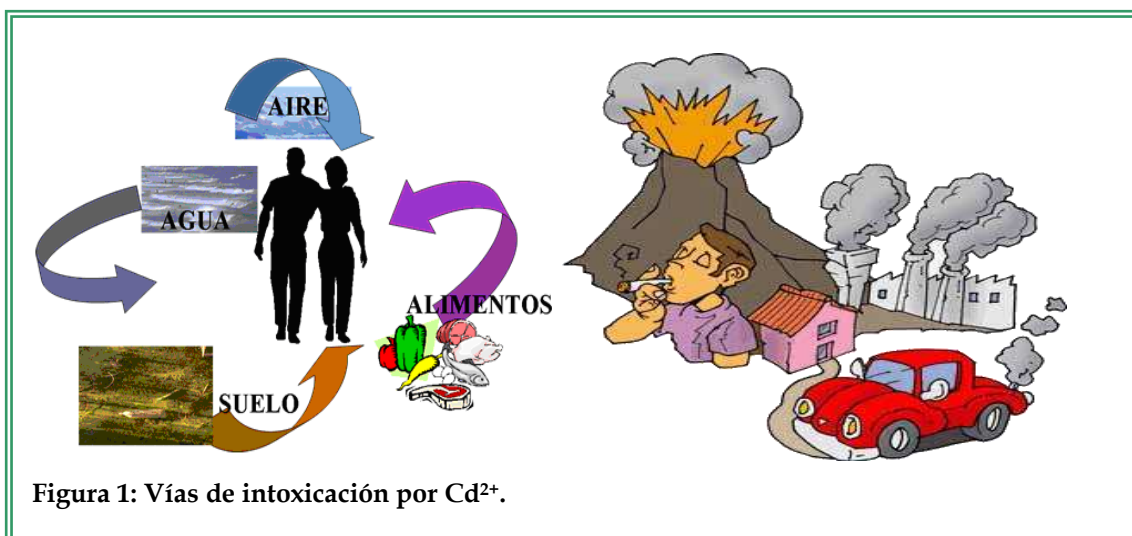
La intoxicación por  $\text{Cd}^{2+}$  es causada principalmente como consecuencia de la exposición ocupacional y/o a través del consumo de agua o de alimentos contaminados.

El agua contaminada puede provenir de diferentes fuentes. Puede tener un origen natural como consecuencia de la erosión de las rocas o antropogénico por contacto con desechos químicos, plaguicidas o fertilizantes o también por su viaje a través de las tuberías (que muchas veces están soldadas con materiales que lo contienen).

Ciertas plantas y animales acumulan  $\text{Cd}^{2+}$  pero son relativamente resistentes a sus efectos tóxicos y, al formar parte de la dieta alimenticia, pueden ser los causantes de la intoxicación con este metal. La aplicación de abonos como ciertos fertilizantes químicos o el excremento de animales pueden aumentar los niveles de  $\text{Cd}^{2+}$  de los cultivos agrícolas. También los peces y los moluscos son capaces de acumular  $\text{Cd}^{2+}$  luego de la ingesta de plancton o de agua contaminada (Rayment, 1995; Ling y col., 2011). Además, hay que considerar que muchos de estos animales y plantas son consumidos en períodos tempranos de su vida, antes de puedan manifestar algún efecto tóxico inducido por el metal. De esta manera, la cadena de transferencia transcurre desde el suelo y el agua a las plantas y los animales y de éstos a los humanos (Figura 1) (Satarug y col., 2003).

Los individuos que trabajan en las industrias en las que se manufacturan productos que contienen  $\text{Cd}^{2+}$ , sufren la intoxicación no solo por el consumo de agua o alimentos contaminados, sino también a través de la inhalación del humo o del polvo en su lugar de trabajo (intoxicación ocupacional) (Miura, 2009).

La inhalación del humo del tabaco es otra importante fuente de intoxicación por  $\text{Cd}^{2+}$  (Koller, 1998). Se sabe que la planta de tabaco acumula  $\text{Cd}^{2+}$  del suelo y que puede alcanzar una concentración de entre 0,5 y 5 ppm (Scherer y Barkemeyer, 1983; Chaney y col., 1999). El óxido de cadmio formado durante la combustión del cigarrillo es altamente absorbible por el organismo y aproximadamente el 50% del metal inhalado ingresa a circulación. Se ha detectado hasta 5 veces más  $\text{Cd}^{2+}$  en los órganos de los fumadores que en los de los no fumadores (Figura 1) (Benedetti y col., 1999; Satarug y col., 2003).



La capacidad de ciertas plantas de acumular  $\text{Cd}^{2+}$  del suelo y ser relativamente resistentes a sus efectos tóxicos (De Figueiredo, 1965) está siendo aprovechada para la fitoremediación de suelos contaminados (Liu y col., 2012; Shukla y col., 2012).

## ***Entrada de Cd<sup>2+</sup> al organismo***

La vida media del Cd<sup>2+</sup> en el cuerpo humano es de aproximadamente 15 a 30 años (Sugita and Tsuchiya, 1995; Henson y Anderson, 2000). El Cd<sup>2+</sup> entra al torrente sanguíneo por absorción a nivel del estómago o del intestino luego de la ingesta de agua o comida contaminada o por absorción a nivel de los pulmones después de la inhalación. Usualmente llega a la sangre alrededor del 1 al 5% del Cd<sup>2+</sup> que es ingerido por la boca, mientras que, como se mencionó más arriba, se absorbe alrededor del 30 al 50% del que es inhalado. Cuando la cantidad de Cd<sup>2+</sup> ingerida es pequeña, la mayor parte queda retenida en la mucosa intestinal, principalmente unido a las metalotioneínas (MTs) y es eliminado con la descamación del epitelio. Cuando la dosis oral de Cd<sup>2+</sup> es elevada o baja pero crónica, el metal libre atraviesa la mucosa, pasa a la circulación sanguínea y se almacena en diferentes tejidos. Las MTs son una familia de proteínas ricas en cisteína (Cys) que participan en el ingreso, transporte y regulación del cinc en los sistemas biológicos. La unión del Cd<sup>2+</sup> a las MTs es la responsable de su casi despreciable tasa de excreción y de la acumulación del metal en los tejidos (Klaassen y col., 2009). Debido al alto contenido en MTs (Klaassen y col., 2009), la acumulación de Cd<sup>2+</sup> se produce predominantemente en el hígado, el riñón (Varga y col., 1993; Bhattacharyya y col., 2000; Henson y Anderson, 2000; Jarup y col., 2000) y en los órganos reproductivos (Varga y col., 1993; Paksy y col., 1997; Zadorozhnaja y col., 2000; Fiala y col., 2001; Piasek y col., 2001)

El Cd<sup>2+</sup> ingresa a la célula fundamentalmente a través de los transportadores de calcio (Himeno y col., 2002). Dentro de la célula la mayor parte se almacena en el citosol (70%), en menor grado en el núcleo (15%) y el resto se distribuye entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático (Casalino y col., 1997).

## *Cd<sup>2+</sup> y salud*

Las consecuencias de la exposición al Cd<sup>2+</sup> por períodos prolongados se manifiestan sobre el desarrollo y funcionalidad de diversos órganos y sistemas, produciendo alteraciones neurológicas, reproductivas, endocrinas, inmunológicas, así como en el desarrollo de diferentes tumores.

Una de las primeras descripciones de enfermedades causadas por intoxicación con Cd<sup>2+</sup> a nivel poblacional se conoce como enfermedad “itai-itai” (“ay-ay” en japonés) por los gritos de dolor que emitían los afectados en la región del río Jinzu (Japón) en la década de 1950 (Jarup y col., 1998). Este se caracteriza por la presencia de osteomalacia, osteoporosis y múltiples disfunciones renales asociadas a dolor severo. La enfermedad era causada por la ingesta de arroz cosechado en zonas altamente contaminadas con el metal (Nogawa y col., 2004). El estudio de individuos con intoxicación ocupacional ha permitido conocer las razones de la sintomatología de esta enfermedad y su caracterización.

La exposición al Cd<sup>2+</sup> ha sido asociada con un aumento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer (Koller, 1998; Waalkes y col., 1999; Satoh y col., 2002). Este metal ha sido clasificado como un carcinógeno humano de tipo I por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) y por el Programa Nacional de Toxicología, basándose en estudios epidemiológicos y en investigaciones con animales de laboratorio (International Agency for Research on Cancer, 1993; Huff y col., 2007). La inhalación de Cd<sup>2+</sup> durante largos períodos, es una de las causas condicionantes para el desarrollo de cáncer de pulmón (Waalkes y col., 1999; Waisberg y col., 2003; Mosavi-Jarrahi y col., 2009; Beveridge y col., 2010), hecho que se ha observado en el caso de muchos de los fumadores. Además, el Cd<sup>2+</sup> parece tener un papel determinante como inductor de cáncer en tejidos hormono-dependientes tales como mama y próstata (García-Morales y col., 1994; Antila y col., 1996; Martin y col., 2003; Siewit y col., 2010).

La Organización Mundial de la Salud, teniendo en cuenta el alto grado de toxicidad de este metal, ha establecido que el límite máximo diario para la ingesta de  $\text{Cd}^{2+}$  es de 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  día (Satarug y col., 2003). Este valor de referencia fue obtenido de estudios de toxicidad del  $\text{Cd}^{2+}$  realizados en el hígado y el riñón, dos de los tejidos donde se produce la mayor acumulación de este metal. Sin embargo, con el tiempo se han ido recolectando evidencias que indican que la exposición crónica a bajas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  puede causar alteraciones neurológicas (Viaene y col., 2000; Leret y col., 2003) y endocrinas (Lafuente y col., 2001; Lafuente y col., 2003) aún cuando no haya daño renal o hepático detectable. En este sentido, nuestro grupo demostró mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, que la adenohipófisis es más sensible que el hígado al estrés oxidativo inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$  (Poliandri y col., 2003; Poliandri y col., 2006b). Estos resultados muestran la existencia de una diferente sensibilidad de los tejidos al  $\text{Cd}^{2+}$  y pueden ser útiles para modificar el límite de la concentración aceptada actualmente como tolerable y que en realidad es dañina para el individuo.

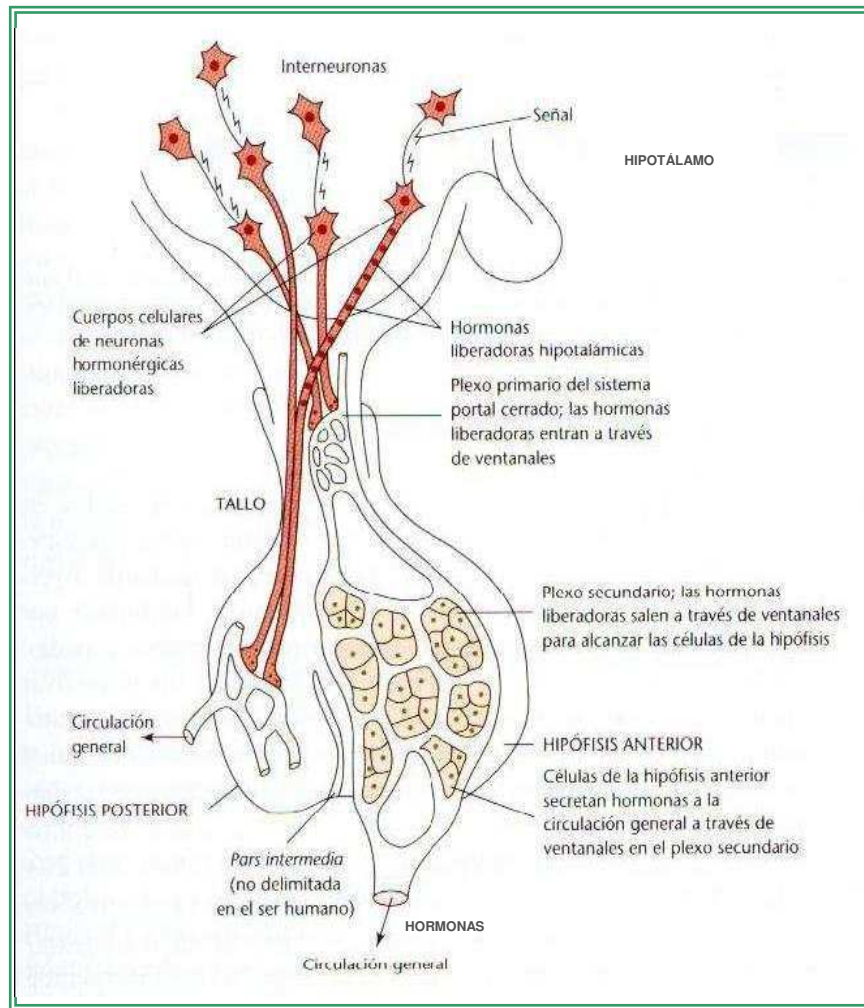


## *El eje hipotálamo-hipofisario*

El eje hipotálamo hipofisario juega un rol fundamental controlando la homeostasis del organismo. Esta unidad regula funciones fisiológicas básicas como el crecimiento, la reproducción y el metabolismo, así como también la adaptación a cambios del medio externo y al estrés.

El hipotálamo es una estructura nerviosa situada en la base del encéfalo que procede del diencéfalo primitivo. Es el sitio de la regulación neuroendocrina, autonómica y homeostática ya que actúa como un centro integrador que coordina mensajes del entorno, ritmos, patrones de desarrollo endógenos y señales corporales para evocar respuestas autonómicas y endocrinas.

La hipófisis es la glándula endocrina directriz. Se localiza en la región ventral del cerebro, la denominada "silla turca" del hueso esfenoides y se encuentra, aunque externa al cerebro, en íntima relación con el hipotálamo a través de la eminencia media y el tallo pituitario (Page y col., 1994). Está compuesta por la hipófisis anterior o adenohipófisis y la hipófisis posterior o neurohipófisis (Figura 2). El origen de la hipófisis es ectodérmico y surge de una invaginación del estomodeo (cavidad oral primitiva) que se pone en contacto con una evaginación del piso del diencéfalo. El techo del estomodeo forma la bolsa de Rathke y se convierte en la adenohipófisis, mientras que el piso del diencéfalo dará origen a la neurohipófisis.



**Figura 2: Conexión hipotálamo-hipófisis.** La hipófisis, constituida por la adenohipófisis (hipófisis anterior) y la neurohipófisis (hipófisis posterior), está conectada con el hipotálamo a través de la eminencia media y el tallo pituitario.

La neurohipófisis está formada por la *pars nervosa*, el tallo pituitario y la eminencia media y constituida principalmente por terminales nerviosos. Las hormonas neurohipofisarias oxitocina y vasopresina son sintetizadas por las células neurosecretoras de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, transportadas por sus axones hacia la neurohipófisis (donde son almacenadas en los terminales nerviosos) y finalmente liberadas a circulación en respuesta a diferentes estímulos.

La adenohipófisis es principalmente glandular y se la puede dividir en tres regiones: la *pars distalis*, la *pars intermedia* (ausente en aves y algunos

mamíferos) y la *pars tuberalis*. La glándula presenta una composición celular heterogénea con cinco tipos de células secretoras y un tipo no secretor.

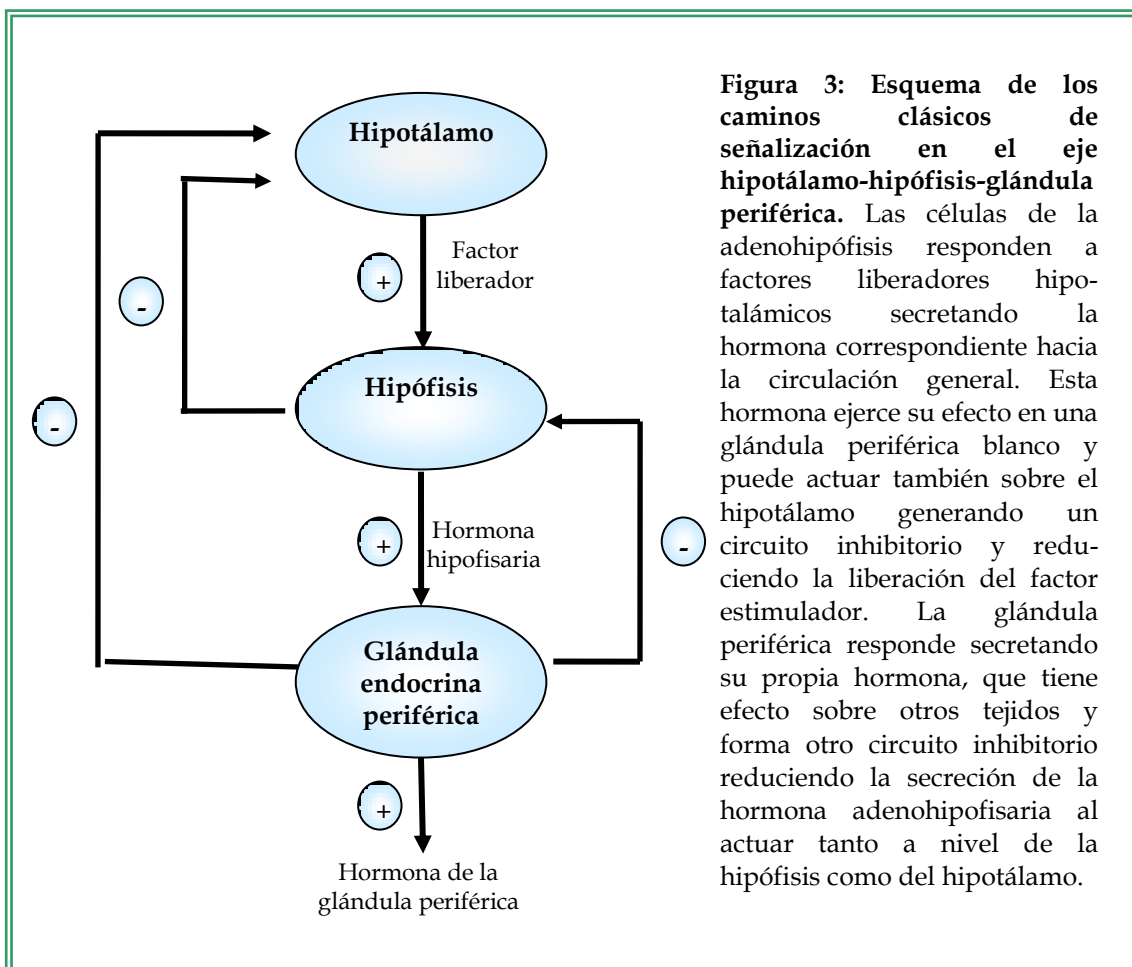
Las células secretoras son: los corticotropos, productoras de adrenocorticotrofina (ACTH), los tirotropos, de hormona estimulante de la tiroides (TSH), los somatotropos, de hormona de crecimiento (GH), los lactotropos, de prolactina (PRL) y los gonadotropos, de hormona folículo estimulante (FSH) y de hormona luteinizante (LH). Estas hormonas actúan regulando el funcionamiento de las glándulas periféricas (tiroides, gónadas, corteza adrenal) y/o sobre los tejidos blancos. Las células secretoras se encuentran en diferentes proporciones que dependen del sexo, de la edad y del estado fisiológico del individuo. En ratas hembras, alrededor de un 40-50% de la adenohipófisis está compuesta por lactotropos (Chen, 1987), aproximadamente un 20% por somatotropos (Dada y col., 1984), un 5-10% por gonadotropos (Dada y col., 1983), un 3% por corticotropos y un 3% por tirotropos (Dada y col., 1984). En machos estas proporciones se modifican ligeramente, siendo algo mayor la de somatotropos (Dada y col., 1984).

Las células folículo estrelladas constituyen el tipo celular no secretor, las cuales mantienen uniones comunicantes con las células secretoras (Page, 1994). Este tipo celular es inmunoreactivo para la proteína S100 (Nakajima y col., 1980) lo que sugiere una relación con las células gliales y además comparte algunas características con las células fagocíticas mononucleares (Vankelecom y col., 1992).

## *Regulación de la secreción hormonal adenohipofisaria*

El control hipotalámico de la secreción hormonal de la neurohipófisis es principalmente nervioso, mientras que la regulación hipotalámica de la secreción de hormonas de la adenohipófisis es endocrina.

El hipotálamo es la fuente de neurohormonas y neurotransmisores que, una vez secretados a nivel de la eminencia media a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria, controlan la síntesis y liberación hormonal de las células adenohipofisarias. Las distintas hormonas adenohipofisarias regulan, a su vez, el funcionamiento de tejidos y glándulas periféricas. Asimismo, la adenohipófisis y el hipotálamo son controlados por las hormonas de los órganos blancos a través mecanismos de retroalimentación (Figura 3).



Además del control hipotalámico y de la regulación ejercida por las hormonas periféricas, las células adenohipofisarias pueden ser fuentes de señales que intervienen en el control intrahipofisario mediante mecanismos autocrinos, paracrinos y/o yuxtacrinos. Existen numerosas moléculas sintetizadas localmente involucradas en dicha regulación tales como péptidos (galanina, péptido intestinal vasoactivo, endotelinas), factores de crecimiento, citoquinas, hormonas (folistatina, activina, inhibina), óxido nítrico (NO), entre otras (Denef, 2008).

El hipotálamo produce factores liberadores e inhibidores específicos para cada uno de los tipos celulares endocrinos que integran la adenohipófisis. De los cinco tipos de células endocrinas de la adenohipófisis, cuatro de ellos responden a factores liberadores los cuales actúan como secretagogos y también como factores tróficos (Gershengorn y col. 1986; Conn y col., 1987; Turnbull y col., 1997; Mayo y col., 2000). Los lactotrofos son el único tipo celular adenohipofisario que no posee un factor liberador hipotalámico específico que se comporte como estimulador de la secreción de PRL y a la vez como factor trófico (Freeman y col., 2000).

### ***Regulación de la secreción de PRL***

Los lactotrofos son las únicas células de la adenohipófisis que mantienen una secreción basal espontánea y tónica de la hormona. Por consiguiente, la liberación de los factores hipotalámicos inhibitorios es fundamental para la regulación de la secreción de PRL. La dopamina es el principal factor hipotalámico que inhibe la secreción de esta hormona (Ben-Jonathan, 1980). Le siguen, con diferente potencia inhibitoria diversos factores tanto hipotalámicos como intrahipofisarios tales como el ácido gamma aminobutírico (GABA), la serotonina, la acetilcolina, la somatostatina, el NO y la propia PRL (Racagni y col., 1979; Matsushita y col., 1983; Duvilanski y col., 1985; Freeman y col., 2000).

Se ha descrito una gran variedad de factores que estimulan la secreción de PRL actuando directamente sobre las células adenohipofisarias. Éstos

pueden ser de origen hipotalámico, hipofisario o de los tejidos periféricos. Algunos de los más estudiados son: los estrógenos, la hormona liberadora de TSH (TRH), la oxitocina y el péptido intestinal vasoactivo (Lasaga y col., 1989; Freeman y col., 2000; Samson y col., 2003). De todos ellos los estrógenos son los reguladores claves de la secreción de PRL dado que además de estimular su secreción, regulan la proliferación de los lactotrofos (Freeman y col., 2000).

## ***Efectos del Cd<sup>2+</sup> a nivel celular***

Estudios recientes muestran que el Cd<sup>2+</sup> presenta efectos que van desde la estimulación de la proliferación a la muerte celular y que éstos dependen de la concentración del metal a la que han sido expuestas las células. A concentraciones del orden nanomolar el Cd<sup>2+</sup> induce la proliferación celular, mientras que a concentraciones mayores actúa como un agente citotóxico (Jiang y col., 2009; Hao y col., 2011). Estos efectos han sido observados, por ejemplo, en células fibroblásticas de pulmón de embrión humano (Jiang y col., 2009).

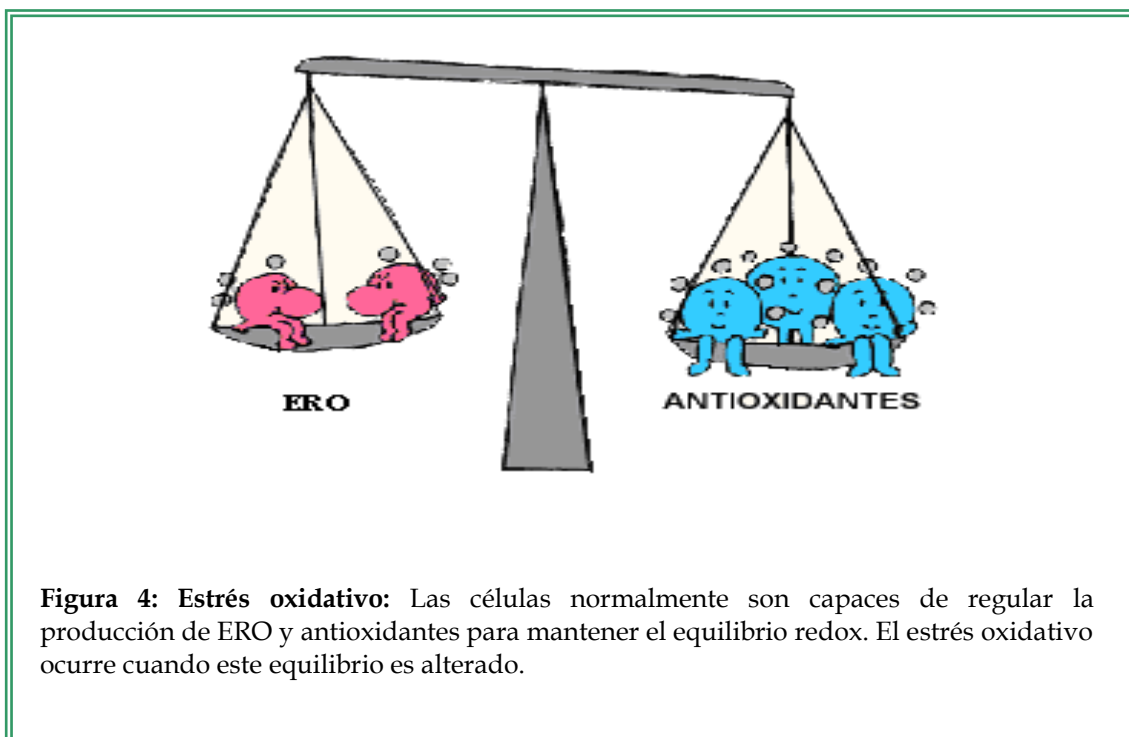
### ***1) El Cd<sup>2+</sup> como efector citotóxico***

Diversos estudios proponen a la apoptosis como el proceso dominante que participa en el efecto citotóxico inducido por el Cd<sup>2+</sup> (Hamada y col., 1997; Shih y col., 2004; Lasfer y col., 2008), en cambio, otros autores le dan mayor preponderancia a la necrosis (Sancho y col., 2006; Brama y col., 2011).

La generación de estrés oxidativo es uno de los mecanismos más aceptados que explican el efecto citotóxico del Cd<sup>2+</sup> (López y col., 2006; Ognjanović y col., 2008; Cuypers y col., 2010) y ambos tipos de muerte celular, apoptosis y necrosis, pueden ser desencadenados por este mecanismo (Fleury y col., 2002).

### ***El Cd<sup>2+</sup> como inductor de estrés oxidativo***

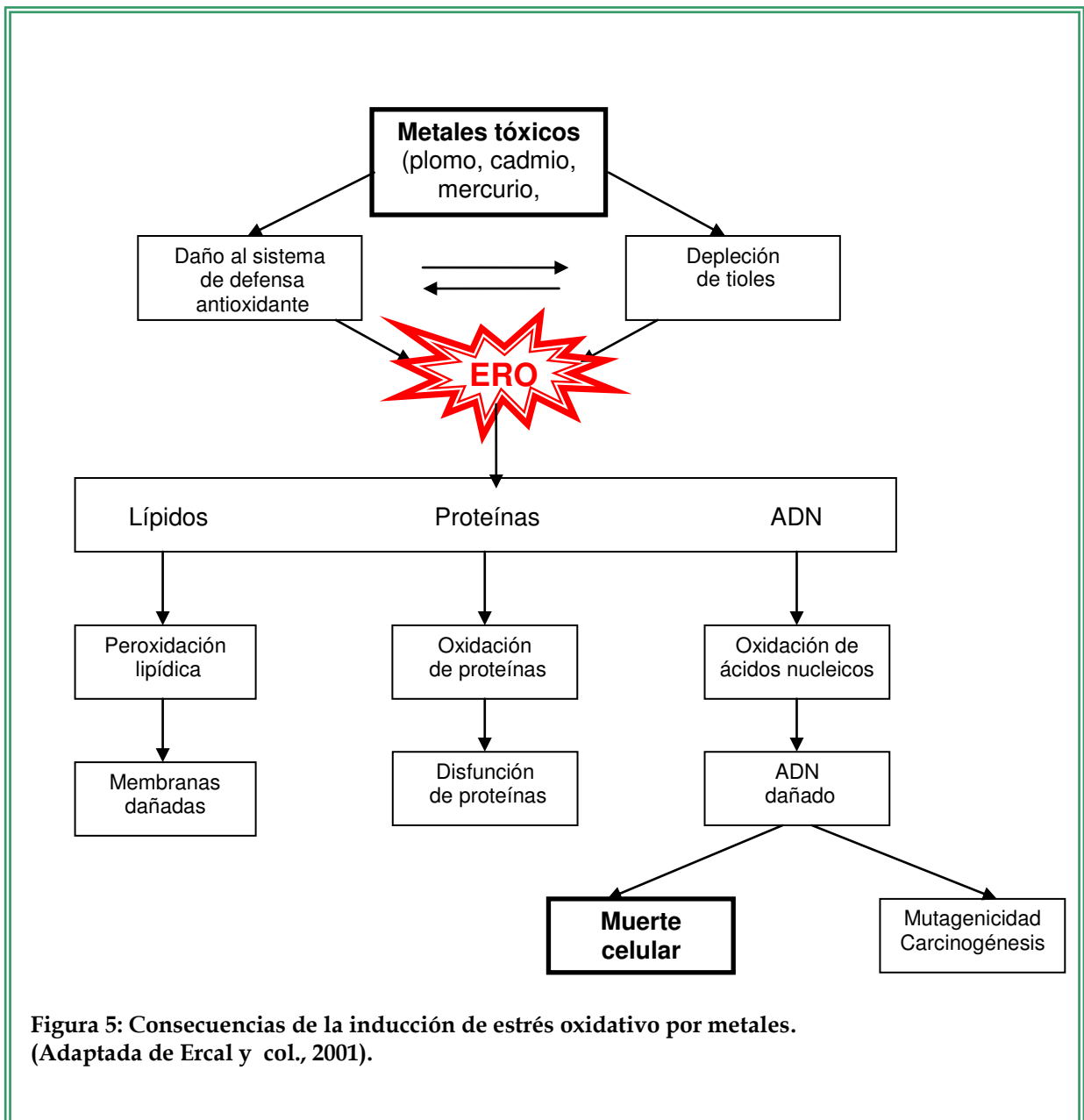
El estrés oxidativo es el resultado de una alteración del equilibrio óxido-reducción de la célula en el cual está afectado el balance entre los elementos oxidantes y antioxidantes (Figura 4). El desbalance entre ambos elementos, ya sea por una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o de una deficiencia en los mecanismos antioxidantes, lleva al daño celular (Scandalios, 2005).



Las ERO son moléculas altamente reactivas derivadas del oxígeno. Las más importantes son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un papel muy significativo en la señalización celular.

Se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$ , al igual que otros metales, genera estrés oxidativo en distintos tejidos, lo cual resulta en el deterioro de los lípidos, las proteínas y el ADN y de esta forma es capaz de iniciar diversas patologías tanto en plantas como en animales (Figura 5) (Waisberg y col., 2003; López y col., 2006; Poliandri y col., 2006; Ognjanović y col., 2008; Cuyper y col., 2010; Miler y col., 2010; Cherif y col., 2011; Zilli y col., 2011).





El  $\text{Cd}^{2+}$  al no ser un metal redox activo, no produce ERO a través de reacciones de tipo Fenton (reacciones que generan radical hidroxilo cuando un metal redox activo reacciona con el peróxido de hidrógeno). Sin embargo, puede indirectamente aumentar los niveles de ERO y causar estrés oxidativo a través de otros mecanismos (Stohs y Bagchi, 1995):

*-Reemplazo de metales con actividad redox*

Se ha observado que el  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta la concentración de metales libres con actividad redox como el hierro o el cobre posiblemente reemplazando su lugar en algunas proteínas como por ejemplo ferritina (hierro) y ceruloplasmina (cobre) (Casalino y col., 1997; Dorta y col., 2003).

*-Unión a grupos tioles*

Las proteínas o los péptidos con alto contenido de grupos sulfhidrilos, tales como el glutatión (GSH) y las MTs, intervienen en la regulación de los niveles de las ERO y de los metales.

-El GSH es el más importante y abundante antioxidante no enzimático celular. El  $\text{Cd}^{2+}$  compite con las ERO por los grupos sulfhidrilos del GSH, causando una depleción del contenido de esta molécula. Esto lleva a una alteración del balance redox celular favoreciendo un ambiente oxidante (López y col., 2006).

-Las MTs, como se mencionó más arriba, son proteínas ricas en Cys. Estas proteínas son conocidas como “secuestradoras de metales” debido a la gran afinidad que los metales tienen por sus grupos sulfhidrilos (Amara y col., 2008; Ognjanović y col., 2008). Las MTs son capaces de unir y detoxificar  $\text{Cd}^{2+}$ . Un incremento en el nivel de las ERO, provocado por la exposición al metal, desestabiliza la unión entre el  $\text{Cd}^{2+}$  y las MTs, liberándolo y favoreciendo así la generación de nuevas ERO (Jiménez y col., 1997).

*-Inducción de la producción de ERO por la mitocondria*

La mitocondria es una de las principales fuentes de ERO. Se ha descrito que la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  induce alteraciones específicas en la estructura y en el funcionamiento de la mitocondria (Wang y col., 2004; Poliandri y col., 2006a). En nuestro laboratorio demostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la cadena de transporte

de electrones mitocondrial induciendo la generación de ERO en las células adenohipofisarias en cultivo. Además, mostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$  estimula la síntesis de NO (Poliandri y col., 2004). El NO es un radical libre gaseoso que funciona como mediador endógeno de una variedad de efectos fisiológicos en diferentes tejidos (Murad y col., 2006). El NO, al inhibir algunos de los complejos de la cadena de transporte de electrones (Poderoso y col., 1996), reduce los niveles de ERO y disminuye los efectos citotóxicos del metal (Poliandri y col., 2006a).

#### *-Activación de la NADPH-oxidasa*

La NADPH-oxidasa es un sistema enzimático que originalmente fue identificado como un componente clave de la respuesta inmune leucocitaria, pero que actualmente se sabe participa en numerosos procesos celulares y también constituye otra de las fuentes endógenas más importantes de ERO en el organismo (Bokoch y Knaus, 2003). Este complejo cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  utilizando para ello oxígeno molecular y produciendo peróxido de hidrógeno (Bedard y col., 2007). Se ha observado que el  $\text{Cd}^{2+}$  induce la producción de ERO al activar a la NADPH-oxidasa 2 y sus proteínas regulatorias conduciendo a la apoptosis neuronal en las células PC12 y en las SH-SY5Y (Chen y col., 2011).

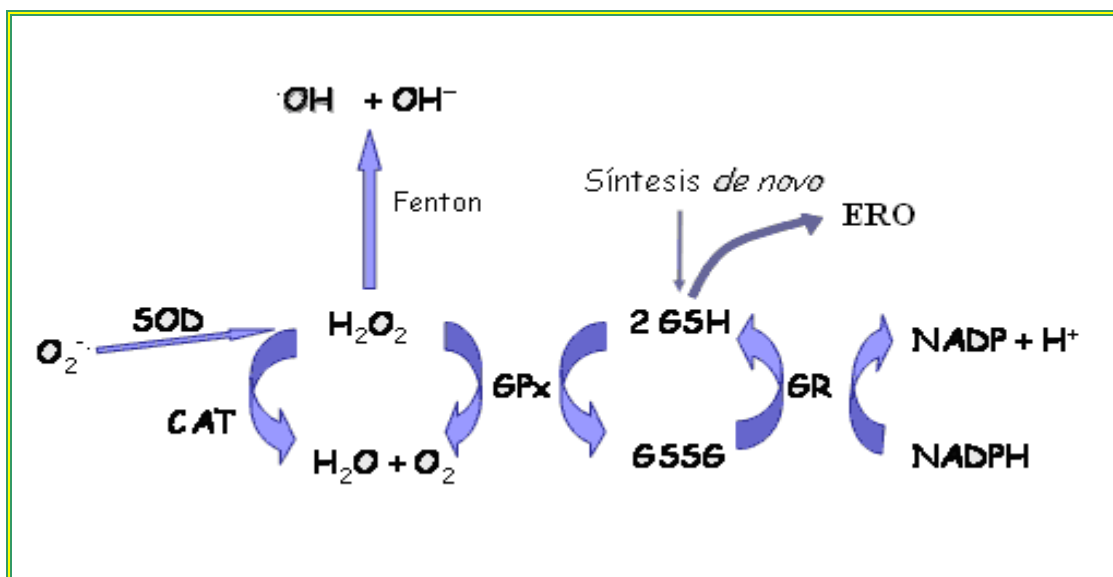
## *Defensas antioxidantes y Cd<sup>2+</sup>*

Los organismos han desarrollado mecanismos de defensa celular muy sensibles de manera de impedir, contrarrestar o minimizar el daño oxidativo. Los sistemas de defensas antioxidantes pueden ser enzimas, péptidos o metabolitos y están presentes en todos los compartimientos subcelulares (Halliwell, 2006).

Las enzimas antioxidantes más importantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidada (GPx) y la glutatión reductasa (GR). Estas enzimas pueden actuar independientemente pero, para lograr una eliminación eficiente de las ERO, su acción debe ir siempre acoplada de manera de eliminar al peróxido de hidrógeno formado e impedir su participación en las reacciones de tipo Fenton.

La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno. Luego la CAT y/o la GPx se encargan de la eliminación del peróxido de hidrógeno. La GR es otra enzima cuya función se encuentra asociada a la GPx. El glutatión oxidado (GSSG) por acción de la GPx es regenerado por la GR, para lo cual requiere la presencia de NADPH, el cual es a su vez oxidado. De manera similar a la asociación que existente entre la SOD y la CAT o la GPx, existe una cooperación entre la GPx y la GR (Figura 6).

Se ha descrito que la exposición al Cd<sup>2+</sup> afecta la actividad de estas enzimas antioxidantes ya sea activándolas o inhibiéndolas (Jurczuk y col., 2004; Yalin y col., 2006). Estas discrepancias han sido atribuidas a diferencias en las condiciones de exposición, en la concentración del Cd<sup>2+</sup> y en la respuesta diferencial de los distintos tejidos estudiados.



**Figura 6: Sistema de defensa antioxidante celular.** La SOD, la CAT, la GPx y la GR son las enzimas antioxidantes más importantes. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este es convertido a  $H_2O$  y  $O_2$  por la acción de dos peroxidasa: la CAT y la GPx. El GSH es el componente antioxidante no enzimático por excelencia. Además de actuar como cofactor de la GPx, este tiol tiene capacidad antioxidante *per se*. Durante la detoxificación de los peróxidos, la GPx oxida al GSH formando GSSG como producto final de la reacción. El GSH consumido puede ser restablecido a través de su reciclaje por acción de la GR o bien por la síntesis *de novo*.

Mientras que las enzimas antioxidantes están específicamente involucradas en la detoxificación de las ERO, los sistemas no enzimáticos son metabolitos esenciales para diversos procesos metabólicos que además poseen propiedades antioxidantes. Estos metabolitos pueden ser clasificados en hidrofílicos e hidrofóbicos. Dentro de los hidrofílicos se encuentran el GSH y el ácido ascórbico, los cuales reaccionan directamente con los compuestos oxidantes tanto intra como extra celularmente. Entre los antioxidantes hidrofóbicos, la vitamina E, protege a las membranas celulares de la peroxidación lipídica inducida por los agentes oxidantes. En nuestro laboratorio demostramos que ambos tipos de antioxidantes (n-acetil cisteína y vitamina E) son capaces de impedir la actividad citotóxica del  $Cd^{2+}$  así como también su efecto sobre la secreción de PRL en las células adenohipofisarias en cultivo (Poliandri y col., 2003).

Existen otros tipos de antioxidantes endógenos tales como la melatonina. Esta hormona, producida por la glándula pineal, ha sido utilizada para contrarrestar el estrés oxidativo en varios sistemas (Romero y col., 2008; Rao y Chhunchha, 2009). La melatonina tiene la capacidad de detoxificar al radical hidroxilo, al radical carbonato y varios radicales orgánicos, como así también peroxinitritos y otras especies reactivas del nitrógeno ya sea secuestrándolos y/o estimulando la actividad de las enzimas antioxidantes (Hardeland y col., 2003; Reiter y col., 2003; Rodríguez y col., 2004; Guenther y col., 2005). Otro de los mecanismos de protección sugeridos para dicha hormona está dado por su capacidad de asociarse con los metales y facilitar su eliminación de los tejidos, ya que gracias a sus propiedades liposolubles, es capaz de difundir y cruzar las barreras celulares libremente (Reiter y col., 2002). En nuestro grupo demostramos que la melatonina administrada simultáneamente con  $\text{Cd}^{2+}$  en el agua de bebida, es capaz de impedir el estrés oxidativo generado por el metal en la adenohipófisis de rata (Poliandri y col., 2006b).

### *Marcadores de estrés oxidativo*

La primera respuesta celular ante un estímulo oxidativo es utilizar las herramientas preexistentes y simultáneamente inducir la expresión de diferentes factores de transcripción y enzimas que a su vez desencadenan la respuesta antioxidante específica y persistente. Estos factores y enzimas de primera línea son conocidos como “marcadores de estrés oxidativo”. Entre ellos podemos nombrar la peroxidación lipídica, la expresión del factor nuclear eritroide 2- factor derivado 2 (Nrf2), la expresión de la hemo-oxigenasa-1 (HO-1) y la expresión de las MTs.

La peroxidación lipídica hace referencia al daño oxidativo de los lípidos de las membranas celulares por las ERO. La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende fuertemente del grado de insaturación de los lípidos que las constituyen, siendo mayor su susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces (Pamplona y col., 2000). Existen

evidencias de que la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta la peroxidación lipídica en distintos tejidos. Ognjanović y col. observaron dicho efecto en hígado y riñón de rata (Ognjanović y col., 2008). Nuestro grupo ha comprobado que la exposición crónica a bajas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta la peroxidación lipídica en la adenohipófisis de rata, sin afectar al hígado (Poliandri y col., 2006b). Un efecto similar también hemos observado en las células adenohipofisarias en cultivo (Poliandri y col., 2004).

El Nrf2 es un factor de transcripción que responde a xenobióticos específicos como el  $\text{Cd}^{2+}$ , coordinando la transcripción de una batería de genes para luchar contra el insulto químico (Liu y col., 2009; Kensler y col., 2007), tal como la expresión de la HO-1.

La HO-1 es una de las primeras enzimas que se modifican por efecto del estrés oxidativo. Esta enzima microsomal cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo y está involucrada en la síntesis de bilirrubina y biliverdina, dos importantes agentes antioxidantes (Galbraith y col., 1999). Se ha observado que la HO-1 es inducida en diferentes células como mecanismo de protección frente al estrés oxidativo generado por el  $\text{Cd}^{2+}$  (Kusakabe y col., 2008, Poliandri y col., 2006b).

Como se mencionó previamente, las MTs son proteínas ricas en Cys, que unen metales y que además secuestran las ERO generadas en la célula. El  $\text{Cd}^{2+}$  estimula marcadamente los niveles de las MTs (Wlostowski y col., 2000). Existen varias isoformas de las MTs que protegen a las células del estrés oxidativo. Las isoformas MT-1 y MT-2 se expresan en la mayoría de los tejidos y son inducidas por metales pesados, agentes oxidantes, hormonas, la inflamación y el estrés. La MT-3 fue originalmente identificada en cerebro (Uchida y col., 1991) y luego también fue detectada en órganos periféricos como la próstata, los testículos, la lengua y los riñones (Garrett y col., 1999; Hozumi y col., 2008). La MT-4 se encuentra principalmente en la piel (Quaife y col., 1994). Debido a la capacidad de los metales contaminantes (plata, cadmio, cobre, mercurio) de inducir marcadamente la síntesis de MTs en especies marinas se ha propuesto su uso de estas proteínas como potenciales biomarcadores

específicos de la exposición a metales en el “monitoreo acuático (Langston y col., 2002; Amiard y col., 2006).

### ***Participación del NO en los efectos citotóxicos del Cd<sup>2+</sup>***

El NO es un mensajero con una importante función moduladora en el sistema neuroendocrino. El papel del NO en el efecto del Cd<sup>2+</sup> es objeto de controversias entre distintos grupos: mientras que algunos autores postulan que el NO protege a las células de los efectos tóxicos del Cd<sup>2+</sup> (Liu y col., 2004), otros sostienen que el NO sería mediador de los efectos dañinos (Misra y col., 1996). Estas diferencias parecen ser consecuencia de la respuesta diferencial de cada tejido y también a los niveles de NO inducidos por el metal. En nuestro laboratorio demostramos que el Cd<sup>2+</sup> aumenta la producción de NO y que este aumento tiene un efecto citoprotector sobre las células adenohipofisarias (Poliandri y col., 2004). Un efecto similar se observó a nivel de las mitocondrias (Poliandri y col., 2006a).

El NO es generado por la óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual existen tres isoformas (NOS1, NOS2 y NOS3). Nosotros observamos que el Cd<sup>2+</sup> estimula la expresión de la NOS1 en las células adenohipofisarias tanto *in vivo* como *in vitro* (Poliandri y col., 2004; Poliandri y col., 2006b). Existe una estrecha interrelación entre las MTs, los metales y el NO. Las MTs pueden secuestrar al NO y de esta forma proteger a las células de sus efectos tóxicos. A su vez, el NO es capaz de estimular la expresión de las MTs (Katakai y col., 2001; Itoh y col., 2005).



## 2) El $Cd^{2+}$ como disruptor endocrino

### *Disruptores endocrinos*

Desde mediados del siglo pasado, se han ido reportando manifestaciones extrañas y desconcertantes que sufrían distintas especies de animales, en diferentes partes del mundo, aparentemente como consecuencia de la exposición a sustancias químicas muy variadas y que parecían no tener nada en común. Estas manifestaciones incluían la pérdida de la capacidad reproductiva, aumento de la mortandad en las poblaciones animales y de su progenie, deformaciones en los órganos reproductivos, comportamientos sexuales anormales y alteraciones del sistema inmunológico. Algunos de estos problemas también se observaron en los seres humanos. La Dra. Theo Colborn (zoóloga) fue contratada por la World Wildlife Fund de USA para estudiar las causas de las alteraciones en el estado de salud de los animales de la región de los Grandes Lagos en los años 80. Ella encaja las piezas de este rompecabezas y encuentra el punto común de las múltiples manifestaciones observadas en las diferentes especies y en distintas partes del mundo: *“todas las especies de animales estudiadas sufrían alteraciones en el funcionamiento de su sistema endocrino ocasionadas por la exposición a sustancias químicas de constitución muy heterogénea a los cuales denominó: disruptores endocrinos”*.

Los disruptores endocrinos (DEs) son agentes químicos naturales o sintéticos que interfieren con la biosíntesis, el metabolismo o la acción de las hormonas endógenas, alterando la homeostasis y por lo tanto, provocando variaciones en la reproducción y en el desarrollo del organismo y/o de su progenie (Diamanti-Kandarakis y col., 2009). El grupo de moléculas clasificadas como DEs es altamente heterogéneo e incluye químicos sintéticos utilizados como solventes/lubricantes industriales y sus productos derivados (bifenilos policlorados, bifenilos policromados, dioxinas), plásticos (bisfenol A, BPA),

plastificantes (ftalatos), pesticidas (diclorodifeniltricloroetano, DDT), fungicidas (vinclozolina) y agentes farmacéuticos (dietilestilbestrol). Pertenecen a este grupo químicos naturales como los fitoestrógenos (genisteína y cumestrol), tan abundantes en alimentos como la soja. Algunos metales, tales como cadmio, mercurio, plomo, uranio y arsénico, también pueden actuar como DEs (Diamanti-Kandarakis y col., 2009; Iavicoli y col., 2009).

La mayoría de los estudios realizados sobre DEs revelan que estas sustancias ejercen sus efectos actuando como agonistas o antagonistas de los receptores hormonales específicos (Waring y Harris, 2005). Los DEs son, por lo tanto, capaces de imitar la actividad de las hormonas y producir efectos equivalentes, pueden bloquear la actividad normal de las hormonas al competir por los receptores específicos o modificar la concentración fisiológica de las mismas al afectar los mecanismos de retrocontrol alterando así su biodisponibilidad (Waring y Harris, 2005).

Un grupo particular de DEs, capaces de reproducir las acciones de los estrógenos y/o interferir con su normal señalización, son los denominados “**xenoestrógenos**”.

## ***Estrógenos y xenoestrógenos***

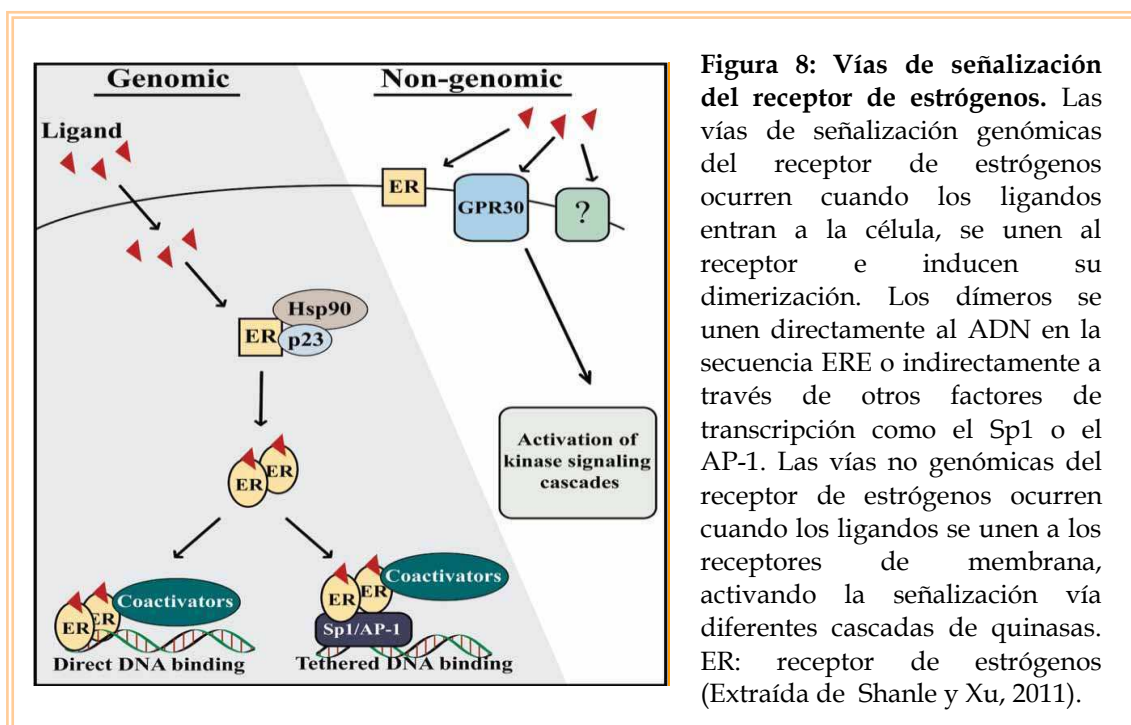
### ***Estrógenos***

Los estrógenos son una familia de hormonas esteroideas sintetizadas principalmente por los ovarios durante la edad reproductiva y en menores cantidades por las glándulas adrenales y otros tejidos. Su función más importante es promover el crecimiento y la diferenciación de los órganos sexuales y de otros tejidos relacionados con la reproducción. Sin embargo, también tienen un papel muy importante en el funcionamiento del cerebro, en la remodelación del hueso y en la acumulación de tejido adiposo.

El  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) es el estrógeno natural más potente. A nivel de la adenohipófisis, es el principal regulador de la secreción de PRL (Rhode y

Gorski, 1991) y de la proliferación celular (especialmente de los lactotrofos). La PRL es una hormona implicada en una variedad de funciones fisiológicas tales como el desarrollo fetal, la reproducción y la respuesta inmune, de manera tal que alteraciones en su producción y liberación afectan diferentes funciones del organismo (Bole-Feysot y col., 1998).

El E<sub>2</sub> ejerce sus efectos mediante la activación de múltiples vías de señalización tanto genómicas como no genómicas (Figura 8) (Heldring y col., 2007; Shanle y Xu, 2010; Shanle y Xu, 2011). Las acciones del E<sub>2</sub> están mediadas por dos receptores específicos (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ), los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas/tiroideas que pueden actuar como factores de transcripción nuclear (Drummond y col. 1999; Rousseau y col., 2002; Adamson y col., 2008). El RE $\alpha$  presenta tres isoformas: la isoforma de longitud completa de 66 kDa (RE $\alpha$ 66) y las variantes de "splicing" o truncadas de 46 kDa (RE $\alpha$ 46) y 36 kDa (RE $\alpha$ 36) (Murphy y col., 2009). Estas variantes de "splicing" fueron detectadas inicialmente en la hipófisis y luego fueron encontradas en otros tejidos como por ejemplo mama, endometrio y también en células de músculo liso y en células mononucleares de sangre periférica (Natasha y col., 1998; Matthew y col., 2004).



**Figura 8: Vías de señalización del receptor de estrógenos.** Las vías de señalización genómicas del receptor de estrógenos ocurren cuando los ligandos entran a la célula, se unen al receptor e inducen su dimerización. Los dímeros se unen directamente al ADN en la secuencia ERE o indirectamente a través de otros factores de transcripción como el Sp1 o el AP-1. Las vías no genómicas del receptor de estrógenos ocurren cuando los ligandos se unen a los receptores de membrana, activando la señalización vía diferentes cascadas de quinasas. ER: receptor de estrógenos (Extraída de Shanle y Xu, 2011).

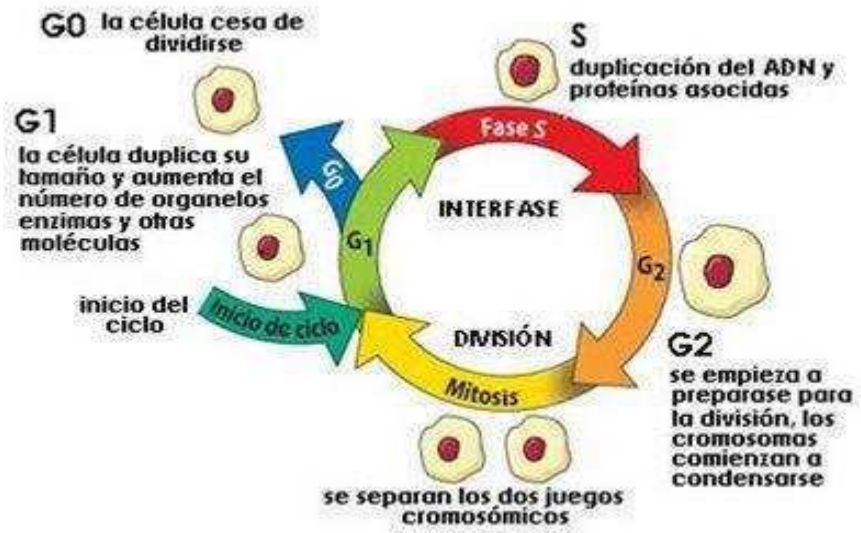
### *Estrógenos y proliferación celular*

Los estrógenos intervienen en los procesos de proliferación y muerte celular controlando la expresión y actividad de determinados genes y proteínas directamente involucrados en la regulación del ciclo celular como las ciclinas y los proto-oncogenes, así como también de las diferentes vías de señalización que intervienen en dichos procesos (Altucci y col., 1996; Dinda y col., 1997).

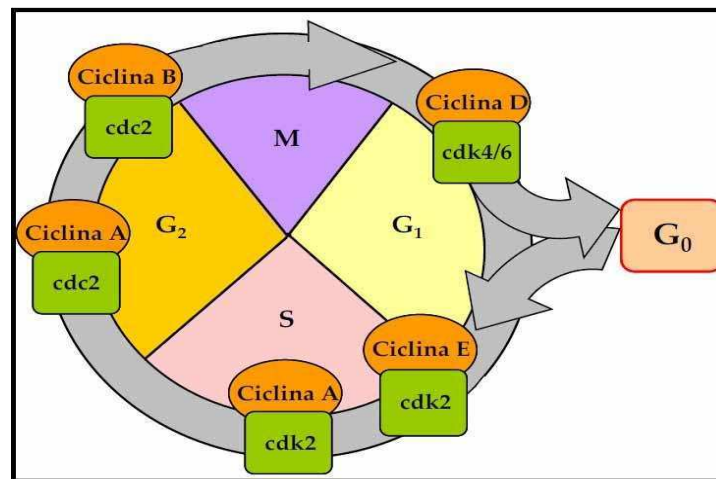
El ciclo celular es el proceso finamente regulado a través del cual una célula se divide en dos células hijas. Tradicionalmente se lo separa en cuatro fases denominadas: G1, S, G2 y M. Las fases G1 y G2 (Gap o intervalos) son fases metabólicamente muy activas donde se produce el crecimiento celular y las células se van preparando para la fase siguiente. La fase S (Síntesis) consiste en la duplicación del material genético de la célula (replicación del ADN) el cual va a ser distribuido a cada una de las células hijas. Por último la fase M (Mitosis) consiste en la división de todo el material celular y concluye con la citocinesis (Figura 7A). Cuando las células no se encuentran proliferando se dice que han salido del ciclo celular y están en estado de quiescencia o G0. La progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular está estrictamente regulada por diferentes proteínas tales como las ciclinas (A, B, D y E), que están asociadas a las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs 1, 2, 4, 6) (Sánchez y Dynlacht, 2005) (Figura 7B).

Los proto-oncogenes c-fos y c-jun, son miembros del factor de transcripción AP-1 (proteína activadora-1), cuya expresión es rápidamente inducida ante un estímulo mitogénico (Angel y Karin, 1991; Shaulian y Karin, 2002). El grupo de Ben-Jonathan demostró que el E<sub>2</sub> estimula la expresión de c-fos en los lactotropos y en las células folículo estrelladas de las ratas Fischer 344 (Allen y col., 1997).

A



B



**Figura 7: Ciclo celular:** Fases del ciclo celular (A). Complejos de ciclinas-CDKs que intervienen en cada fase del ciclo (B).

## ***Xenoestrógenos***

Durante las últimas décadas ha aumentado notablemente el número de químicos sintéticos que son utilizados tanto en la agricultura como en la industria, muchos de los cuales han sido identificados como xenoestrógenos (XEs). Los XEs (o estrógenos ambientales) interfieren con las acciones de los estrógenos en los diferentes tejidos efectores.

Muchos XEs son capaces de unirse a los receptores de estrógenos (Varayoud y col., 2008; Sosić-Jurjević y col., 2010; Rivera y col., 2011) y, de esta forma, alteran los niveles de las hormonas endógenas, ya sea por provocar cambios en la síntesis, el metabolismo o el transporte de las mismas (Sonnenschein y Soto, 1998). Estos disruptores han sido relacionados con diferentes trastornos hormonales en los humanos y otros animales como la feminización de machos (Kloas y col., 1999), malformaciones en el tracto reproductivo y endometriosis (Gotz y col., 2001), desorganización del sistema nervioso central (Laessig y col., 1999), cáncer de mama y ovario (Brown y Lamartiniere, 1995), entre otros.

Entre los XEs, en especial los que actúan sobre el eje hipotálamo-hipofisario, podemos mencionar a los fitoestrógenos como la genisteína-isoflavona que se encuentra principalmente en la soja y en el trébol rojo-(Boue y col., 2003; Burger, 2003; Sosić-Jurjević y col., 2010); los polifenoles clorados como el BPA-monómero utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato, resinas y selladores dentales-(Steinmetz y col., 1997; Ben-Jonathan y col., 1998; Suzuki y col., 2002; Akingbemi y col., 2004; Susiarjo y col., 2007; Cardoso y col., 2010; Rivera y col., 2011); el hexaclorobenceno, las dioxinas, el endosulfano y el clordano-pesticidas órgano clorados-(Hunter y col., 1999; Rousseau y col., 2002; Nordberg y col., 1994). Muchos de estos compuestos, cuyo uso actualmente está “prohibido”, han sido ampliamente utilizados y persisten en la naturaleza. Si bien estos XEs representan un grupo con estructuras químicas muy diversas, varios de ellos comparten algunas

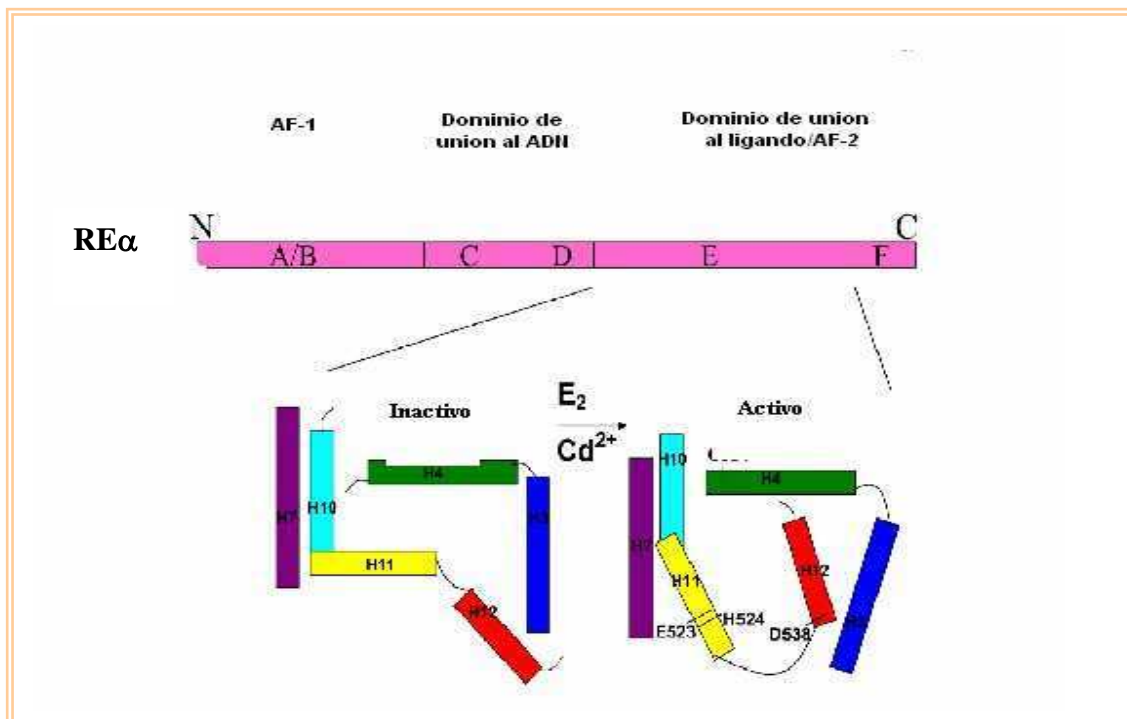
similitudes en su estructura como por ejemplo la presencia de uno o dos anillos aromáticos (Martin y col., 2003).

Otra clase de XEs son los conocidos como “metaloestrógenos”. Este grupo incluye a metales pesados y metaloides como el cadmio, el níquel, el arsénico, el cromo, el mercurio, el plomo, el uranio, entre otros (García-Morales y col., 1994; Stoica y col., 2000; Martin y col., 2003; Iavicoli y col., 2009). Martin y col. demostraron que, en forma similar al E<sub>2</sub>, muchos de estos metales estimulan la proliferación de la línea celular de mama MCF-7 y además, inducen la expresión de genes regulados por estrógenos como el receptor de progesterona y el pS2 (García-Morales y col., 1994; Martin y col., 2003).

### ***Efectos xenoestrogénicos del Cd<sup>2+</sup>***

El Cd<sup>2+</sup>, es actualmente uno de los metaloestrógenos más estudiados (García-Morales y col., 1994; Stoica y col., 2000; Höfer y col., 2010; Siewit y col., 2010). Numerosos trabajos postulan que actúa como un DE reproduciendo los efectos de los estrógenos en varios tejidos y, por consiguiente, afecta la secreción hormonal de diferentes glándulas endocrinas (García-Morales y col., 1994; Stoica y col., 2000; Martin y col., 2003; Byrne y col., 2009; Höfer y col., 2010; Siewit y col., 2010).

Se ha propuesto que el Cd<sup>2+</sup> es capaz de unirse y activar al RE $\alpha$ , tanto *in vivo* como *in vitro*, a través del dominio de unión al ligando, en forma similar a como lo hace el E<sub>2</sub> (García-Morales y col., 1994; Stoica y col., 2000; Byrne y col., 2009). La interacción del Cd<sup>2+</sup> con el receptor involucra varios aminoácidos del sitio de unión a la hormona, sugiriendo que el metal puede formar un complejo de coordinación con el dominio de unión al ligando y de esta forma activar al receptor (Stoica y col., 2000) (Figura 9). El Cd<sup>2+</sup> tiene una alta afinidad por el RE $\alpha$  y es capaz de competir con el E<sub>2</sub> por la unión al receptor.



**Figura 9: Modelo propuesto del receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ).** El RE $\alpha$  está dividido en diferentes dominios (A-F). El N-terminal del receptor contiene la región variable A/B que modula la transcripción a través del dominio de transactivación AF-1. El dominio de unión al ADN, región C, es una pequeña región conservada, rica en cisteínas, que contiene dos dedos de cinc. Además de unirse al ADN, la región C juega un rol en la transactivación y en la dimerización del receptor. El C-terminal contiene las regiones D, E y F. La región E contiene el dominio de unión al ligando que está formado por el dominio de dimerización inducible por la hormona y el dominio de transactivación AF-2. El dominio de unión al ligando contiene 11 alfa hélices (H1, H3-H12) plegadas rodeando al bolsillo de unión al ligando. Se ha propuesto que cuando el Cd<sup>2+</sup> se une a determinados aminoácidos en el dominio de unión al ligando, el RE $\alpha$  sufre cambios estructurales similares a los provocados por el E<sub>2</sub> para pasar al estado activo del receptor (Adaptada de Byrne y col., 2009).

El grupo de Martín fue el primero en demostrar los efectos xenoestrogénicos del Cd<sup>2+</sup> utilizando la línea tumoral de mama MCF-7 (García-Morales y col., 1994). Ellos observaron que el metal induce la proliferación celular y aumenta la expresión de genes regulados por estrógenos (como el del receptor de progesterona). También vieron que el metal activa al RE $\alpha$  en ensayos de transfecciones transitorias (Stoica y col., 2000). Como los efectos del Cd<sup>2+</sup> fueron bloqueados por un antiestrógeno, los autores propusieron que dichos efectos están mediados por el RE $\alpha$  (Stoica y col., 2000). Otros trabajos mostraron que el Cd<sup>2+</sup> también activa vías no genómicas tales como la de ERK



1/2 y Akt activando al del RE $\alpha$  de membrana (Brama y col., 2007; Liu y col., 2008).

El Cd<sup>2+</sup> es capaz de reproducir los efectos de los estrógenos *in vivo*, tanto en animales de experimentación como en humanos.

Estudios realizados en ratas ovariectomizadas mostraron que el Cd<sup>2+</sup> adelanta el inicio de la pubertad estimulando procesos normalmente regulados por los estrógenos: aumenta el peso del útero, estimula el desarrollo de la glándula mamaria e induce la expresión de genes regulados por hormonas. En el útero, el aumento del peso seco es acompañado por la proliferación del endometrio y la inducción del receptor de progesterona y del componente del complemento C3. En la glándula mamaria, el Cd<sup>2+</sup> promueve un aumento en el desarrollo de la glándula aumentando la formación de ramificaciones laterales y de brotes alveolares e induce la expresión de caseína, de la proteína ácida de suero, del receptor de progesterona y de C3. La descendencia femenina, que ha sido expuesta en útero al Cd<sup>2+</sup>, experimenta un inicio de la pubertad precoz y en la glándula mamaria un aumento en la zona epitelial y en el número de brotes terminales de los alvéolos (Johnson y col., 2003).

En cuanto a humanos, varios estudios han examinado las consecuencias de la exposición ocupacional a bajas concentraciones de Cd<sup>2+</sup> sobre el sistema reproductivo (Prins, 2008; Pollack y col., 2011). En estos individuos se ha observado una disminución en la calidad del semen y/o alteraciones en los niveles de las hormonas sexuales (Wirth y Mijal, 2010). En mujeres en edad reproductiva, se ha observado que la exposición ocupacional al Cd<sup>2+</sup> provoca cambios en los niveles de las hormonas relacionadas con el ciclo menstrual (Pollack y col., 2011) y, en las mismas condiciones, las mujeres embarazadas muestran una mayor incidencia de abortos espontáneos y los bebés un menor peso al nacer (Frery y col., 1993; Shiverick y Salafia, 1999). Además, se ha demostrado que la exposición al Cd<sup>2+</sup> está relacionada a una disminución en la síntesis de leptina (molécula reguladora de la organogénesis y del desarrollo fetal) y de la producción de progesterona de la placenta (Stasenko y col., 2010).

## *Cd<sup>2+</sup> y cáncer*

El Cd<sup>2+</sup> es un potente carcinógeno humano. Como se indicó más arriba, está incluido dentro de la primera categoría de los metales carcinogénicos. Muchas evidencias relacionan la exposición ocupacional al Cd<sup>2+</sup> y al humo del cigarrillo con el desarrollo de cáncer de pulmón (International Agency for Research on Cancer, 1993; Beveridge y col., 2010).

Abundante bibliografía muestra que el Cd<sup>2+</sup> podría estar relacionado con el desarrollo de cáncer en diferentes tejidos hormono-dependientes. La exposición al Cd<sup>2+</sup> es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata, el tipo más común de cáncer sólido en hombres (Prins, 2008). Los primeros estudios que relacionaron al Cd<sup>2+</sup> con el cáncer de próstata se realizaron en trabajadores expuestos al metal en las fábricas de baterías de Cd<sup>2+</sup>-níquel (Potts, 1965). En mujeres se observó que el Cd<sup>2+</sup> podría estar relacionado con el desarrollo de cáncer de mama, principal tipo de cáncer que afecta a las mujeres, y de endometrio (American Cancer Society, 1993; Akesson y col., 2008).

Los estrógenos regulan el crecimiento normal de la dicha glándula, sin embargo, la exposición prolongada a estrógenos, entre otros factores, está directamente relacionada con el desarrollo de cáncer de mama y también de útero (Clemons y Goss, 2001; Spink y col., 2009). La importancia de los estrógenos en la etiología del cáncer de mama sugiere que la exposición a sustancias ambientales que imitan los efectos de estas hormonas puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. En particular, varios estudios han sugerido que el Cd<sup>2+</sup> puede alterar el crecimiento de la glándula mamaria, resultando en un crecimiento neoplásico (Johnson y col., 2003; Antila y col., 1996; Navarro Silvera y Rohan, 2007; Balabanič y col., 2011).

## 2. *Objetivos*

-Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la exposición crónica al  $\text{Cd}^{2+}$  induce estrés oxidativo en la adenohipófisis y que el tratamiento simultáneo con melatonina es capaz de impedir dichos efectos. Estos resultados son importantes pues muestran que es posible prevenir los efectos tóxicos del metal. Sin embargo, es sabido que, en general, cualquier tratamiento para una intoxicación por metales se inicia una vez que se hacen evidentes las manifestaciones tóxicas de la misma y esto sucede sólo después de un cierto período de acumulación del metal en el organismo, por lo tanto, el objetivo de la primera parte del trabajo de tesis fue:

Evaluar si el tratamiento *a posteriori* con melatonina o la interrupción de la exposición al metal revierten el estrés oxidativo y los cambios en la secreción hormonal inducidos por la exposición crónica al  $\text{Cd}^{2+}$  *in vivo* a nivel adenohipofisario.

-Los estrógenos cumplen un papel fundamental a nivel adenohipofisario, en especial actuando como factores liberadores y tróficos de los lactotropos. Diferentes evidencias indican que el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de actuar como un disruptor endocrino imitando los efectos de los estrógenos en distintos tejidos. Teniendo en cuenta esta propiedad del metal y la gran sensibilidad de la adenohipófisis al  $\text{Cd}^{2+}$ , el objetivo de la segunda parte del trabajo de tesis fue:

Investigar si el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de actuar como xenoestrógeno afectando la liberación hormonal y la proliferación celular adenohipofisaria.

### ***3. Materiales & Métodos***

#### **Reactivos**

El CdCl<sub>2</sub> fue provisto por Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO, USA). Todos los reactivos para cultivo primario, excepto el suero fetal bovino y el suero equino, fueron provistos por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El suero fetal bovino y el suero equino fueron obtenidos en GEN SA (Buenos Aires, Argentina). Los reactivos para la extracción de ARN y RT-PCR fueron provistos por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) y por Promega (Madison, WI, USA). La leupeptina, la pepstatina, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el ditiotreitól (DTT) fueron provistos por Alexis-US Biological (Swampscott, MA, USA). El reactivo de Bradford fue provisto de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La melatonina, el 17 β-estradiol, el fulvestrant (ICI 182,780), la 5-Bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (BrdU) y el resto de los reactivos y drogas utilizados fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El material descartable estéril fue provisto por ETC Internacional (Buenos Aires, Argentina) y TNT (Buenos Aires, Argentina). El material plástico no estéril fue provisto por Chemit (Buenos Aires, Argentina) e Instrumental Pasteur (Buenos Aires, Argentina).

Las hormonas estándares y los anticuerpos primarios utilizados en la determinación de las hormonas adenohipofisarias por radioinmunoensayos específicos, así como también en los estudios inmunocitoquímicos, fueron provistos por el Dr. Parlow, National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA, USA.

Los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de Western blot fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

El anticuerpo anti BrdU, así como los anticuerpos secundarios utilizados en los radioinmunoensayos, estudios inmunocitoquímicos y Western blot

fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), excepto para el Western del receptor de estrógenos que fue provisto por Jackson Immuno Research (PA, USA).

La línea celular GH3 (lactosomatotropa, derivada de un tumor de hipófisis de rata) fue gentilmente cedida por la Dra. Graciela Díaz-Torga (IByME, CONICET).

## **Animales**

Los animales fueron provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21-24 °C) y luz (ciclo de luz/oscuridad de 12 hs) con libre acceso al alimento balanceado (Cooperación, Buenos Aires, Argentina). Los animales fueron mantenidos de acuerdo a las normas de dicho Bioterio con base en la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH) (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, 1996). Los animales fueron sacrificados por decapitación y los tejidos rápidamente removidos y procesados según se indica.

## Experimentos *in vivo*:

Se utilizaron ratas machos adultas de la cepa Wistar de 60 días al comienzo del experimento. Los animales fueron divididos en 6 grupos (6-8 animales/grupo) a los que se les realizaron diferentes tratamientos en el agua de bebida, según el diseño experimental que se describe en la Tabla 1.

	Días 1-30	Días 30-60	Días 60-90
Control	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	
Cd <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> O	Cd <sup>2+</sup>	
Mel	H <sub>2</sub> O	Mel	
Cd <sup>2+</sup> /Mel	Cd <sup>2+</sup>	Mel	
Cd <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O	Cd <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> O	
Cd <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O	Cd <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Tabla 1: Diseño experimental de los tratamientos con Cd<sup>2+</sup> (5 ppm) y Mel (0,4 µg/ml) en el agua de bebida.**

La solución madre de melatonina fue preparada en etanol. La concentración final de etanol en el agua de bebida de los animales que recibieron melatonina fue de 0,0015% y por lo tanto, todos los grupos recibieron etanol al 0,0015% en el agua de bebida. Los animales fueron pesados semanalmente y se midió el consumo de bebida cada dos días. Al cabo de dos o tres meses de tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación (entre las 11 y 12 hs) y la adenohipófisis y una porción del hígado fueron extraídas y congeladas rápidamente. Además se recolectó sangre troncal para la determinación de las hormonas hipofisarias en suero por radioinmunoensayo.

## **Experimentos *in vitro*:**

Se utilizaron ratas hembras adultas jóvenes de la cepa Wistar (en estadios al azar del ciclo estral) de 200-250 g de peso. Los animales fueron sacrificados por decapitación y las adenohipófisis rápidamente removidas y colocadas en recipientes estériles para su posterior disgregación y realización de los cultivos celulares primarios.

## **Cultivos primarios de células adenohipofisarias**

Las adenohipófisis extraídas fueron colocadas en un tubo estéril de 50 ml con medio mínimo esencial de Dulbecco libre de rojo fenol (DMEM), suplementado con L-glutamina 1%, aminoácidos para medios de cultivo mínimos esenciales (MEM-aa) 1%, penicilina-streptomina 1%, anfotericina B 0,1%, pH 7,35-7,40 (DMEM-S) y seroalbúmina bovina (BSA) 0,3% (DMEM-S-BSA). Las adenohipófisis fueron lavadas tres veces con el mismo medio y cortadas en trozos de 1 mm<sup>3</sup> aproximadamente. Los fragmentos obtenidos, mantenidos a 37 °C con agitaciones periódicas y gaseo con CO<sub>2</sub> al 5%, fueron sucesivamente tratados con tripsina 0,25%, 20 minutos; suero fetal bovino adsorbido con carbón-dextrán (SFBA, suero libre de estrógenos) 10%, 10 minutos y desoxirribonucleasa del tipo I (ADNasa I) 45 U/μl, 10 minutos. Posteriormente, los fragmentos fueron lavados en tres pasos sucesivos con: una solución de EDTA 2 mM en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) libre de Ca<sup>2+</sup> y de Mg<sup>2+</sup> (KRB-CMF) pH 7,2-7,3, una solución de EDTA 1 mM en buffer KRB-CMF y buffer KRB-CMF solo sin EDTA. En cada paso fueron centrifugadas 3 minutos a 800 x g. Las células fueron dispersadas de manera mecánica por el pasaje de los fragmentos a través de una pipeta Pasteur siliconada hasta que los mismos no fuesen visibles. Las células monodispersas fueron centrifugadas 12 minutos a 1.200 x g y luego resuspendidas en DMEM-S con 10% SFBA (DMEM-S-SFBA). El número de células obtenidas se determinó por recuento en la cámara de Neubauer y la viabilidad fue evaluada por el

método de exclusión utilizando azul de Trypan. La viabilidad de las células utilizadas en los cultivos primarios fue siempre mayor al 90%.

Una vez hecho el recuento, las células resuspendidas fueron sembradas en placas de cultivo y estabilizadas durante 24 hs en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> antes de realizar los experimentos. La Figura 10 resume los pasos seguidos para la obtención del cultivo primario de células adenohipofisarias.

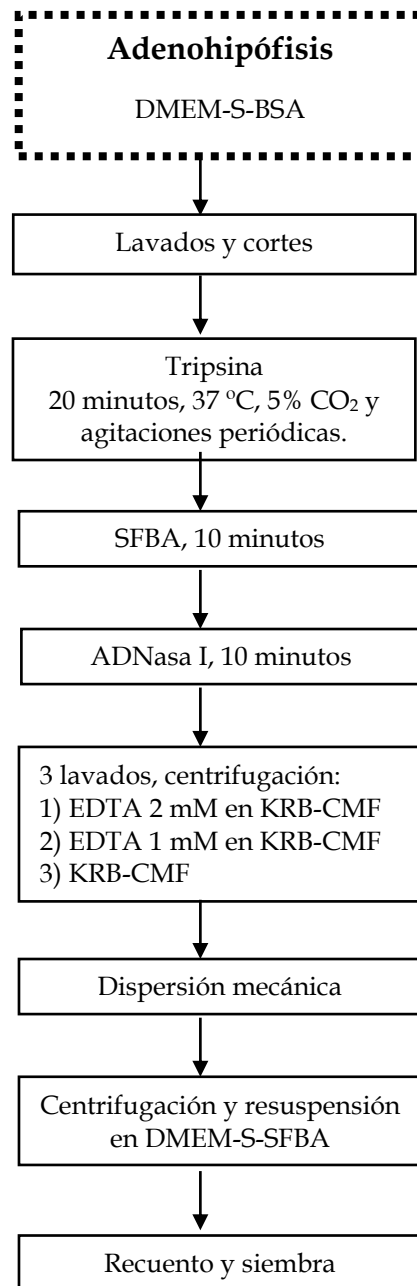


Figura 10: Esquema para la obtención del cultivo primario de células adenohipofisarias.



## **Tratamiento de las células adenohipofisarias en cultivo**

Luego del período de estabilización, el medio de cultivo fue descartado y las células fueron sincronizadas en medio DMEM-S libre de suero por 24 hs. A continuación, las células fueron incubadas por diferentes tiempos (8-96 hs) con DMEM-S-SFBA fresco solo (Control) o con el agregado de Cd<sup>2+</sup> y en presencia o no de un antagonista del receptor de E<sub>2</sub> (ICI 182,780, 10<sup>-7</sup> M, agregado media hora antes de los tratamientos). El Cd<sup>2+</sup> fue preparado a partir de una solución madre de CdCl<sub>2</sub> 5 mM en agua bidestilada estéril. El E<sub>2</sub> (1 nM) fue usado como control positivo de los experimentos. El mismo fue preparado a partir de una solución madre 10<sup>-3</sup> M en etanol.

## **Cultivo de la línea celular GH3**

La línea celular GH3 fue cultivada en medio F12 Kaighn suplementado con 15% de suero equino, 2,5% de suero fetal bovino, 1% de penicilina-streptomina y 0,1% de anfotericina B, pH 7,35-7,4, en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días y las células fueron repicadas con tripsina una vez por semana en botellas de cultivo estériles (botellas de mantenimiento) hasta la realización de los distintos experimentos.

## **Tratamiento de las células GH3 en cultivo**

Para la realización de los experimentos, las células fueron “levantadas” de las botellas de mantenimiento con tripsina y lavadas tres veces en medio DMEM-S-SFBA (entre lavado y lavado las células fueron centrifugadas 5 minutos a 800 x g y resuspendidas en medio fresco) para eliminar el medio en el que fueron cultivadas las células. Una vez finalizados los lavados, las células fueron resuspendidas en DMEM-S-SFBA. El número de células se determinó por recuento en cámara de Neubauer y la viabilidad fue evaluada por el

método de exclusión utilizando azul de Trypan. La viabilidad de las células fue siempre mayor al 90%.

Las células fueron sembradas en placas de cultivos y estabilizadas durante 24 hs en estufa de cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego de este tiempo, el medio de cultivo fue descartado y las células fueron sincronizadas en medio DMEM-S libre de suero por 24 hs. A continuación, las células fueron incubadas por diferentes tiempos (72-96 hs) con DMEM-S-SFBA solo (Control) o con el agregado de Cd<sup>2+</sup>. El E<sub>2</sub> (1 nM) fue usado como control positivo de los experimentos.

## **Inmunocitoquímica**

### ***1) Curva de proliferación celular en función de la concentración de Cd<sup>2+</sup>.***

Para los estudios de proliferación celular, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares (Fisherbrand 12 mm, Fisher Scientific, USA), en placas de cultivo de 24 pocillos (1 x 10<sup>5</sup> células/cubreobjeto en 500 µl). Una vez que las células fueron sincronizadas (como se indicó más arriba, página 39), éstas fueron incubadas con medio DMEM-S-SFBA fresco solo (Control), con Cd<sup>2+</sup> (10<sup>-12</sup> - 10<sup>-6</sup> M) ó con E<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> M, control positivo de proliferación). Como las células adenohipofisarias tienen una tasa de proliferación relativamente baja, se eligió un tiempo incubación de 96 hs para la realización de estos estudios.

La BrdU (100 µM) fue agregada al cultivo 24 hs antes de la finalización de las incubaciones.

Al término de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS 1X (300 µl/pocillo) a 4 °C e inmediatamente fijadas con formaldehído 4% en PBS durante 30 minutos a 4 °C. Después de tres lavados con PBS a 4°C, las células fueron tratadas con HCl 6N + Tritón X-100 1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente (para desnaturalizar el ADN), lavadas tres veces con PBS, neutralizadas con borato de sodio 0,1 M + Tritón X-100 1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas dos veces con PBS e incubadas con

solución de bloqueo (5% de suero normal de la especie del segundo anticuerpo en PBS) durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego las células fueron incubadas con el primer anticuerpo anti-BrdU (1/200, hecho en ratón) durante la noche a 4 °C. Cumplido este tiempo, las células lavadas tres veces con PBS a temperatura ambiente fueron incubadas con el anticuerpo secundario FITC-Ab<sub>(conejo)</sub> αIgG (ratón) (1:250) durante 2 hs a 37 °C y posteriormente lavadas dos veces con PBS y una vez con agua destilada. Las células fueron montadas en una solución de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1 µg/ml, 1,4 diazabicyclooctano (DABCO) 23,3 mg/ml y 20 mM Tris-HCl (pH 8) en glicerol y seguidamente fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 (Japón). Fueron contadas al menos 300 células por cubreobjetos en campos elegidos al azar y fueron realizados tres experimentos independientes, analizando 4 cubreobjetos de cada tratamiento. El recuento fue realizado independientemente por dos personas. Los datos fueron expresados como: número de células en división/número total de células x 100 y representan el porcentaje total de células en división. Los experimentos subsiguientes fueron realizados a la concentración de Cd<sup>2+</sup> que produjo el mayor efecto sobre la proliferación celular en este punto, tanto para las células adenohipofisarias como para la línea GH3.

## ***2) Identificación del tipo celular en división***

Para identificar el/los tipos celulares adenohipofisarios que presentaron cambios en la proliferación celular por efecto del Cd<sup>2+</sup>, se realizaron inmunocitoquímicas dobles. Para ello, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares y sincronizadas de la misma forma que el punto anterior. Las células fueron incubadas con medio DMEM-S-SFBA fresco solo (Control), con Cd<sup>2+</sup> ó con E<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> M) durante 96 hs. La BrdU (100 µM) fue agregada al cultivo 24 hs antes de la finalización de las incubaciones. Al término de los tratamientos, las células adheridas a los cubreobjetos fueron lavadas con PBS 1X (300 µl/pocillo) a 4 °C e inmediatamente fijadas con formaldehído 4%

en PBS durante 30 minutos a 4 °C. Después de tres lavados con PBS a 4 °C, las células fueron tratadas con HCl 6N + Tritón X-100 1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas tres veces con PBS, neutralizadas con borato de sodio 0,1 M + Tritón X-100 1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas dos veces con PBS e incubadas con solución de bloqueo (5% de suero normal de la especie del segundo anticuerpo en PBS) durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego las células fueron incubadas con el primer anticuerpo específico para cada una de las hormonas adenohipofisarias estudiadas (PRL: 1/2500, GH: 1/2000, LH: 1/2500, hechos en cobayo), en diferentes cubreobjetos y todos los cubreobjetos con el anticuerpo anti-BrdU (1/200) durante la noche a 4 °C. Al finalizar, las células fueron lavadas tres veces con PBS a temperatura ambiente, incubadas con los anticuerpos secundarios durante 2 hs a 37 °C y posteriormente lavadas dos veces con PBS y una vez con agua destilada. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados en las siguientes diluciones: FITC-Ab<sub>(conejo)</sub> αIgG(ratón) (1:250) y TRITC-Ab<sub>(conejo)</sub> αIgG(cobayo) (1:100).

Las células fueron montadas y fijadas y se procedió a la observación, fotografía y conteo de la misma forma que en el punto anterior. Los datos fueron expresados como: células en división de un tipo celular/células totales del mismo tipo celular × 100 y representan el porcentaje de células en división de cada uno de los tipos celulares secretores estudiados.

### ***3) Determinación de la proliferación de las células GH3.***

Para los estudios de proliferación celular de la línea GH3, se procedió de igual manera que con el cultivo primario de células adenohipofisarias (punto 1) excepto que, debido a la alta tasa de proliferación de esta línea celular, el número de células sembradas fue  $1 \times 10^4$  células/cubreobjeto en 500 μl y la BrdU (10 μM) fue agregada al cultivo 3 hs antes de la finalización de las incubaciones. Luego las células fijadas, teñidas y montadas fueron observadas,

fotografiadas y contadas de la misma forma que se explicó para el cultivo primario (punto1).

Los datos fueron expresados como: células en división/células totales  $\times$  100 y representan el porcentaje de células de la línea GH3 en división.

## **RT-PCR semi-cuantitativa**

Con el fin de cuantificar los niveles de ARNm por RT-PCR semi-cuantitativa, las células adenohipofisarias fueron sembradas en placas de 6 pocillos (cultivo primario:  $2 \times 10^6$  células/pocillo en 2 ml; línea GH3:  $1 \times 10^6$  células/pocillo en 2 ml). Una vez finalizados los tratamientos, el medio fue descartado (o congelado a  $-20$  °C para otras determinaciones) y se procedió al aislamiento del ARN.

En el caso de los experimento *in vivo*, la extracción de la adenohipófisis y de una porción del hígado fue realizada en condiciones asépticas y con material de cirugía esterilizado. Se utilizaron agua y materiales descartables libres de ARNasa y ADNasa. La mesada y el resto de los elementos fueron limpiados con etanol 70%.

### ***Extracción de ARN***

Para la extracción de ARN proveniente de células en cultivo se agregaron 708  $\mu$ l de Trizol por pocillo. En el caso de los experimentos *in vivo*, las adenohipófisis y los trozos de hígado se homogeneizaron inmediatamente después de su remoción en forma individual en un homogeneizador de vidrio estéril conteniendo 500  $\mu$ l de Trizol. La suspensión obtenida en cada pocillo o la proveniente de un tejido fue colocada en un tubo Eppendorf. En ambos casos, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 150  $\mu$ l de cloroformo (células) ó 100  $\mu$ l (tejido) en cada tubo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a  $12.000 \times g$  a  $4$  °C. La fase acuosa obtenida fue traspasada a un tubo Eppendorf nuevo y al que se le agregó isopropanol (375  $\mu$ l para las células; 250

µl para los tejidos). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 minutos a 12.000 x g a 4 °C. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 750 µl (células) ó 500 µl (tejidos) de etanol 75%. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugaron 5 minutos a 7.500 x g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante por inversión, se dejó secar el pellet al aire por unos minutos y se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril. Los tubos se incubaron 10 minutos a 55-60 °C para la resuspensión del ARN aislado. Finalizada la incubación los mismos se colocaron rápidamente en hielo.

El contenido de ARN se cuantificó en una alícuota de cada tubo en un espectrofotómetro Shimatzu UV-265 (Kioto, Japón) midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación  $Abs_{260}/Abs_{280}=1.8-2$  la cual permite confirmar la ausencia de contaminación con proteínas. El ARN aislado fue guardado a -80 °C hasta su posterior procesamiento a ADN complementario (ADNc). La Figura 11 resume los pasos seguidos para la extracción del ARN de las muestras provenientes de las células en cultivo o de los tejidos estudiados.

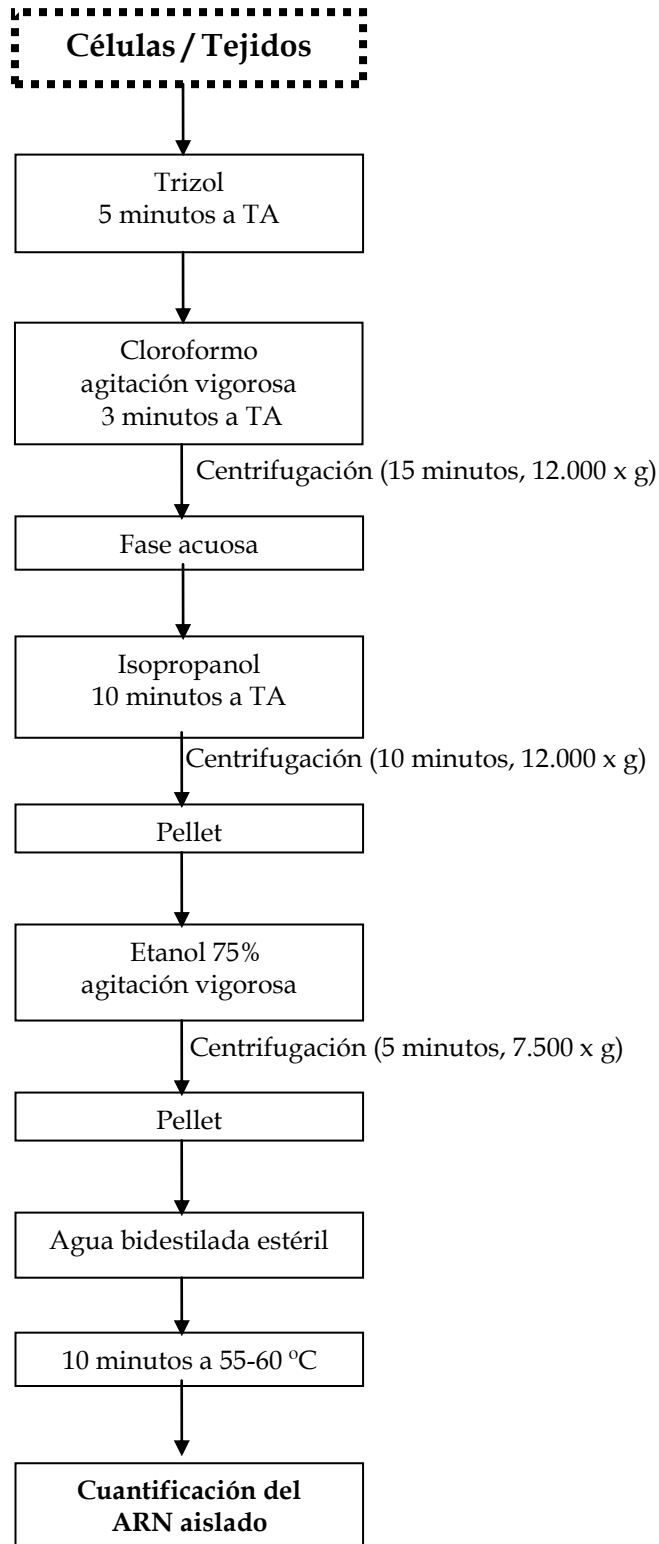


Figura 11: Esquema de la extracción de ARN.

### ***Síntesis de ADNc para la retro transcripción***

La síntesis del ADNc fue realizada en un termociclador Mastercycler Eppendorf (Hamburg, Alemania) para la cual se utilizaron 5 µg de ARN total. El ARN fue incubado con 1 µl de "Random primers" 250 ng/µl, 1 µl de mezcla de dNTPs 10 mM y agua libre de ARNasa c.s.p. 13 µl durante 5 minutos a 65 °C. La retro transcripción se realizó en 20 µl de la siguiente mezcla de reacción: 13 µl de la mezcla anterior, 4 µl de buffer de síntesis de la primera cadena (*first-strand buffer*) 5X, 2 µl de DTT 5.5 mM y 1 µl de transcriptasa reversa de virus de leucemia murina (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT, 3,125 U) a 37 °C durante 50 minutos. La enzima fue inactivada por calentamiento a 70 °C 15 minutos. Los tubos fueron guardados a -20 °C hasta la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### ***PCR semi-cuantitativa***

La amplificación del ADNc se realizó en un termociclador Mastercycler Eppendorf (Hamburg, Alemania). La reacción de PCR contenía: 2 µl de ADNc, 10 µl buffer Go Taq 5X, 1 µl de mezcla de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada primer 10 µM (Tabla 2 y 3), 0,25 µl ADN polimera (Go Taq, 0,625 U) y agua estéril c.s.p. 50 µl.

La técnica de RT-PCR semi-cuantitativa permite detectar cambios relativos en la expresión del ARNm. Como es necesario que las determinaciones se realicen dentro del rango lineal de amplificación, en primer lugar se realizaron curvas de amplificación para encontrar el número óptimo de ciclos de amplificación para cada gen de interés. Este número fue diferente para cada uno de genes estudiados. Las reacciones de PCR fueron realizadas en las condiciones que se describen en la Tabla 2 (A: cultivo primario; B: células GH3) y en la Tabla 3 (experimentos *in vivo*).



**A**

Gen	Activación de la polimerasa	Cantidad de ciclos	Esquema de ciclos	Elongación final
Ciclina D1 (Cyc D1)	5 minutos, 95 °C	50	1 minuto, 94 °C 1 minuto, 60 °C 2 minutos, 72 °C	10 minutos, 72 °C
Ciclina D3 (Cyc D3)	5 minutos, 95 °C	38	1 minuto, 94 °C 1 minuto, 60 °C 2 minutos, 72 °C	10 minutos, 72 °C
RE $\alpha$	5 minutos, 95 °C	40	30 segundos, 95 °C 45 segundos, 55 °C 40 segundos, 72 °C	5 minutos, 72 °C
PRL	10 minutos, 95 °C	38	30 segundos, 95 °C 60 segundos, 56 °C 45 segundos, 72 °C	10 minutos, 72 °C
c-fos	5 minutos, 94 °C	42	30 segundos, 94 °C 30 segundos, 60 °C 45 segundos, 74 °C	10 minutos, 74 °C

**B**

Gen	Activación de la polimerasa	Cantidad de ciclos	Esquema de ciclos	Elongación final
Cyc D1	5 minutos, 95 °C	50	1 minuto, 94 °C 1 minuto, 60 °C 2 minutos, 72 °C	10 minutos, 72 °C
Cyc D3	5 minutos, 95 °C	30	1 minuto, 94 °C 1 minuto, 60 °C 2 minutos, 72 °C	10 minutos, 72 °C

Tabla 2: Protocolos de PCR utilizados con las muestras de los experimentos *in vitro* (A: cultivo primario; B: células GH3).

Gen	Activación de la polimerasa	Cantidad de ciclos	Esquema de ciclos	Elongación final
HO-1 y NOS1	2 minutos, 94 °C	40	30 segundos, 94 °C 60 segundos, 55 °C 45 segundos, 72 °C	10 minutos, 72 °C
MT-1	2 minutos, 94 °C	40	60 segundos, 94 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos, 72 °C	10 minutos, 72 °C

**Tabla 3: Protocolos de PCR utilizados con las muestras de los experimentos *in vivo* (para los dos tejidos).**

Como control de expresión se utilizó el gen constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, ver primers en la Tabla 2 y 3). La PCR de GAPDH se realizó siempre antes que las otras PCRs de modo tal de chequear la integridad del ADNc sintetizado y la ausencia de contaminación con ADN genómico. La reacción de PCR de la GAPDH fue realizada en las siguientes condiciones (Tabla 4):

	Activación de la polimerasa	Cantidad de ciclos	Esquema de ciclos	Elongación final
Experimentos <i>in vitro</i>	2 minutos, 94 °C	30	30 segundos, 94 °C 60 segundos, 55 °C 45 segundos, 72 °C	10 minutos, 72 °C
Experimentos <i>in vivo</i>	2 minutos, 94 °C	ADH: 30 HÍG: 26	30 segundos, 94 °C 60 segundos, 55 °C 45 segundos, 72 °C	10 minutos, 72 °C

**Tabla 4: Protocolos de PCR de la GAPDH utilizados con las muestras de los experimentos *in vitro* e *in vivo* (ADH: adenohipófisis; HÍG: hígado).**

Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 2% teñidos con el colorante bromuro de etidio o con el "SYBR safe DNA gel stain". Las bandas obtenidas fueron visualizadas en el Foto/Analyst Investigador-PC Foto/Eclipse y la densitometría de las mismas fue realizada con el programa Gel Pro Analyzer 3.1.

Con el fin de realizar la comparación estadística, los valores de la densitometría obtenidos de cada uno de los genes estudiados para cada muestra, fueron normalizados a los valores de la densitometría de la GAPDH para dicha muestra. Los resultados fueron expresados como porcentaje de las células control.

Los “primers” fueron diseñados utilizando el software Primer3 del instituto Whitehead ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Para confirmar la especificidad de los primers, éstos fueron analizados frente a una base no redundante de secuencias génicas de rata empleando la aplicación BLAST del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Las secuencias de los primers y el tamaño de los productos de amplificación se muestran en las Tablas 5 y 6.

Gen	Primer	Tamaño del producto (pb)
<b>Cyc D1</b>	Izquierdo 5' CGCCCTCCGTTTCTTACTTCA 3'	255
<b>Cyc D1</b>	Derecho 5' AACTTCTCGGCAGTCAGGGGA 3'	
<b>Cyc D3</b>	Izquierdo 5' GCGTCCCCACCCGAAAGGCG 3'	386
<b>Cyc D3</b>	Derecho 5' TAGAGCAGGCACCCAGGCCT 3'	
<b>RE<math>\alpha</math></b>	Izquierdo 5' TCCACGATCAAGTTCACC 3'	311
<b>RE<math>\alpha</math></b>	Derecho 5' GGATGTGGTCCTTCTCTT 3'	
<b>PRL</b>	Izquierdo 5' AGCCAAGTGTGTCAGCCCGGAAAG 3'	237
<b>PRL</b>	Derecho 5' TGGCCTTGGCAATAAACTCACGA 3'	
<b>c-fos</b>	Izquierdo 5' CCAACTTTATCCCCACGGTGAC 3'	381
<b>c-fos</b>	Derecho 5' TGGCAATCTCGGTCTGCAAC 3'	
<b>GAPDH</b>	Izquierdo 5' TGCACCACCAACTGCTTA 3'	176
<b>GAPDH</b>	Derecho 5' GGATGCAGGGATGATGTTTC 3'	

**Tabla 5: Primers utilizados para estudiar la expresión de ARNm de los experimentos in vitro por RT-PCR.**

Gen	Primer	Tamaño del producto (pb)
<b>HO-1</b>	Izquierdo 5' TGCTCGCATGAACACTCTG 3'	123
<b>HO-1</b>	Derecho 5' TCCTCTGTCAGCAGTGCC 3'	
<b>MT-1</b>	Izquierdo 5' GAATTCCGTTGCTCCAGATTCACCAGATC 3'	327
<b>MT-1</b>	Derecho 5' GAATTCTCACATGCTCGGTAGAAAACGG 3'	
<b>NOS-1</b>	Izquierdo 5' ATCGGCGTCCGTGACTACTG 3'	92
<b>NOS-1</b>	Derecho 5' TCCTCATGTCCAAATCCATCTTCTTG 3'	
<b>GAPDH</b>	Izquierdo 5' TGCACCACCAACTGCTTA 3'	176
<b>GAPDH</b>	Derecho 5' GGATGCAGGGATGATGTTC 3'	

**Tabla 6: Primers utilizados para estudiar la expresión de ARNm de los experimentos in vivo por RT-PCR.**

## Radioinmunoensayo (RIA)

Las determinaciones de las hormonas se realizaron en muestras del medio de incubación de los cultivos (experimentos *in vitro*) o en muestras de suero obtenidas de sangre troncal (experimentos *in vivo*). En el momento de la decapitación la sangre troncal fue recolectada en tubos e incubada a temperatura ambiente por 3 hs para permitir su coagulación. Los tubos fueron centrifugados 2500 rpm durante 30 minutos. El suero obtenido fue congelado a -20 °C hasta la realización del RIA.

Como diluyente de las muestras, del estándar y de la hormona radioactiva se utilizó PBS con BSA al 1% pH 7,6 (PRL) o PBS con albúmina de huevo 1% pH 7,4 (LH). Como diluyente para el primer anticuerpo se utilizó PBS-EDTA 25 mM con suero normal de conejo (NRS) al 1%. El volumen final del ensayo fue 400 µl que incluía 50 µl de muestra, 150 µl de PBS, 100 µl de primer anticuerpo y 100 µl de hormona marcada (12.000-15.000 cpm) y se incubó durante 48 horas a 4 °C. Cumplido este tiempo, se agregaron 100 µl de una solución de suero de cabra anti-gammaglobulina de conejo (1/20) en PBS pH 7,6 (2 hs a temperatura ambiente). Las muestras fueron coprecipitadas con 1 ml de una solución al 6% de polietilenglicol (PEG, peso molecular promedio: 4000, Fluka) en PBS pH 7,6 durante 2 hs a 4 °C y centrifugadas durante 30 minutos a 2500 rpm. La radioactividad del pellet fue cuantificada en un

contador gamma. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores al 10%.

## **Western blot**

### *Obtención de la muestra proteica*

Para los ensayos de Western blot las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos ( $2 \times 10^6$  células/pocillo en 2 ml). Completados los tratamientos, las células fueron resuspendidas por medios mecánicos en buffer KRB-CMF pH 7,2-7,3. Las células provenientes de 2 pocillos ( $4 \times 10^6$  células) bajo el mismo tratamiento fueron resuspendidas, colocadas en un tubo Falcon y centrifugadas 10 minutos a  $1000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . El pellet fue resuspendido en 100  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (Hepes 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,1%, pepstatina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y PMSF 1 mM), homogeneizado en un sonicador Branson Sonifier (VWR Scientific) durante 10 segundos a potencia 4, en hielo, y luego centrifugado durante 20 minutos a  $10000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . Una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante fue utilizada para la cuantificación de proteínas en la muestra. El resto del sobrenadante fue guardado a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### *Separación de las proteínas e inmunodetección*

Un total de 50 - 80  $\mu\text{g}$  de proteína por muestra fue incubado en buffer Laemmli (Tris-HCl 0,25 M, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% y  $\beta$ -mercaptoetanol 4%, pH 6,8) durante 5 minutos en bloque seco a  $100^\circ\text{C}$  y sembrado en un gel desnaturalizante de Acrilamida-Bisacrilamida 10% (10% SDSPAGE, para el RE $\alpha$ ) ó 12% (12% SDSPAGE, para la Cyc D1). La electroforesis se realizó a 120 volts durante 1,5 - 2 hs. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Immobilion-P) y bloqueadas durante 1-1,5 hs a temperatura ambiente con agitación en 50 ml de solución de bloqueo (5% leche descremada en buffer en PBS). Luego las membranas fueron incubadas con 5 - 10 ml de anticuerpo primario, diluído en

solución de bloqueo, toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron lavadas 3 veces (por 10 minutos) con buffer PBS - Tween-20 0,05% (T-PBS) e incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa diluidos en buffer T-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. La inmunodetección se realizó con una solución de diaminobenzidina conteniendo peróxido de hidrógeno 0,01%.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

-anticuerpo policlonal anti Cyc D1 hecho en conejo (sc-753, Santa Cruz) en una dilución final de 1/500.

-anticuerpo policlonal anti RE $\alpha$  hecho en conejo (sc-542, Santa Cruz) en una dilución 1/500.

-anticuerpo anti actina hecho en conejo (A2066, Sigma) en una dilución 1/1000.

El anticuerpo secundario utilizado fue: anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa provisto por Sigma (A9169, 1/2000) o por Jackson (111-035-003, 1/5000).

Las membranas reveladas se escanearon y la imagen digital de las bandas se densitómetró con el programa Gel Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD, USA). Para poder realizar la comparación estadística, los resultados de la densitometría de RE $\alpha$  o Cyc D1 de cada muestra fueron normalizados con aquellos de la actina correspondiente a dicha muestra. Los resultados fueron expresados como porcentaje de las células control.

## **Determinación de proteínas**

El dosaje de proteínas en las muestras fue realizado por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

## **Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SE) y evaluados mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer o la de Student-Newman-Keuls o por la prueba de Dunnett, según fueron requeridas. Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas cuando el p fue menor a 0,05. Los datos fueron confirmados mediante la realización de por lo menos tres experimentos independientes.

Las distintas pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el software Graphpad Instat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## ***4. Estudio de posibles tratamientos que reviertan los efectos del Cd<sup>2+</sup> a nivel adenohipofisario.***

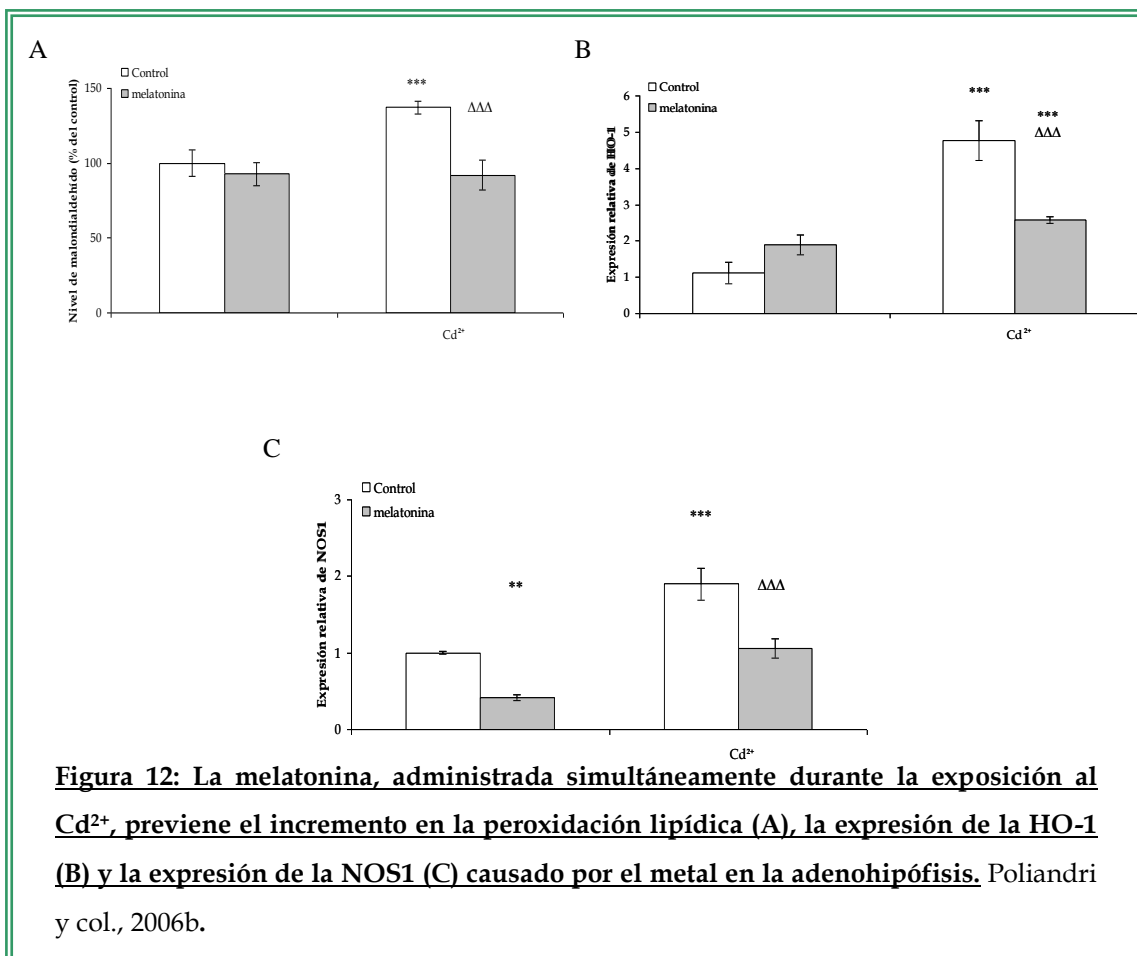
### ***4.1. Objetivo***

Evaluar si el tratamiento *a posteriori* con melatonina o la interrupción de la exposición al metal revierten el estrés oxidativo y los cambios en la secreción hormonal inducidos por la exposición crónica al Cd<sup>2+</sup> *in vivo* a nivel adenohipofisario.



## 4.2. Resultados

Hasta el momento la mayoría de los estudios sobre toxicidad de metales apuntan a disminuir los efectos tóxicos de los mismos aplicando diferentes tratamientos preventivos o simultáneos a la intoxicación con el metal (Kumar y col., 2009; Messaoudi y col., 2009). En este sentido, resultados previos de nuestro grupo (Figura 12) mostraron que el estrés oxidativo generado a nivel adenohipofisario por la administración de  $\text{Cd}^{2+}$  (5 ppm) durante 30 días en el agua de bebida, es impedido si conjuntamente se lo suministra con melatonina (Poliandri y col., 2006b). Esta neurohormona ha sido utilizada con éxito como antioxidante en diversos estudios (Reiter y col., 2003; Guenther y col., 2005).



El tratamiento simultáneo o previo a la exposición, es importante como medida preventiva, especialmente en los casos de contaminación ocupacional con metales, pero no sería válido en poblaciones que puedan estar expuestas al agua o alimentos contaminados sin saberlo. En estas poblaciones expuestas al  $Cd^{2+}$  u a otros metales tóxicos, las manifestaciones clínicas de la intoxicación solo se hacen evidentes luego un período de latencia durante el cual se fue produciendo la acumulación del metal en el organismo. Por lo tanto nos pareció sumamente importante conocer si un tratamiento *a posteriori* de la exposición crónica al  $Cd^{2+}$  puede revertir los efectos tóxicos del mismo.

Con este interrogante en mente, investigamos si un tratamiento *a posteriori* con melatonina o el cese de la exposición al metal son capaces de revertir el estrés oxidativo y los cambios en la secreción hormonal inducidos por la exposición crónica al  $Cd^{2+}$  *in vivo* en la adenohipófisis. Siendo esta glándula en la rata muy sensible a este metal, los resultados de este estudio podrían ser extrapolados a otros animales como el hombre y servir como base para un tratamiento efectivo.

#### **4.2.1. Efecto de los tratamientos *a posteriori* de la exposición crónica al Cd<sup>2+</sup> sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo en la adenohipófisis.**

Con el objetivo de evaluar si un tratamiento *a posteriori* con melatonina o el cese de la exposición al metal son capaces de revertir el estrés oxidativo inducido por el Cd<sup>2+</sup> en la adenohipófisis, los animales fueron expuestos al Cd<sup>2+</sup> en el agua de bebida por un mes y a continuación tratados con melatonina (Cd<sup>2+</sup>/Mel) o con agua en ausencia del metal (Cd<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O) por otro mes. Con fines comparativos, utilizamos la misma la concentración de Cd<sup>2+</sup> (5 ppm) empleada en los estudios previos de nuestro grupo (Poliandri y col., 2006b). Esta concentración es la mínima que induce cambios en los niveles séricos de las hormonas adenohipofisarias (Lafuente y col., 2003) y en los marcadores de estrés oxidativo (Poliandri y col., 2006b) en la adenohipófisis. Además permite simular el tipo más común de exposición humana a este metal, una dosis baja y prolongada o crónica. La concentración de melatonina se eligió considerando la dosis que se emplea para los tratamientos clínicos en humanos (3 mg/día). Finalizados los tratamientos, se determinaron algunos marcadores de estrés oxidativo en la adenohipófisis.

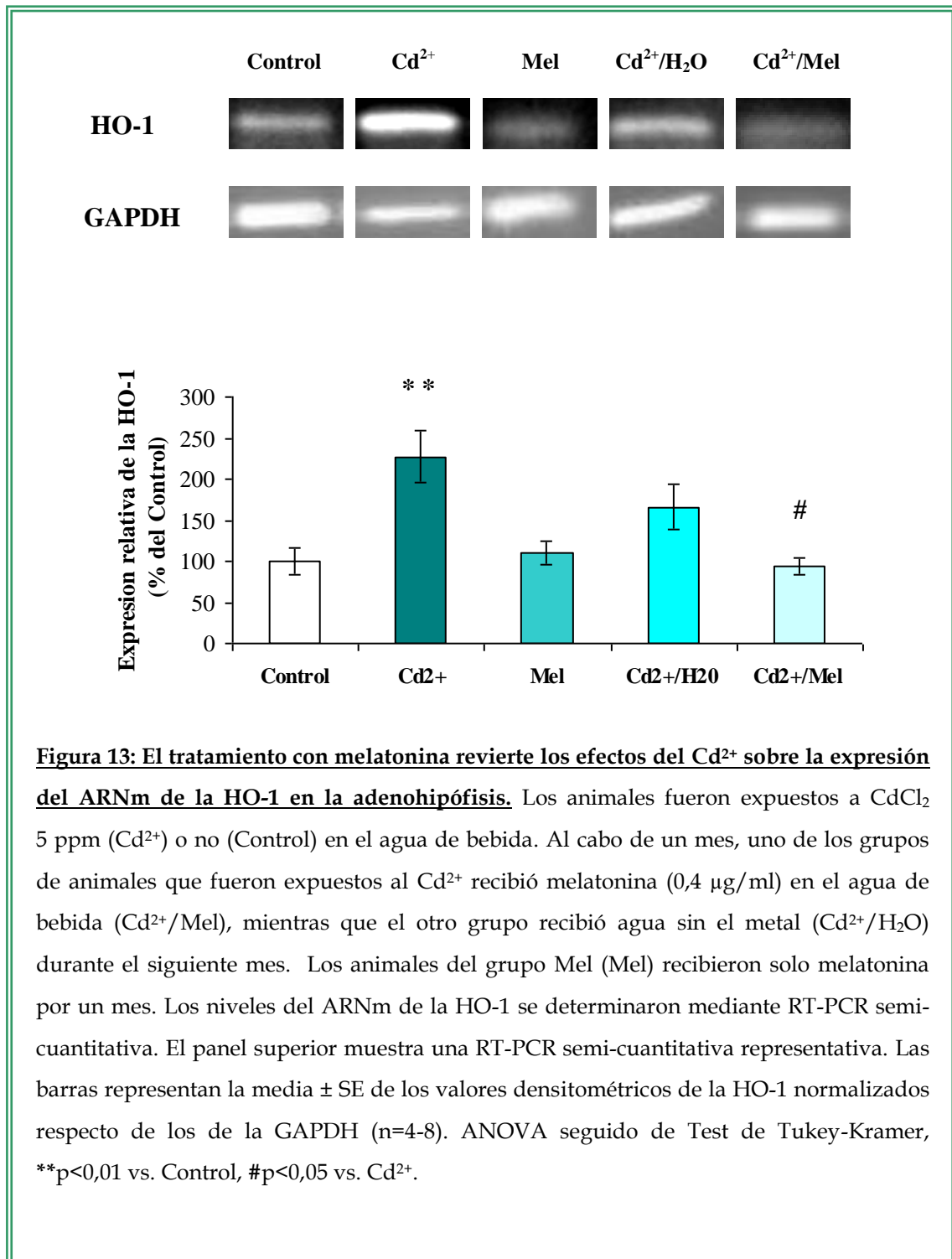
##### **4.2.1.1. El tratamiento *a posteriori* con melatonina y el cese de la exposición al metal revierten los efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre la expresión del ARNm de la HO-1.**

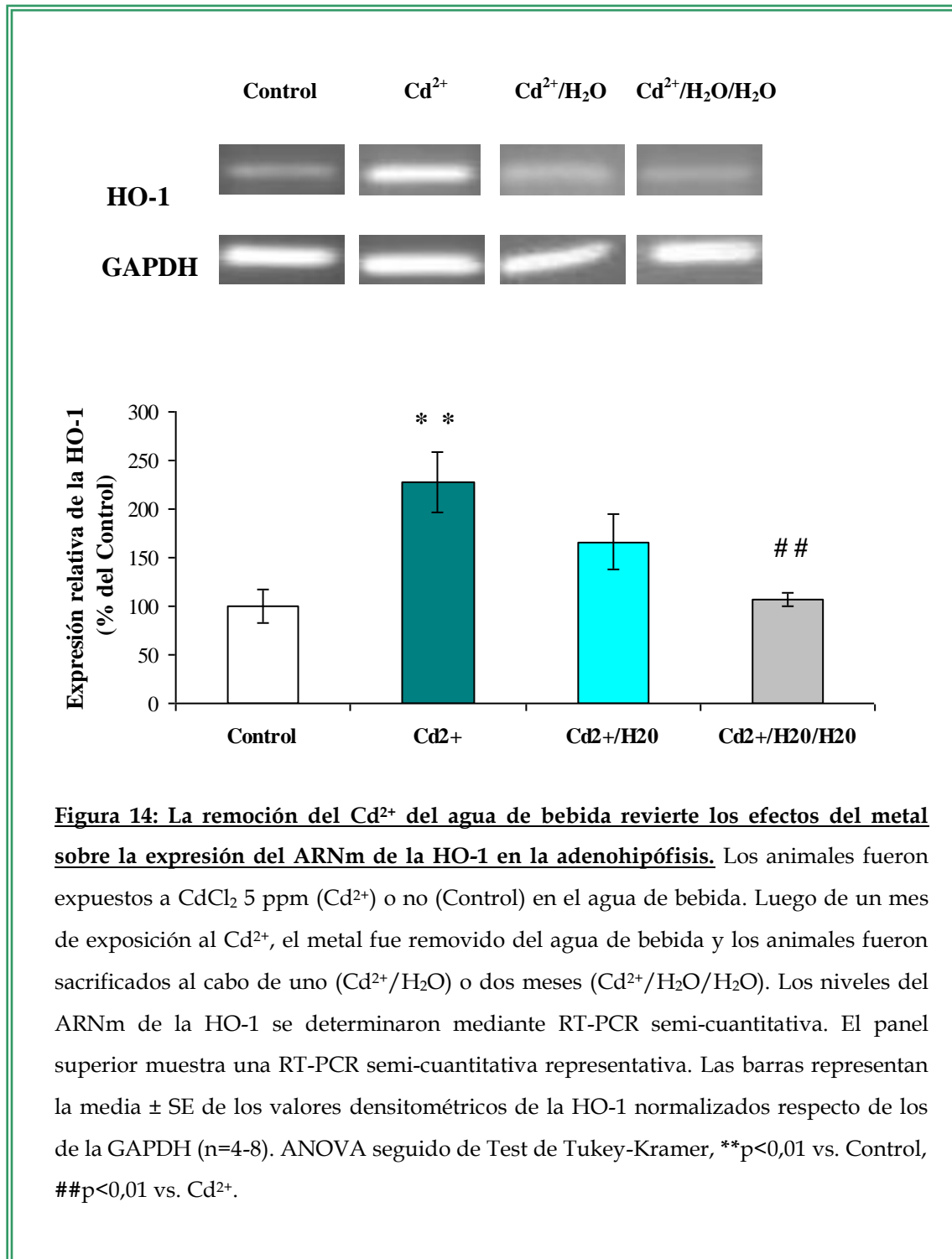
La HO-1 es la enzima responsable de la degradación del grupo hemo en hierro libre, biliverdina y monóxido de carbono (Morse y Choi, 2002). Esta enzima forma parte de la batería antioxidante de las células y es fuertemente inducida durante la generación de estrés oxidativo, por lo que se la utiliza con frecuencia como un marcador de esta condición (Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004). Para determinar si el tratamiento *a posteriori* con melatonina o el cese de la exposición al metal eran capaces de revertir el estrés oxidativo inducido

por el  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel adenohipofisario, determinamos los efectos del metal sobre la expresión del ARNm de la enzima HO-1 en la adenohipófisis mediante RT-PCR semi-cuantitativa.

La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  por un mes produjo un aumento significativo de la expresión del ARNm de la HO-1 en la adenohipófisis (**Figura 13**), confirmando nuestros resultados previos (**Figura 12**, Poliandri y col., 2006b). El tratamiento con melatonina, luego de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{Cd}^{2+}/\text{Mel}$ ), fue efectivo en reducir la expresión de la HO-1 hasta los niveles basales del control, mientras que la melatonina por si sola (Mel) no modificó la expresión basal de la HO-1. Los animales expuestos por un mes al  $\text{Cd}^{2+}$  y luego un mes a agua sin el metal ( $\text{Cd}^{2+}/\text{H}_2\text{O}$ ) se utilizaron como controles del grupo  $\text{Cd}^{2+}/\text{Mel}$  en estos experimentos. Dicho grupo mostró una reversión parcial del aumento de la expresión de la HO-1 inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$  (**Figura 13**).

Teniendo en cuenta este último resultado, nos preguntamos si se requería más tiempo sin el metal para obtener una reversión total de los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$ . En este caso los animales fueron expuestos por un mes al  $\text{Cd}^{2+}$  en el agua de bebida y a continuación dos meses con agua sin el metal. Como se puede ver en la **Figura 14**, dos meses en ausencia del metal ( $\text{Cd}^{2+}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ ) fueron suficientes para revertir completamente los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la expresión del ARNm de la HO-1.



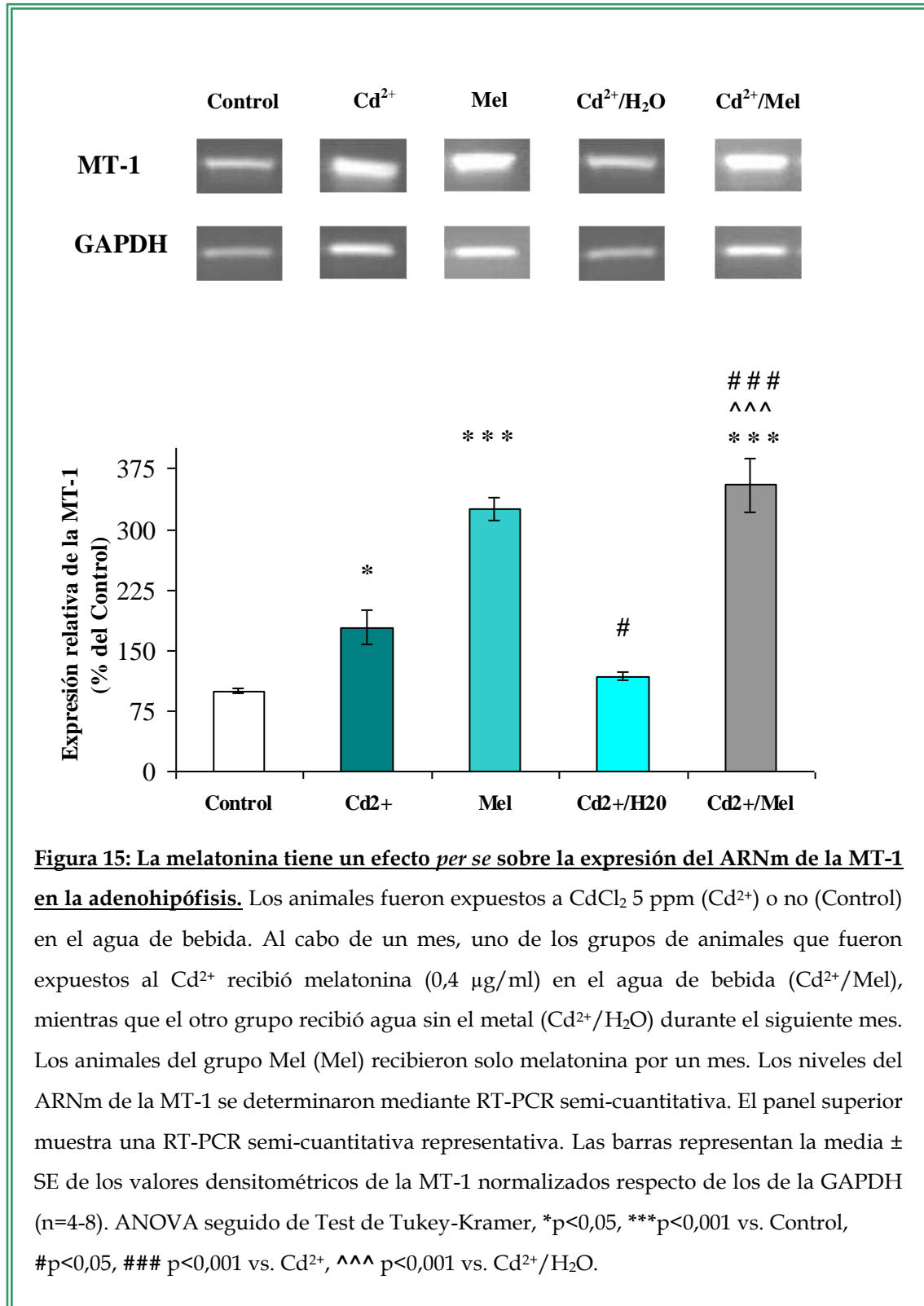


#### **4.2.1.2. La melatonina tiene un efecto *per se* sobre la expresión del ARNm de la MT-1.**

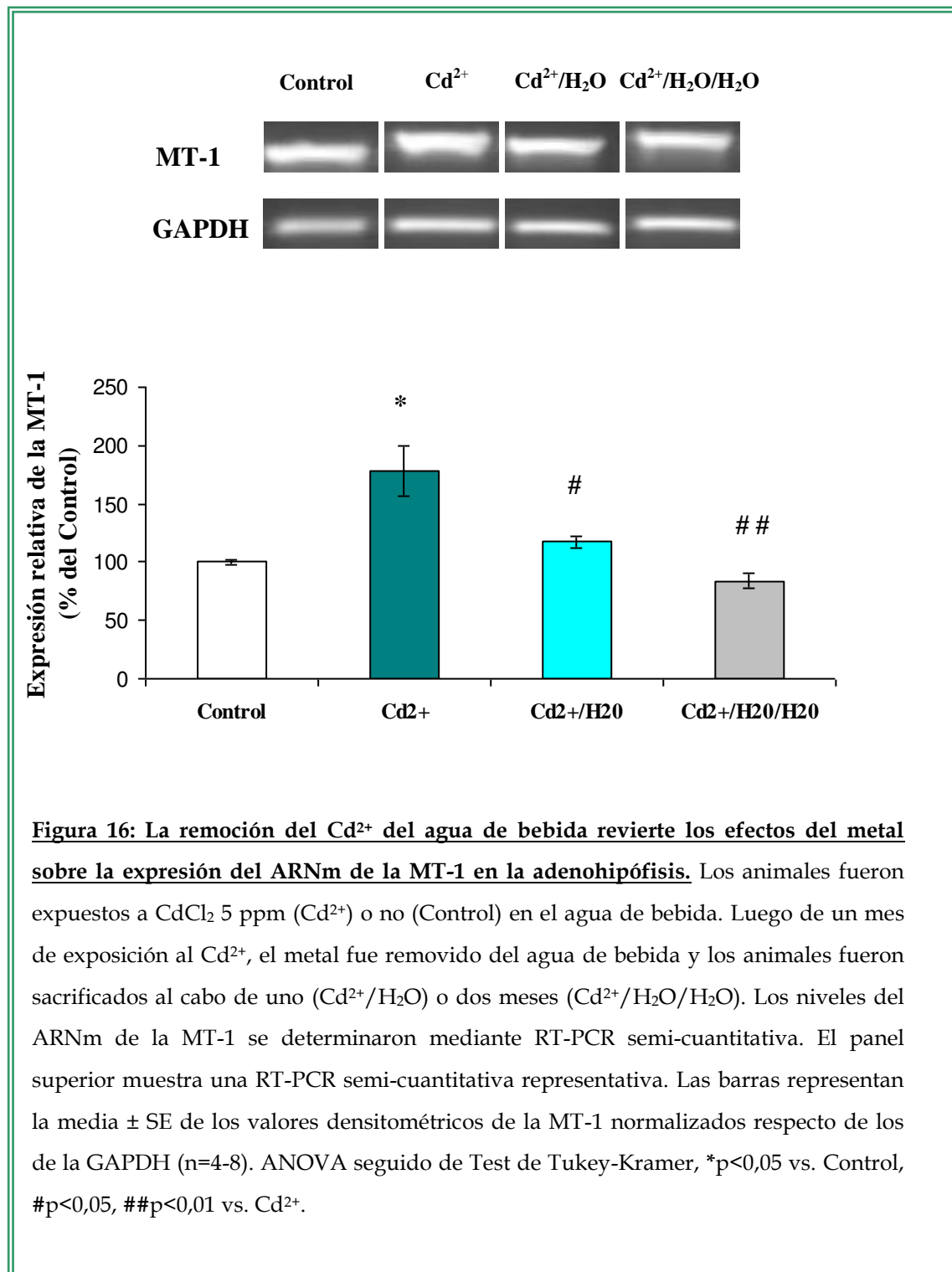
**El cese de la exposición al metal revierte los efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre la expresión de la MT-1.**

Las MTs constituyen una familia de proteínas cuya transcripción génica es rápidamente inducida por estrés oxidativo (Andrews, 2000). Estas proteínas son conocidas como secuestradoras (“scavengers”) de radicales libres y metales (Nath y col., 1988; Vallee, 1995; Ebadi y col., 1996). Dado el papel del Cd<sup>2+</sup> como inductor de estrés oxidativo en la adenohipófisis, se examinaron los efectos del metal sobre los niveles del ARNm de las MTs mediante RT-PCR semi-cuantitativa en dicho tejido. La exposición al Cd<sup>2+</sup> aumentó significativamente la expresión del ARNm de la MT-1 en la adenohipófisis (**Figura 15**). El tratamiento con melatonina (Mel), produjo un aumento aún mayor que el del Cd<sup>2+</sup> en la expresión del ARNm de la MT-1. Este resultado sugiere que la melatonina tiene un efecto *per se* sobre la expresión de la MT-1 y que puede tener relación con su papel antioxidante, estimulando la expresión de éste y otros elementos protectores (Rodríguez y col., 2004). Este efecto de la melatonina se observa aún en el grupo de los animales expuestos previamente al Cd<sup>2+</sup> (Cd<sup>2+</sup>/Mel).

Además, se estudió la expresión de la MT-1 uno y dos meses después del cese de la exposición al Cd<sup>2+</sup>. Como podemos ver en la **Figura 16**, a ambos tiempos se produce una reversión total del efecto del metal sobre la expresión del mensajero de la MT-1, indicando que un mes (Cd<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O) fue suficiente para revertir dicho efecto en la adenohipófisis.







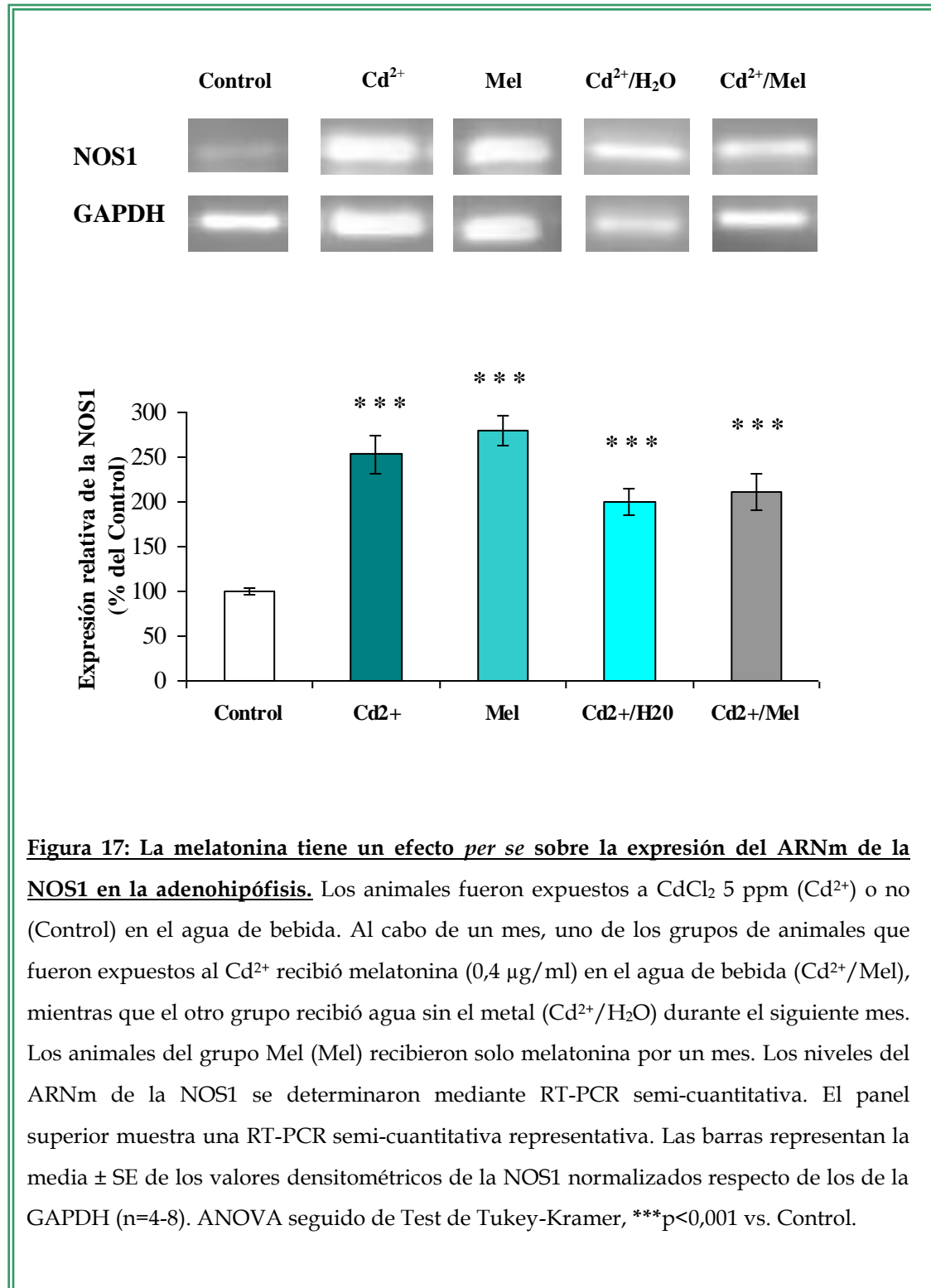
#### 4.1.2.3. La melatonina tiene un efecto *per se* sobre la expresión del ARNm de la NOS1.

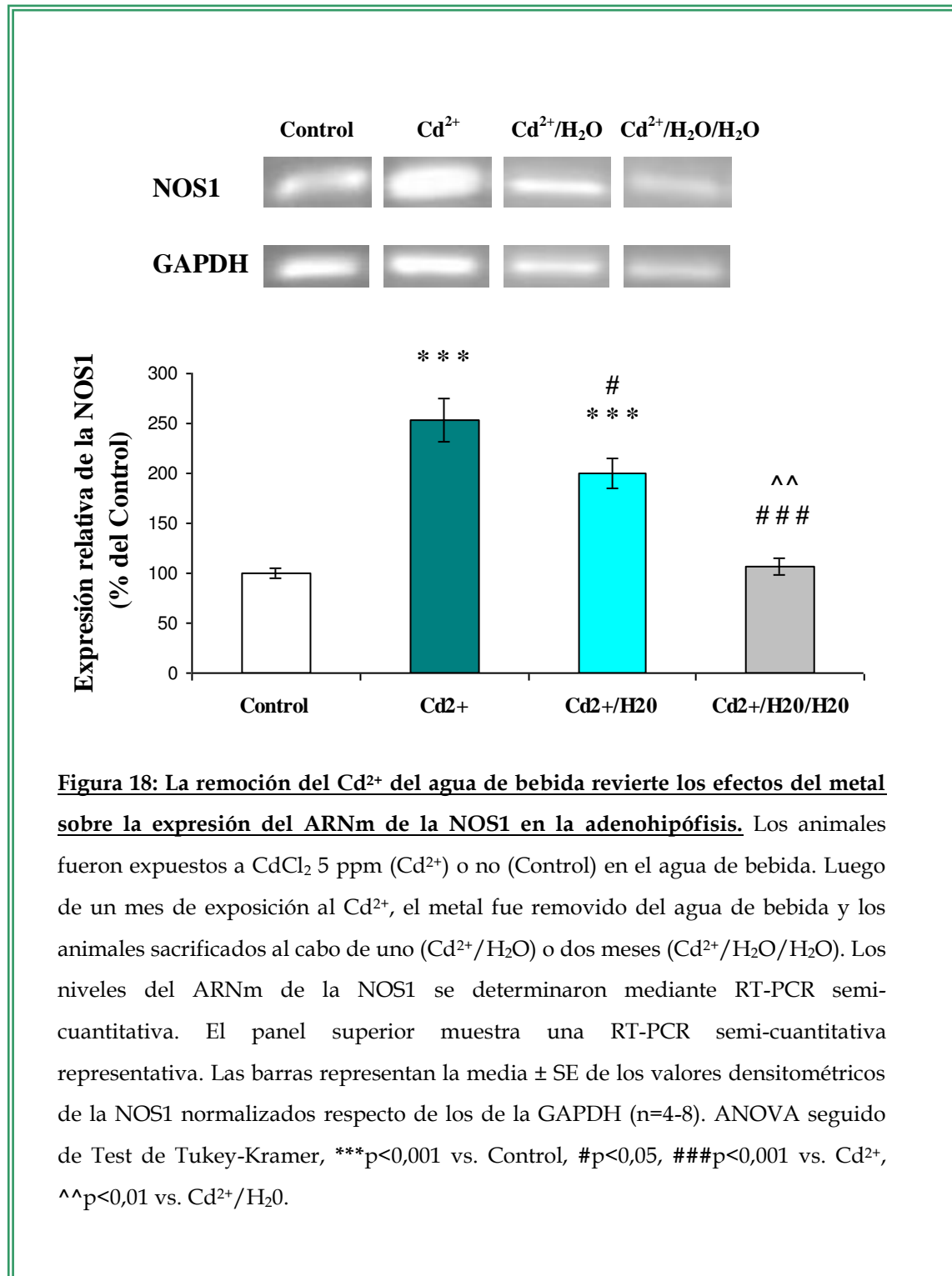
**El cese de la exposición al metal revierte los efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre la expresión de la NOS1.**

Como se mencionó anteriormente, el NO es un importante regulador neuroendocrino (Rivier, 2001). La isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (NOS1) interviene en la regulación de la liberación hormonal (Brann y col., 1997). El NO también puede actuar como un antioxidante (Katakai y col., 2001; Liu y col., 2004; Itoh y col., 2005; Poliandri y col., 2006a).

Como podemos ver en la **Figura 17**, el Cd<sup>2+</sup> causó un aumento significativo de la expresión de la enzima en la adenohipófisis, confirmando nuestros resultados previos (Poliandri y col., 2006b). Al igual de lo sucedido con la expresión de la MT-1, podemos observar que el tratamiento *a posteriori* con melatonina incrementó por sí mismo la expresión del ARNm de la NOS1 en la adenohipófisis, efecto que persiste aún en los animales previamente expuestos al Cd<sup>2+</sup>. Este resultado sugiere que la melatonina tiene un efecto *per se* sobre la expresión de la NOS1 en la adenohipófisis, similar al observado para la MT-1 (**Figura 15**).

La administración de agua libre del metal, luego de un mes de exposición al Cd<sup>2+</sup>, produjo una reducción parcial en los niveles del ARNm de la NOS1 (Cd<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O), efecto que fue total al cabo de dos meses (Cd<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O) (**Figura 18**), indicando que se requerirían dos meses para revertir totalmente el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la expresión de la NOS1.





#### **4.2.2. Efecto de los tratamientos *a posteriori* de la exposición crónica al Cd<sup>2+</sup> a nivel hepático.**

**La exposición crónica al Cd<sup>2+</sup> no modifica la expresión del ARNm de la HO-1, la MT-1 ni de la NOS1 en el hígado.**

La toxicidad del Cd<sup>2+</sup> ha sido ampliamente estudiada en el hígado dado que este tejido era considerado uno de los más sensibles al metal (Vallee, 1995; Satarug y col., 2003). Teniendo en cuenta esto, se utilizó al hígado como control positivo del efecto del metal en nuestros experimentos. Sin embargo, bajo nuestras condiciones de trabajo, la administración del Cd<sup>2+</sup> no afectó la expresión del ARNm de ninguno de los parámetros estudiados (HO-1, MT-1 y NOS1) en este tejido (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que, a las dosis utilizadas en nuestros experimentos, la adenohipófisis es más sensible que el hígado en la respuesta al estrés oxidativo inducido por el metal.

### 4.2.3. Efecto de los tratamientos *a posteriori* de la exposición crónica al Cd<sup>2+</sup> sobre los niveles séricos de PRL y LH.

**El cese de la exposición al Cd<sup>2+</sup> revierte los efectos del metal sobre los niveles séricos de PRL y LH.**

Existen evidencias que muestran que la exposición *in vivo* al Cd<sup>2+</sup> altera la secreción hormonal (Lafuente y col., 2003; Henson y Chedrese, 2004; Poliandri y col., 2006b). Con el fin de determinar si el cese de la exposición al Cd<sup>2+</sup> *in vivo* revierte los efectos del metal sobre la secreción de PRL y LH, se cuantificaron sus niveles en suero mediante RIA. La **tabla 7** muestra que la exposición al Cd<sup>2+</sup> disminuyó los niveles séricos de PRL y de LH, confirmando los resultados previos. Luego de un mes de finalizada la exposición al Cd<sup>2+</sup> (Cd<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O) se revirtieron completamente los efectos del metal sobre la secreción hormonal.

**Tabla 7: La remoción del Cd<sup>2+</sup> del agua de bebida revierte los efectos del metal sobre los niveles séricos de PRL y LH.**

	<b>PRL (ng/ml)</b>	<b>LH (ng/ml)</b>
<b>Control</b>	18,7 ± 5,0	62,4 ± 10,6
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	6,3 ± 0,5 *	15,3 ± 6,3 *
<b>Cd<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O</b>	23,5 ± 2,8 #	64,3 ± 13,3 #

Los animales fueron expuestos a CdCl<sub>2</sub> 5 ppm (Cd<sup>2+</sup>) o no (Control) en el agua de bebida. Luego de un mes de exposición al Cd<sup>2+</sup>, el metal fue removido del agua de bebida y los animales fueron sacrificados al cabo de un mes (Cd<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O). Los niveles séricos de PRL y de LH fueron medidos por RIA y su concentración se expresó en ng/ml (n=3-4); ANOVA seguido de Test de Student-Newman-Keuls (PRL) o Tukey-Kramer (LH), \*p<0,05 vs. Control, #p<0,05 vs. Cd<sup>2+</sup>.

Existe información bibliográfica de que la melatonina tiene un efecto *per se* sobre los niveles séricos de las hormonas adenohipofisarias (Falcón y col., 2003; Poliandri 2006b). Por esta razón, y para no generar confusión, en este trabajo de tesis decidimos no incorporar la evaluación de su efecto sobre los niveles séricos de PRL y LH luego de la exposición al Cd<sup>2+</sup>.

## ***Experimentos In vivo-Conclusiones***

### ➤ **La exposición crónica al Cd<sup>2+</sup> *in vivo***

- Induce estrés oxidativo en la adenohipófisis  
Aumenta la expresión del mensajero de la HO-1 y de la MT-1
- Incrementa la expresión del mensajero de la NOS1
- Reduce los niveles séricos de PRL y LH

### ➤ **La melatonina**, administrada *a posteriori* de la exposición al Cd<sup>2+</sup>

- Revierte totalmente el efecto de este metal sobre la expresión del mensajero de la HO-1
- Tiene un efecto *per se* sobre la expresión del ARNm de la MT-1 y de la NOS1

➤ El cese de la exposición al metal por si solo es suficiente para revertir los efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre:

- Los marcadores de estrés oxidativo
- La NOS1
- Los niveles séricos de PRL y LH



### 4.3. *Discusión*

El  $\text{Cd}^{2+}$  es un metal pesado que produce numerosos efectos tóxicos en los organismos, constituyendo un serio problema ecológico. Su nivel en el medio ambiente está en incremento constante como resultado de las prácticas industriales y agrícolas (Satarug y col., 2003). El  $\text{Cd}^{2+}$  reúne cuatro de las características más temidas de un tóxico: i) efectos adversos para el hombre y el medio ambiente, ii) bioacumulación, iii) persistencia en el medio ambiente y iv) dispersión (Ramirez, 2002). Este metal está considerado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como uno de los 126 principales contaminantes ambientales (Waisberg y col., 2003).

Dentro de los mecanismos de acción tóxica del  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel celular, la generación de estrés oxidativo es uno de los más comprobados, siendo éste el que predomina a nivel adenohipofisario (Poliandri y col. 2003; Poliandri y col., 2006b). La melatonina, un potente secuestrador (“scavenger”) de radicales libres y quelante de metales, así como también la vitamina E y la C y otros antioxidantes, han sido empleados satisfactoriamente para reducir el estrés oxidativo en muchos sistemas (Pandi-Perumal y col., 2006; Poliandri y col., 2006b; Reiter y col., 2007; Miler y col., 2008; Miler y col., 2010). Otro de los mecanismos de acción sugeridos para la melatonina es que facilitaría la eliminación de los metales de los tejidos, dado que por sus propiedades liposolubles, es capaz de difundir y cruzar las barreras celulares libremente. Basándose en estas y otras propiedades de la melatonina, nuestro grupo ha demostrado que cuando se la administra conjuntamente con el metal, esta hormona impide la generación de estrés oxidativo inducido por la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel de la adenohipófisis (Poliandri y col., 2006b).

Los resultados obtenidos de ese estudio son sumamente importantes dado que el tratamiento con melatonina, hormona sin efectos nocivos para el individuo, permite contrarrestar los efectos tóxicos del metal. Sin embargo, este

tratamiento solo cumple un papel preventivo y es válida su utilización en condiciones de contaminación ocupacional.

En cambio, en condiciones de contaminación ambiental no ocupacional, las manifestaciones clínicas de la intoxicación por un metal, en general, se hacen evidentes solo después de un cierto período de acumulación del mismo en el organismo, por lo tanto, es sumamente importante conocer si un tratamiento *a posteriori* puede revertir o atenuar los efectos tóxicos producidos por el metal en el individuo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo de tesis estudiamos el efecto del tratamiento *a posteriori* con melatonina o la interrupción de la exposición al metal sobre el estrés oxidativo y la secreción hormonal inducidos por el  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel adenohipofisario. Nuestros resultados muestran que el tratamiento *a posteriori* con melatonina revierte los efectos del metal sobre uno de los marcadores de estrés oxidativo estudiados, mientras que tiene una acción propia sobre los otros y sobre la secreción hormonal adenohipofisaria. El cese de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , en cambio, revierte totalmente los efectos del metal sobre los marcadores de estrés oxidativo y sobre los niveles séricos de dichas hormonas.

## **I. Marcadores de estrés oxidativo y NOS1 en la adenohipófisis.**

## **II. Secreción de PRL y LH.**

I. Como detallamos en la introducción, los marcadores de estrés oxidativo son factores de transcripción y enzimas cuya expresión es inducida en respuesta a un insulto oxidante.

La enzima HO-1 es un marcador clásico de estrés oxidativo regulada en gran medida por el estado redox de la célula (Otterbein y col., 2003; Poon y col., 2004). Su expresión es coordinada por el factor de transcripción Nrf2 (Liu y col., 2009; Kensler y col., 2007), que responde a xenobióticos específicos como el Cd<sup>2+</sup>.

Las MTs ejercen un papel protector contra los efectos oxidantes de diferentes metales (Nordberg y col., 1994.). La alta afinidad de las MTs por los metales hace que disminuyan los niveles circulantes de los mismos atenuando su toxicidad (Vašák y Meloni, 2011). El Cd<sup>2+</sup> es capaz de inducir la expresión de las MTs al unirse al elemento de respuesta a metales que está presente en su promotor (Alonso-González y col., 2008).

Como ya se mencionó, el NO es un importante modulador neuroendocrino (Rivier, 2001). Diversas fuentes señalan que el NO también puede tener funciones antioxidantes (Wink y Mitchell, 1998). Se ha demostrado que el NO es capaz de estimular la expresión de las MTs (Katakai y col., 2001; Itoh y col., 2005). Además, se ha propuesto que el NO es un importante inductor del Nrf-2 (Königsberg Fainstein, 2007).

En este trabajo de tesis observamos que el Cd<sup>2+</sup>, al generar estrés oxidativo, aumenta la expresión de los mensajeros de la HO-1, de la MT-1 y de la NOS1 en la adenohipófisis (Miler y col., 2010). Los resultados obtenidos para HO-1 se condicen con los reportados por el grupo de Nagamine y col. en las células de Sertoli (Kusakabe y col., 2008). En cuanto a la MT-1, Lee y col. demostraron un aumento en la expresión de esta proteína inducido por la exposición al Cd<sup>2+</sup> en varios tejidos tales como próstata, riñón y testículo (Lee y col., 1999). Antecedentes de nuestro grupo sostienen que el Cd<sup>2+</sup> aumenta la

expresión del mensajero de la NOS1 en la adenohipófisis (Poliandri y col., 2006b) e incrementa la producción de NO en células adenohipofisarias en cultivo (Poliandri y col., 2004). En concordancia con lo observado por otros grupos y en otros sistemas (Dawn y Bolli, 2002; Andoh y col., 2002; Waalkes, 2003), demostramos que el NO tiene un efecto citoprotector (Poliandri y col., 2004).

### **Tratamiento *a posteriori* con melatonina**

El tratamiento *a posteriori* con melatonina es capaz de revertir el incremento en la expresión de la HO-1 (Miler y col., 2010). Un efecto similar observamos previamente cuando la hormona fue administrada simultáneamente con el metal (Poliandri y col., 2006b).

En cambio, la melatonina muestra un efecto *per se* sobre la MT-1 y la NOS1, aumentando la expresión de sus mensajeros.

Con respecto a la MT-1, nuestros resultados muestran por primera vez que la melatonina sería capaz de regular la expresión de esta proteína. Acorde con nuestra observación, existen evidencias que indican que la melatonina es capaz de incrementar la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, GPx y CAT en diferentes sistemas (Rodríguez y col., 2004). Por el contrario, otros autores han observado que la melatonina por si sola no modifica la expresión de la MTs, mientras que administrada simultáneamente con el Cd<sup>2+</sup> es capaz de estimular aún más la expresión de estas proteínas inducida por el metal (Alonso-González y col., 2008).

Hasta el momento no existían evidencias de que la melatonina estimula la expresión de la NOS1, por el contrario, la mayoría de los trabajos apuntan a un efecto inhibitorio (Camacho y col., 2012). Recientemente se ha informado que la melatonina en concentración nanomolar es capaz de estimular la expresión de la NOS1 en una línea celular de queratinocitos (Arese y col., 2012). Es posible que la dosis administrada por nosotros en el agua de bebida (0,4 µg/ml) alcance una concentración del orden nanomolar a nivel hipofisario y

por consiguiente produzca una respuesta estimuladora. Previamente no habíamos observado un efecto estimulador *per se* de la melatonina sobre la expresión de la NOS1 (Poliandri y col, 2006b). Es posible que las diferencias obtenidas se deban a las distintas dosis empleadas, siendo la del estudio anterior diez veces mayor que la de éste. En este estudio la concentración elegida es más cercana a la utilizada en la clínica humana.

El efecto propio de esta hormona sobre la expresión de la MT-1 y la NOS1 parece ser independiente de la exposición previa al  $\text{Cd}^{2+}$ , dado que no se observaron diferencias en los niveles de expresión de estas proteínas entre los animales tratados con melatonina y los tratados con melatonina *a posteriori* de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ . El hecho de que la estimulación en la expresión de la MT-1 y de la NOS1 sea similar en ambos grupos (Mel y  $\text{Cd}^{2+}$ /Mel) sugiere que el efecto sería mediado a través de un mismo mecanismo. Este resultado también puede sugerir un predominio del efecto de la melatonina sobre el del metal.

Estos estudios nos permiten concluir que la melatonina, ya sea administrada en forma simultánea o *a posteriori* de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , es capaz de proteger a la glándula del efecto oxidante de este metal.

### **Cese de la exposición al metal**

Otro hecho importante de destacar de estos estudios y sin antecedentes hasta el momento en la bibliografía, es que el cese de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  revierte los efectos del estrés oxidativo inducidos por el metal en la adenohipófisis. En nuestras condiciones experimentales, un período de uno a dos meses después de la finalizada la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  es suficiente para restituir los parámetros estudiados a los valores del control. Estos parámetros requerirían tiempos diferentes para su normalización. Los niveles de expresión de la MT-1 volvieron a los niveles del control un mes después del cese de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , mientras que los de la HO-1 y la NOS1 requirieron de dos meses (Miler y col., 2010).

II. Las hormonas hipofisarias PRL y LH tienen un papel sumamente importante en la reproducción. Diversas evidencias muestran que el  $\text{Cd}^{2+}$  afecta los niveles plasmáticos de las hormonas hipofisarias tanto en humanos como en animales de laboratorio (Zylber-Haran y col., 1982; Henson y Chadrese, 2004). En este trabajo de tesis mostramos que la exposición crónica al  $\text{Cd}^{2+}$  disminuye los niveles séricos de PRL y de LH (Miler y col., 2010). Estos resultados se correlacionan con lo observado en los estudios *in vitro* (Poiliandri y col., 2003), lo cual sugiere que el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la secreción hormonal adenohipofisaria puede ser tanto directo a nivel hipofisario como indirecto a nivel hipotalámico al afectar los factores reguladores (Lafuente y Esquifino, 1999; Lafuente y col., 2001).

La remoción del metal del agua de bebida es suficiente para recuperar la funcionalidad de la glándula (Miler y col., 2010).

Los resultados presentados hasta este momento nos conducen a la siguiente pregunta: ¿es posible que la sola eliminación del factor tóxico permita la reversión sus efectos nocivos a nivel adenohipofisario? Si bien han sido reportados diferentes tiempos de vida media del  $\text{Cd}^{2+}$  en el organismo, no hay dudas sobre la larga persistencia de este metal en el hígado y el riñón (15 - 30 años), principalmente debido a su baja tasa de excreción (Satarug y col., 2003; Urani y col., 2007). Sin embargo, la tasa de eliminación del  $\text{Cd}^{2+}$  varía de un tejido a otro (Miller y Boswell, 1981) y a pesar de que este metal se acumula en la adenohipófisis (Lafuente y col., 2001; Pillai y col., 2003), a nuestro entender, no existe ningún trabajo que haya estudiado su tasa de eliminación de dicho tejido. Por lo tanto, es posible que la reversión de los efectos del  $\text{Cd}^{2+}$  en la adenohipófisis, luego de su remoción del agua de bebida, pueda ser consecuencia de una alta tasa de eliminación del metal de dicho tejido o de su secuestro por diferentes proteínas (Cuypers y col., 2010; Selim y col., 2012).

Otro factor importante a tener en cuenta es la tasa de renovación celular adenohipofisaria, hecho que favorecería la eliminación del metal del tejido y

causaría la reversión del estrés oxidativo inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$ . Existen evidencias de que la tasa de renovación celular de la adenohipófisis en ratas es de alrededor de un mes (Oishi y col., 1993), mientras que la del hígado es de entre 300-500 días (Post y Hoffman, 1968).

Sin embargo, la reversión del daño oxidativo inducido por el  $\text{Cd}^{2+}$  en la adenohipófisis no puede ser explicada solamente por renovación celular. En las mismas condiciones experimentales a nivel hipotalámico, donde las células son principalmente de origen nervioso y, por lo tanto, tienen una vida media mucho más larga, se ha observado que los niveles de expresión del mensajero de ciertos parámetros indicadores de estrés oxidativo inducidos por el  $\text{Cd}^{2+}$  (MT-3, NOS1) son también revertidos un tiempo después de la remoción del metal del agua de bebida (estudios no mostrados).

Indudablemente exposiciones más prolongadas o a niveles más altos del metal puedan requerir más tiempo para una posible recuperación, pero la expectativa de un mejoramiento existe.

## ***5. Papel xenoestrogénico del Cd<sup>2+</sup> a nivel adenohipofisario.***

### ***5.1. Objetivo***

Investigar si el Cd<sup>2+</sup> es capaz de actuar como xenoestrógeno afectando la liberación hormonal y la proliferación celular adenohipofisaria.



## **5.2. Resultados**

Como se mencionó en la introducción, los estrógenos estimulan la secreción de PRL y la proliferación celular de los lactotropos siendo éstos los efectos más característicos de estas hormonas en la adenohipófisis. Con el fin de investigar el papel xenoestrogénico del  $Cd^{2+}$  a nivel adenohipofisario, estudiamos su efecto sobre la proliferación celular y la secreción de PRL en las células adenohipofisarias.

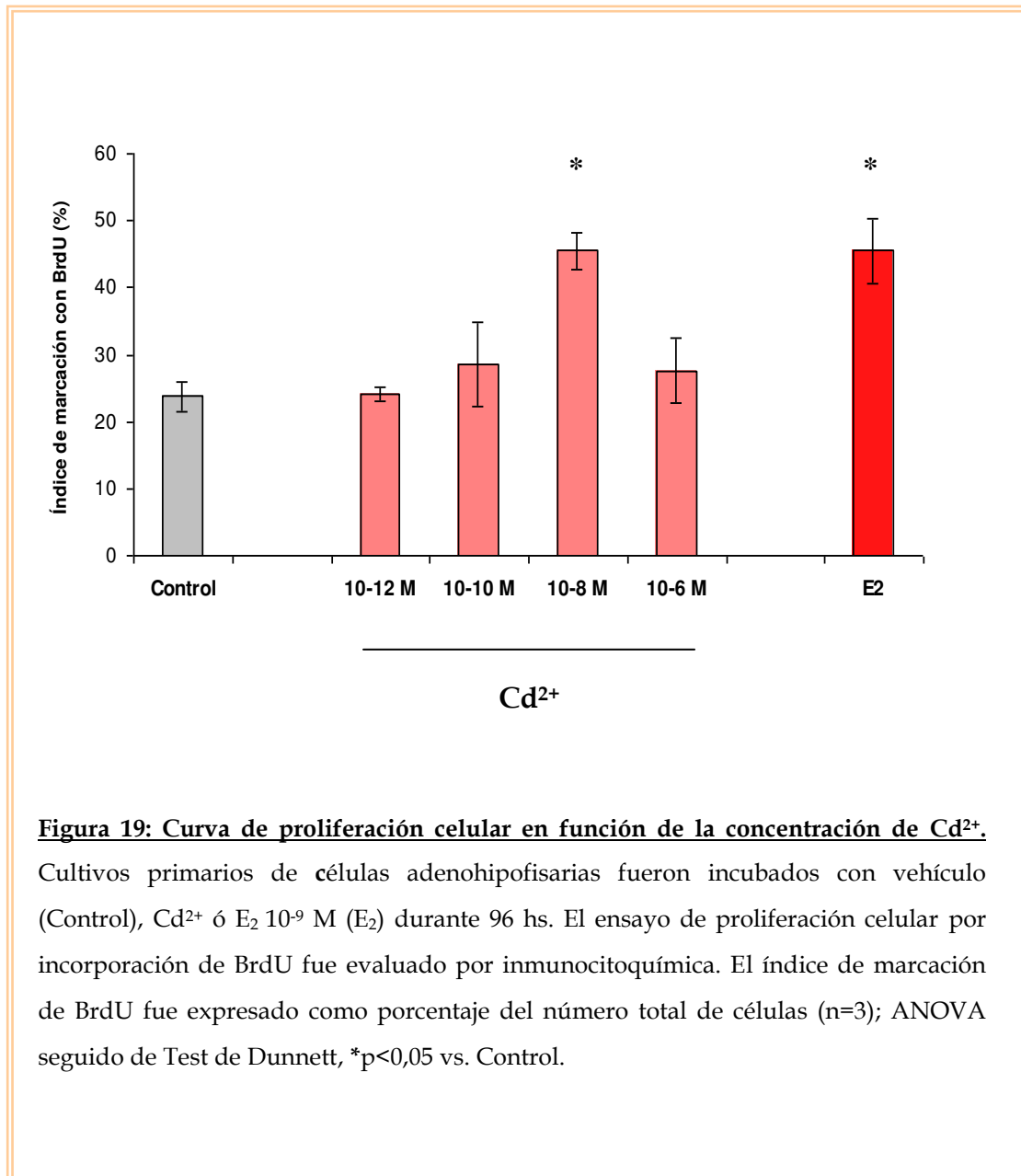
### **5.2.1. Efecto del $Cd^{2+}$ sobre la proliferación celular adenohipofisaria.**

#### **5.2.1.1. El $Cd^{2+}$ aumenta la proliferación de las células adenohipofisarias en cultivo.**

Considerando los antecedentes presentados, investigamos los efectos del  $Cd^{2+}$  sobre la proliferación celular adenohipofisaria.

En primer lugar, se determinó la concentración de  $Cd^{2+}$  que pudiera inducir la proliferación celular adenohipofisaria. Para ello se realizó una curva en función de la concentración del metal ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M) y se cuantificó la incorporación de BrdU (inmunocitoquímica) en el ADN de células adenohipofisarias en cultivos primarios. El  $E_2$  se utilizó como control positivo de los experimentos a una concentración ( $10^{-9}$  M) a la cual se conoce que estimula la proliferación celular adenohipofisaria y la secreción de PRL (Freeman y col., 2000). Las células adenohipofisarias tienen una tasa de proliferación relativamente baja por lo cual se eligió un tiempo de 96 hs para la realización de estos experimentos.

Los resultados muestran que el  $Cd^{2+}$  a la concentración de  $10^{-8}$  M estimuló el proceso de proliferación. Dicha concentración fue la elegida para los experimentos subsiguientes (**Figura 19**).



**Figura 19: Curva de proliferación celular en función de la concentración de Cd<sup>2+</sup>.**

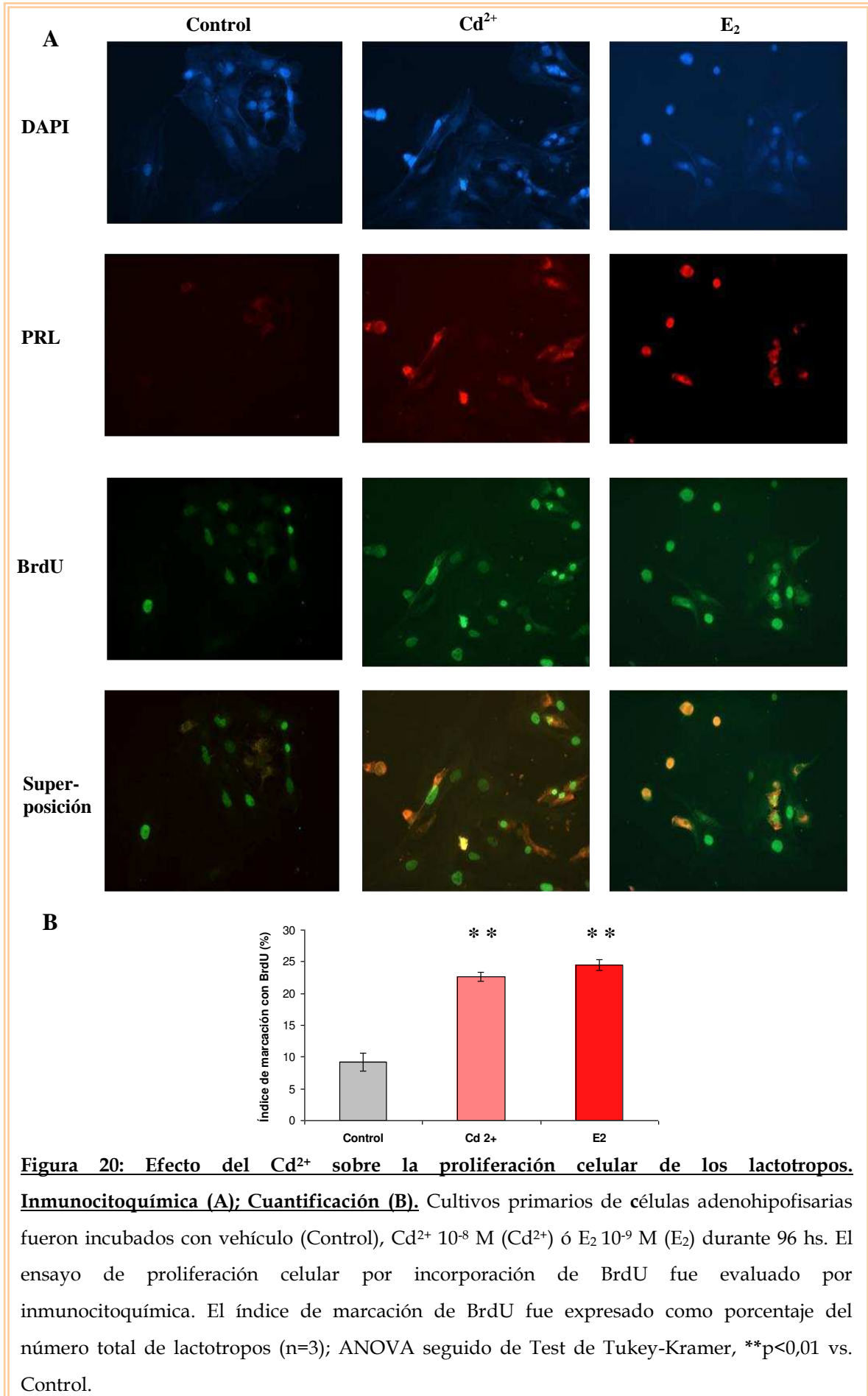
Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>) durante 96 hs. El ensayo de proliferación celular por incorporación de BrdU fue evaluado por inmunocitoquímica. El índice de marcación de BrdU fue expresado como porcentaje del número total de células (n=3); ANOVA seguido de Test de Dunnett, \*p<0,05 vs. Control.

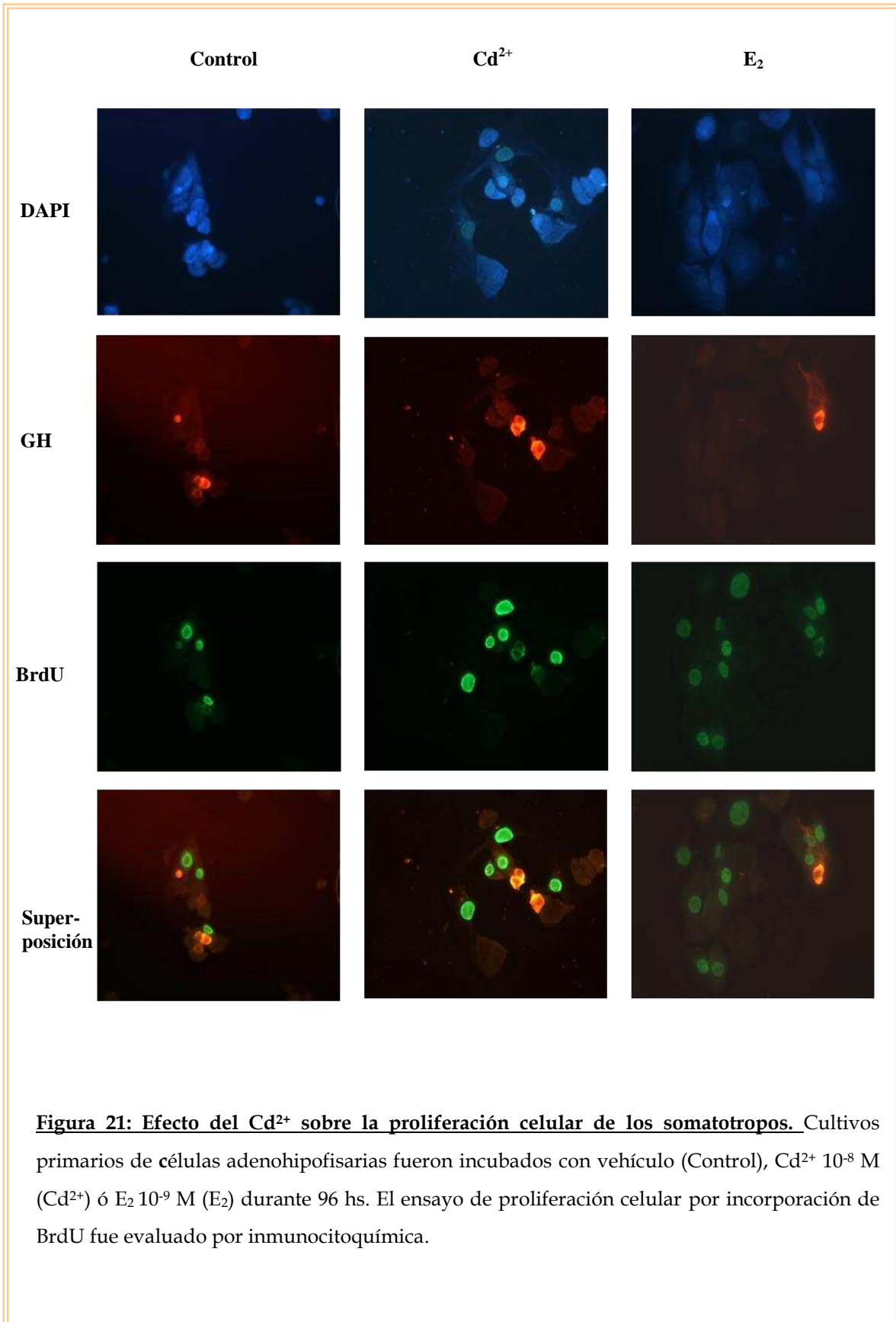
### 5.2.1.2. El $\text{Cd}^{2+}$ aumenta la proliferación celular de los lactotrofos, no afectando la de los somatotrofos ni la de los gonadotrofos.

La adenohipófisis está constituida por seis tipos de células, las cuales tienen diferente sensibilidad al  $\text{E}_2$ , siendo los lactotrofos los principales blancos de esta hormona. Con el fin de determinar cuáles de los tipos celulares adenohipofisarios responden al efecto proliferativo del  $\text{Cd}^{2+}$ , se realizaron estudios inmunocitoquímicos con anticuerpos específicos para identificar el tipo celular por la hormona que sintetiza (PRL, GH o LH) y se determinó la tasa de proliferación celular (BrdU/anti-BrdU) según se describe en Materiales y Métodos. Se examinaron los lactotrofos, los somatotrofos y los gonadotrofos. Los otros dos tipos celulares secretores están en muy baja proporción en la adenohipófisis y por lo tanto no fueron estudiados.

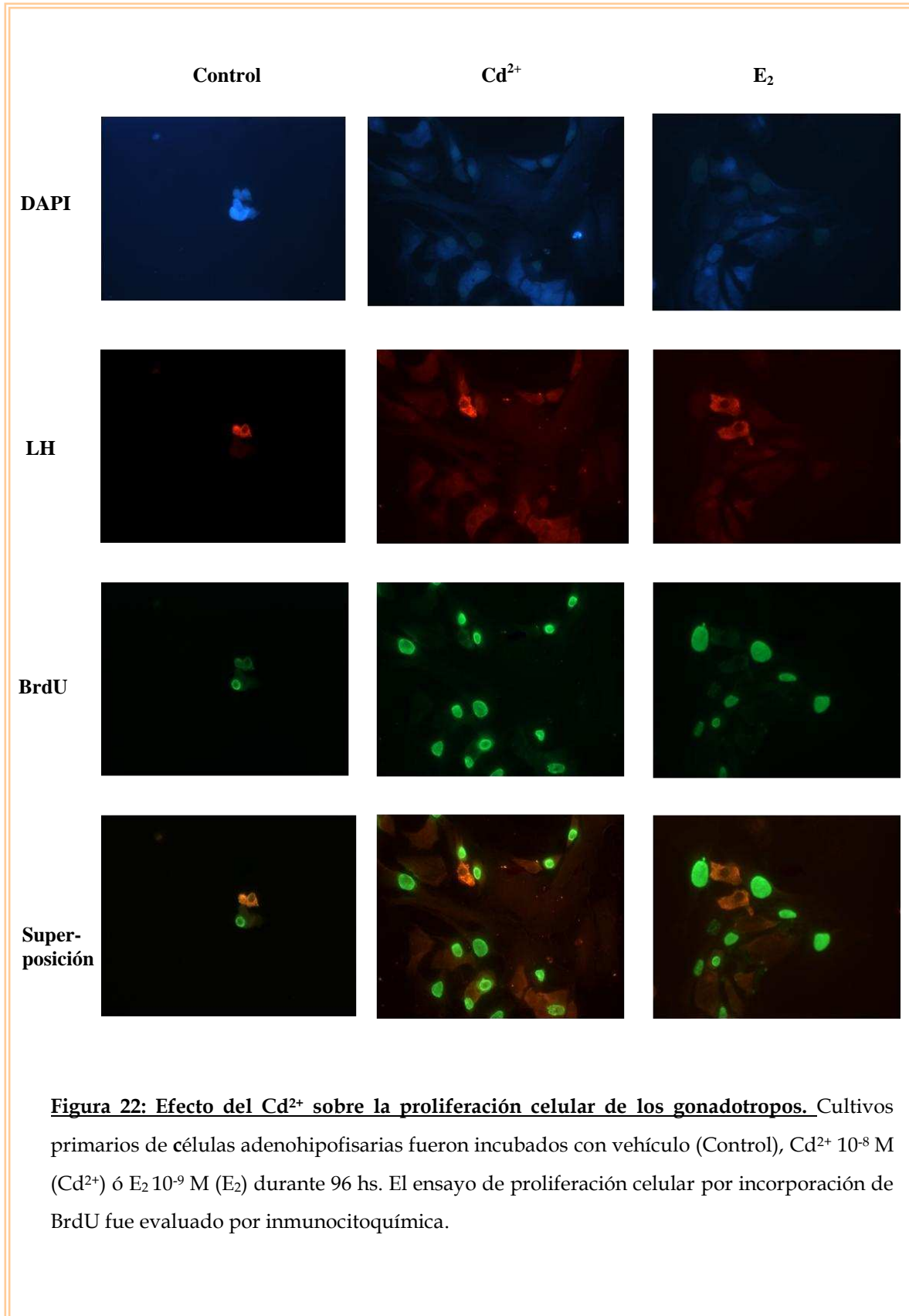
Nuestros resultados indican que los lactotrofos fueron las únicas células secretoras que mostraron un aumento de la proliferación celular luego de 96 hs de exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  (**Figura 20**). Ni los somatotrofos (**Figura 21**), ni los gonadotrofos (**Figura 22**) modificaron su tasa de proliferación.

Las células foliculo estrelladas (tipo celular no secretor) y los fibroblastos presentan una tasa de proliferación mayor que la de las células secretoras y, por lo tanto, en 96 hs de incubación se observa un fondo de estas células en división. El  $\text{Cd}^{2+}$  estimuló la proliferación de las células foliculo estrelladas, aunque dicho aumento no fue tan marcado como el observado en los lactotrofos (resultados no mostrados). El tratamiento con  $\text{E}_2$  produjo una respuesta similar sobre la proliferación celular adenohipofisaria.



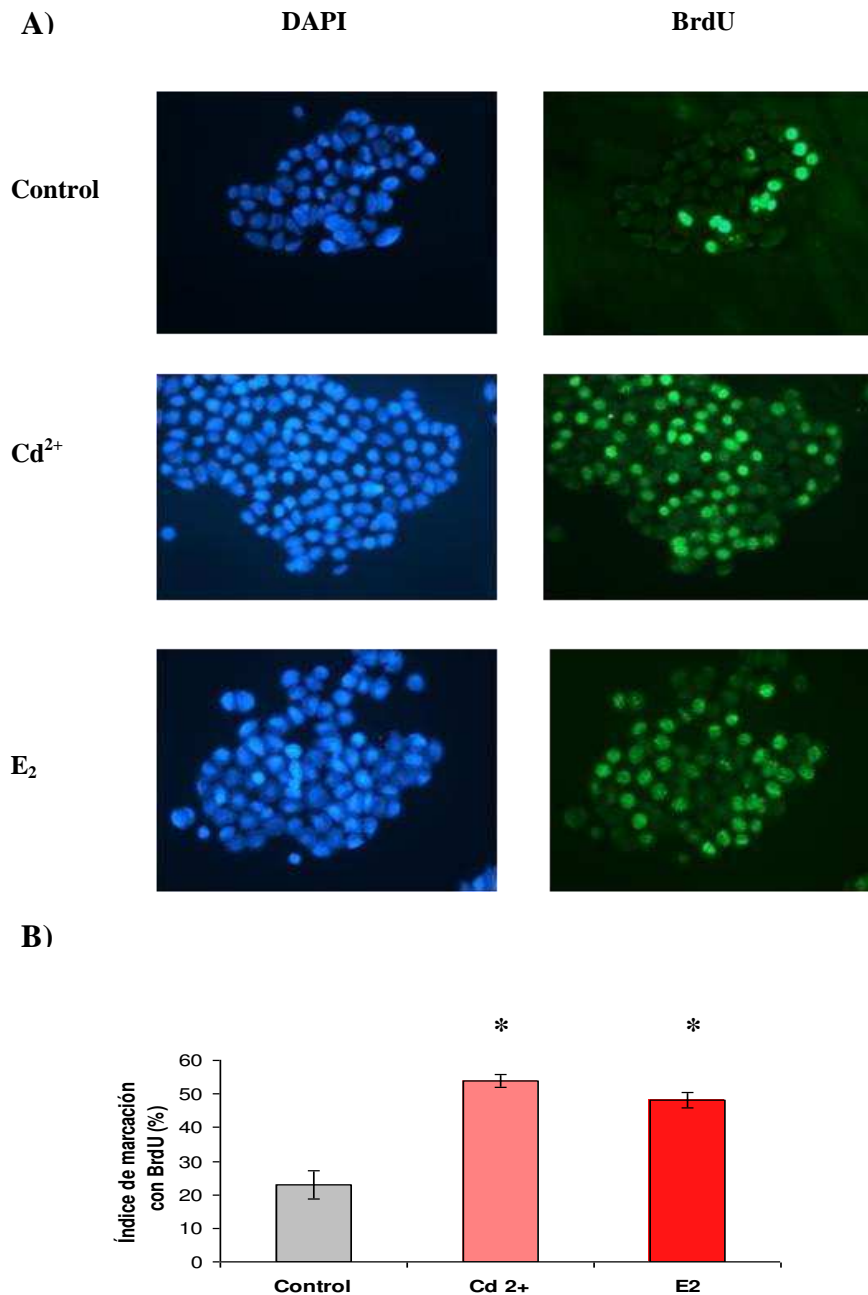


**Figura 21: Efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la proliferación celular de los somatotropos.** Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>) durante 96 hs. El ensayo de proliferación celular por incorporación de BrdU fue evaluado por inmunocitoquímica.



### 5.2.1.3. El $\text{Cd}^{2+}$ aumenta la proliferación de la línea celular GH3.

Los resultados mostrados más arriba indican que los lactotrofos son las células adenohipofisarias más sensibles al  $\text{Cd}^{2+}$ , apoyando el efecto xenoestrogénico de este metal. La línea celular GH3, es una línea lactosomatotropa, derivada de un tumor de hipófisis de rata que responde a  $\text{E}_2$ . Para confirmar la especificidad del efecto xenoestrogénico del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre los lactotrofos, evaluamos su efecto sobre la línea celular GH3. Con fines comparativos utilizamos la misma concentración y tiempo de incubación que para el cultivo primario. El  $\text{Cd}^{2+}$ , al igual que el  $\text{E}_2$ , fue capaz de estimular la incorporación de BrdU en estas células, a pesar de su alta tasa de proliferación intrínseca (**Figura 23**).



**Figura 23: Efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la proliferación celular de la línea GH3.**

**Inmunocitoquímica (A); Cuantificación (B).**

Cultivos celulares de la línea GH3 fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>) durante 96 hs. El ensayo de proliferación celular por incorporación de BrdU fue evaluado por inmunocitoquímica. El índice de marcación de BrdU fue expresado como porcentaje del número total de células (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p<0,05 vs. Control.



## **5.2.2. El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión de diferentes indicadores de proliferación en las células adenohipofisarias.**

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el Cd<sup>2+</sup> incrementa la proliferación celular adenohipofisaria y que los lactotrofos parecen ser las células más sensibles a su efecto xenoestrogénico.

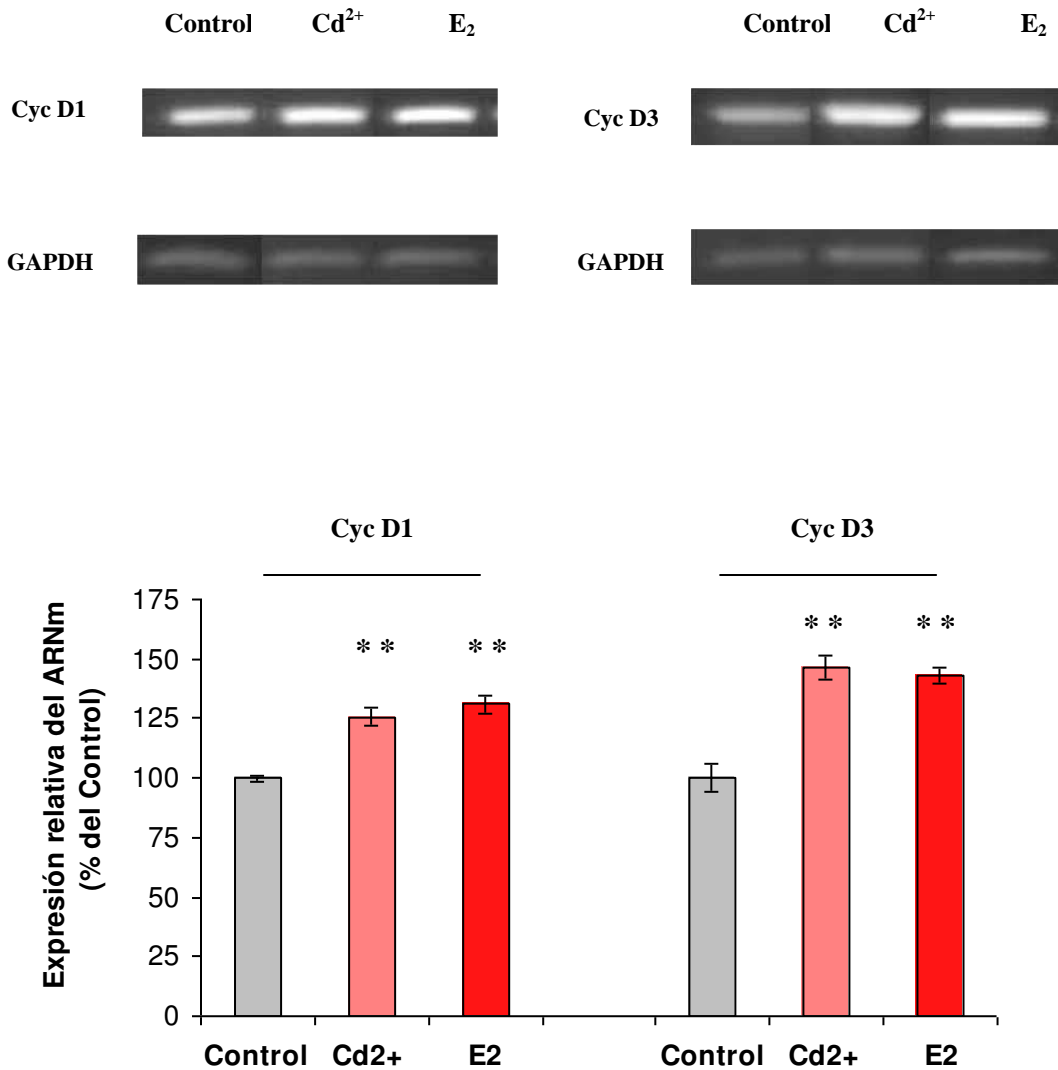
El ciclo celular es un proceso finamente controlado en el que intervienen diferentes proteínas. Las ciclinas y los proto-oncogenes están directamente involucrados en la regulación de dicho proceso (Altucci y col., 1996; Dinda y col., 1997). El estudio del efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre algunos de los elementos reguladores nos permitirá confirmar el papel de este metal sobre la proliferación celular adenohipofisaria.

### **5.2.2.1. El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión del ARNm de las Cyc D1 y de la Cyc D3 en el cultivo primario de células adenohipofisarias y en la línea celular GH3.**

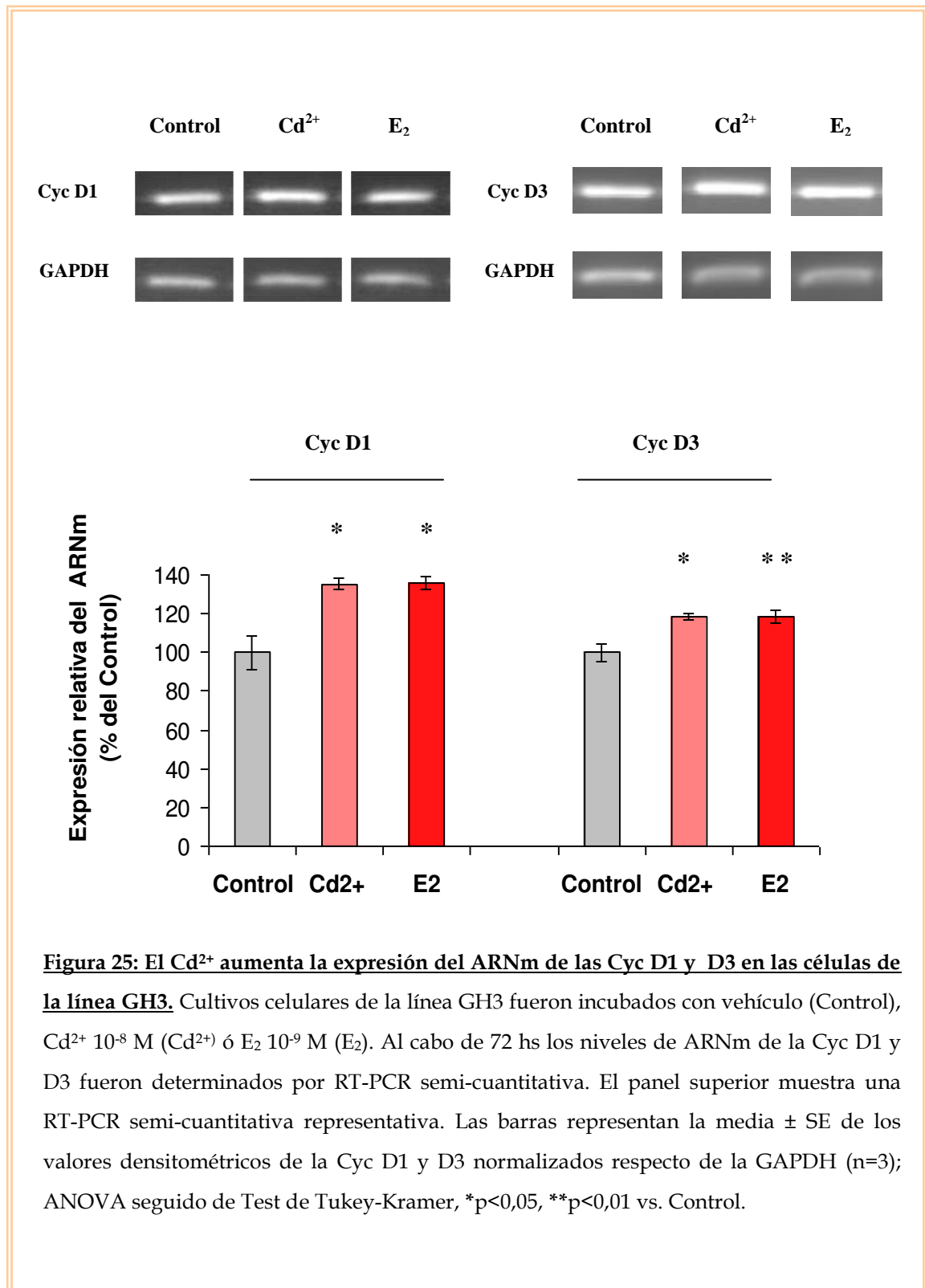
Las ciclinas son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. Existen varios tipos de ciclinas que son activas en distintas fases del mismo. Particularmente, las ciclinas D, son expresadas en la etapa G1 temprana y regulan la progresión del ciclo celular (Qian y col., 1998; Kawashima y col., 2002).

Se estudió la expresión del ARNm de la Cyc D1 y D3 mediante RT-PCR semi-cuantitativa. La exposición al Cd<sup>2+</sup> aumentó significativamente la expresión del ARNm de la Cyc D1 y D3 con respecto al Control tanto en el cultivo primario de células adenohipofisarias (**Figura 24**) como en la línea celular GH3 (**Figura 25**). Teniendo en cuenta la similitud de estos resultados (proliferación celular y expresión de ciclinas) entre ambos tipos de cultivos celulares y que los lactotrofos son las células que predominan en la glándula (aproximadamente 40-50% del total de células), los resultados obtenidos nos permiten sugerir que el incremento en la expresión del ARNm de las ciclinas

corresponde a los lactotropos. Considerando estos resultados y el hecho de que a alta tasa de proliferación de las células GH3 podría enmascarar otros efectos, los estudios subsiguientes se realizaron sólo con los cultivos primarios de células adenohipofisarias. Sin embargo, es importante destacar que el  $\text{Cd}^{2+}$  fue capaz de inducir la proliferación celular en esta línea celular adenohipofisaria de origen tumoral, con una alta tasa de proliferación intrínseca. Este efecto fue similar al observado por otros autores en líneas tumorales de mama (Brama y col., 2007; Siewit y col., 2010).



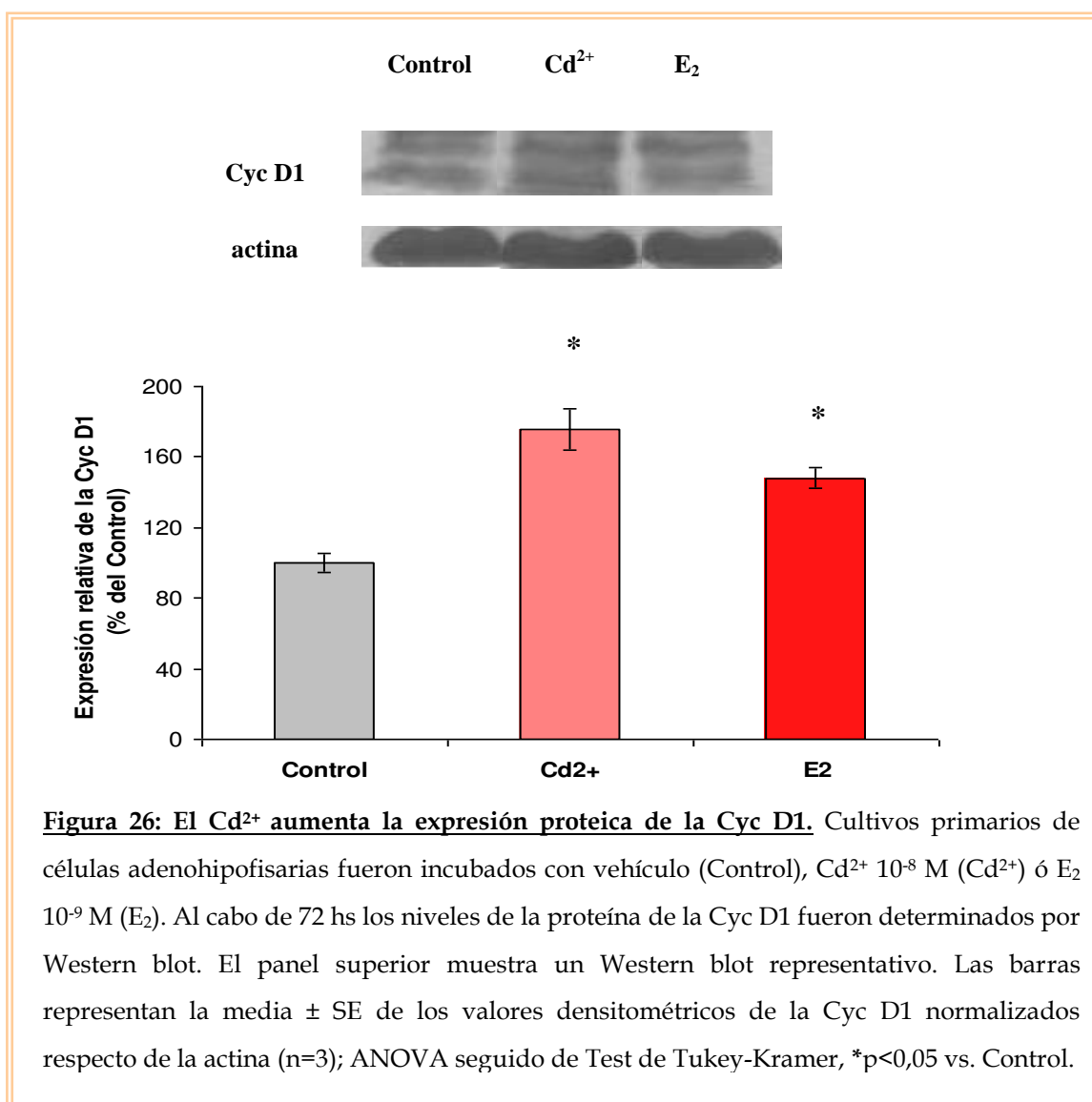
**Figura 24: El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión del ARNm de la Cyc D1 y D3 en las células adenohipofisarias.** Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>). Al cabo de 72 hs los niveles de ARNm de la Cyc D1 y D3 fueron determinados por RT-PCR semi-cuantitativa. El panel superior muestra una RT-PCR semi-cuantitativa representativa. Las barras representan la media ± SE de los valores densitométricos de la Cyc D1 y D3 normalizados respecto de la GAPDH (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*\*p<0,01 vs. Control.



**Figura 25: El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión del ARNm de las Cyc D1 y D3 en las células de la línea GH3.** Cultivos celulares de la línea GH3 fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>). Al cabo de 72 hs los niveles de ARNm de la Cyc D1 y D3 fueron determinados por RT-PCR semi-cuantitativa. El panel superior muestra una RT-PCR semi-cuantitativa representativa. Las barras representan la media ± SE de los valores densitométricos de la Cyc D1 y D3 normalizados respecto de la GAPDH (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Control.

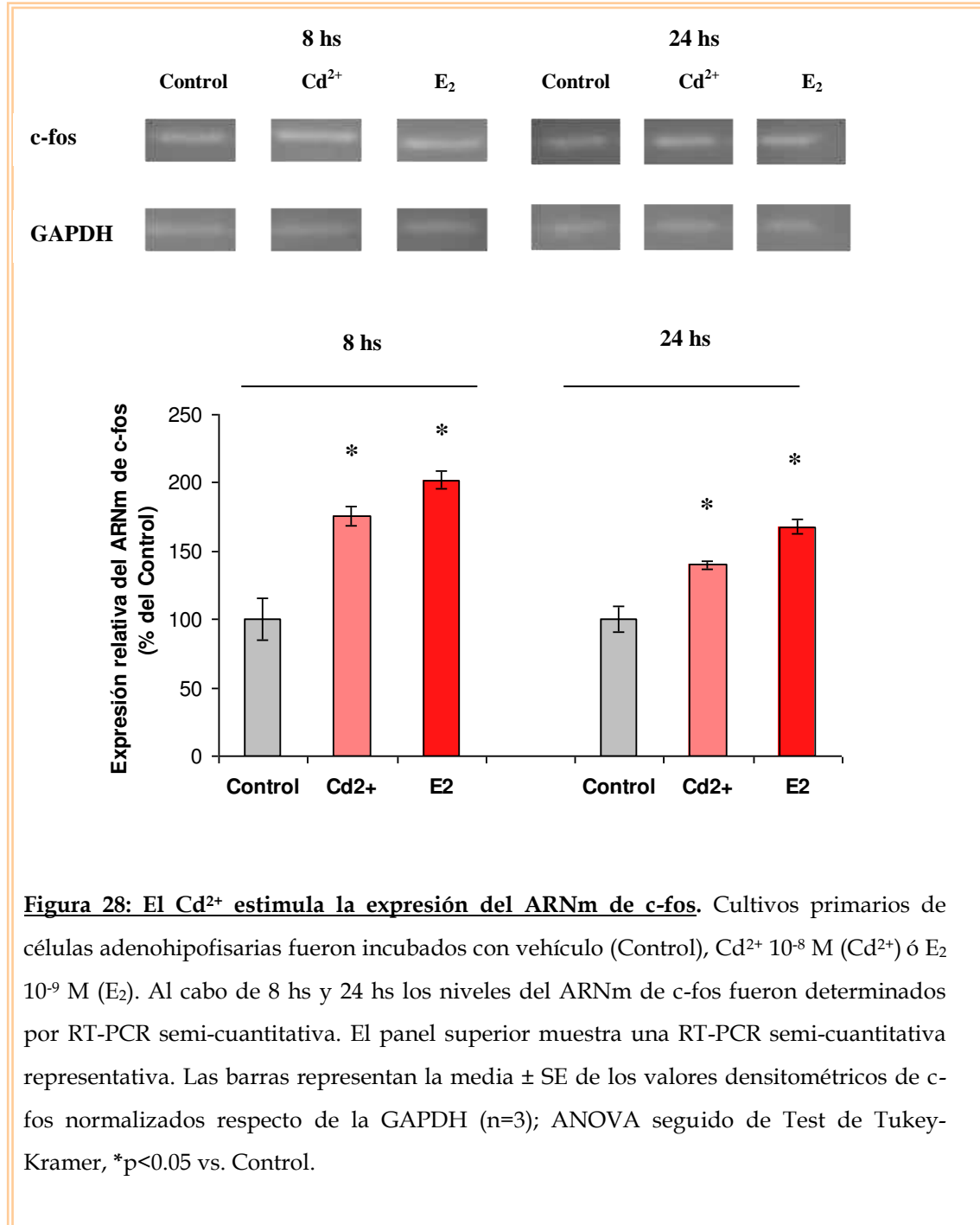
### 5.2.2.2. El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión de la proteína de la Cyc D1.

El incremento en los niveles del ARNm de las ciclinas D fue validado mediante la determinación de la expresión de la proteína de la Cyc D1 por Western blot. Aunque la expresión de las ciclinas es un evento temprano del proceso de proliferación, este persiste mientras haya un estímulo mitogénico. Con el fin de poder comparar la expresión del mensajero con la de la proteína ambos experimentos se realizaron luego de 72 hs de incubación. En la **Figura 26** se observa que la exposición al Cd<sup>2+</sup> aumentó la expresión proteica de la Cyc D1 en las células adenohipofisarias. Un efecto similar se obtuvo por el tratamiento con E<sub>2</sub>.



### 5.2.2.3. El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión del ARNm de c-fos.

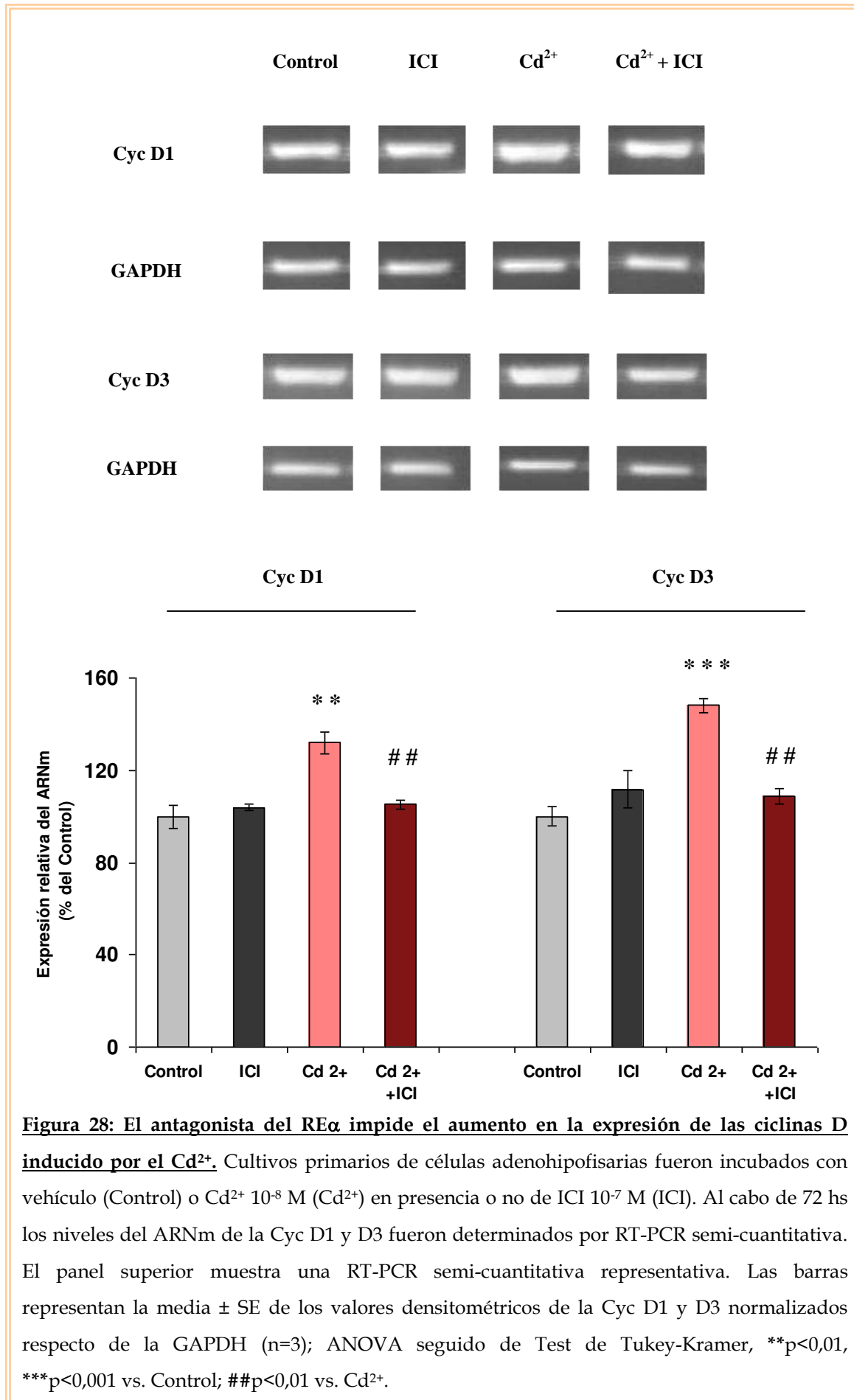
El factor de transcripción AP-1 (activating protein-1), formado por miembros de las familias de proteínas Fos y Jun, controla la proliferación, supervivencia y muerte celular (Shaulian y Karin, 2002). Existen evidencias de que los estrógenos inducen la expresión de c-fos en los lactotropos (Allen y col., 1997). Con el fin de confirmar el efecto estimulador del Cd<sup>2+</sup> sobre la proliferación de las células adenohipofisarias, examinamos la expresión de c-fos mediante RT-PCR semi-cuantitativa. Los resultados muestran que la exposición al Cd<sup>2+</sup> aumentó la expresión del ARNm de c-fos al cabo de 8 y 24 hs de incubación (**Figura 27**). Resultados semejantes se obtuvieron en presencia de E<sub>2</sub>.



#### 5.2.2.4. El antagonista del RE $\alpha$ impide el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre los mensajeros de la Cyc D1 y de la Cyc D3.

Hasta aquí nuestros resultados muestran que la exposición al Cd<sup>2+</sup> aumenta la proliferación celular adenohipofisaria y la expresión de las ciclinas. Varios trabajos postulan que el Cd<sup>2+</sup> es capaz de unirse y activar al RE $\alpha$  en forma similar a como lo hace el E<sub>2</sub> (García-Morales y col., 1994; Stoica y col., 2000; Martin y col., 2003). Con el fin de determinar si nuestros resultados son consecuencia de un efecto xenoestrogénico del metal, determinamos la participación del RE $\alpha$  en dicho efecto. Para ello se utilizó el antagonista del RE ICI 182,780 (ICI) y se determinó la expresión del ARNm de la Cyc D1 y D3 mediante RT-PCR semi-cuantitativa. El ICI es un antiestrógeno puro, que no desarrolla ningún tipo de agonismo parcial (Wakeling y col., 1991). El tratamiento con el antagonista impidió el aumento en la expresión del ARNm de las ciclinas inducido por el Cd<sup>2+</sup> mientras que, por sí solo, no modificó la expresión basal de las ciclinas estudiadas (**Figura 28**).





### ***Proliferación celular - Conclusiones***

➤ El  $\text{Cd}^{2+}$ , en concentraciones nanomolares, es capaz de promover la proliferación celular en cultivos primarios de células de adenohipofisarias, en especial estimulando la de los lactotrofos. El  $\text{Cd}^{2+}$  también aumenta la proliferación de la línea tumoral GH3

➤ El  $\text{Cd}^{2+}$  induce la expresión de ciertos factores involucrados en la proliferación celular tales como la Cyc D1 y D3 y el proto-oncogen c-fos

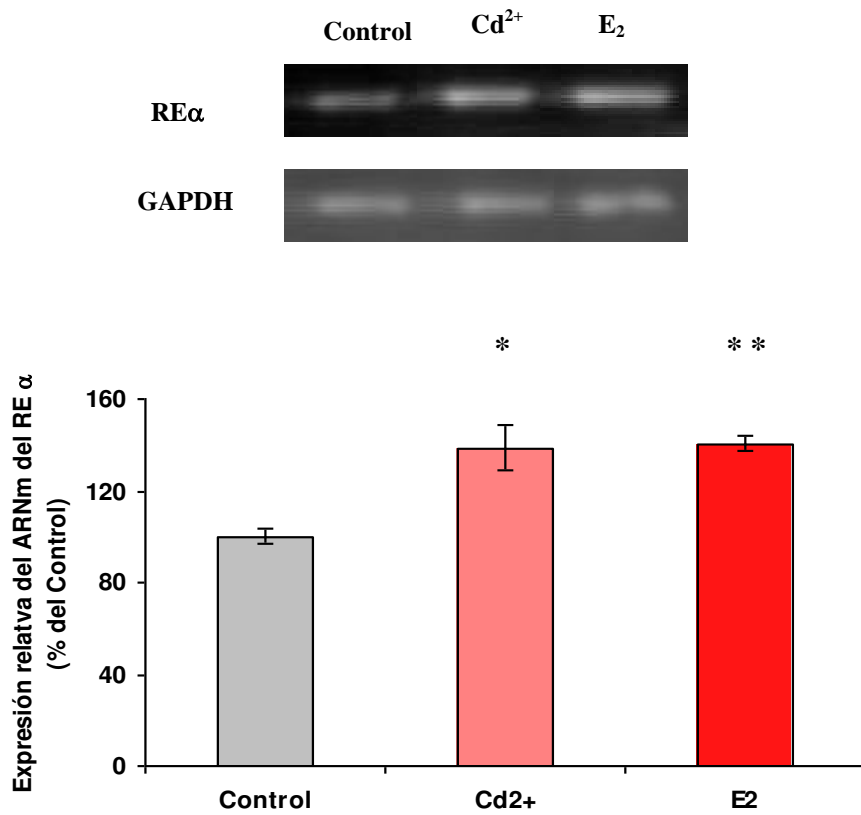
➤ El  $\text{RE}\alpha$  media el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la proliferación celular

### **5.2.3. El $\text{Cd}^{2+}$ modifica la expresión del $\text{RE}\alpha$ en las células adenohipofisarias.**

La mayor parte de las acciones biológicas del  $\text{E}_2$  son mediadas a través de los receptores  $\text{RE}\alpha$  y  $\text{RE}\beta$ , los cuales funcionan a nivel nuclear como factores de transcripción dependientes de ligando. Estos receptores, a su vez, son regulados por el  $\text{E}_2$  (Mitchner 1998; Bottner y Wuttke, 2005). Dado su carácter de XE, el  $\text{Cd}^{2+}$ , también podría estar modificando la expresión de estos receptores, por lo cual decidimos examinar su efecto sobre la expresión del ARNm y de las proteínas del  $\text{RE}\alpha$  (mediante RT-PCR semi-cuantitativa y western blot).

#### **5.2.3.1. El $\text{Cd}^{2+}$ modifica la expresión del ARNm del $\text{RE}\alpha$ en función del tiempo de exposición.**

Como podemos ver en la **Figura 29** y en la **Tabla 8**, la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  produjo un aumento en la expresión del ARNm del  $\text{RE}\alpha$  al cabo de 8 y 24 hs de incubación. En cambio, luego de 72 hs, el  $\text{Cd}^{2+}$  disminuyó la expresión del ARNm del receptor (**Tabla 8**).



**Figura 29: El Cd<sup>2+</sup> estimula la expresión del ARNm del RE $\alpha$ .** Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>). Al cabo de 8 hs los niveles del ARNm del RE $\alpha$  fueron determinados por RT-PCR semi-cuantitativa. El panel superior muestra una RT-PCR semi-cuantitativa representativa. Las barras representan la media  $\pm$  SE de los valores densitométricos del RE $\alpha$  normalizados respecto de la GAPDH (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p< 0,05, \*\*p<0,01 vs. Control.

**Tabla 8: El Cd<sup>2+</sup> modifica la expresión del ARNm del RE $\alpha$ .**

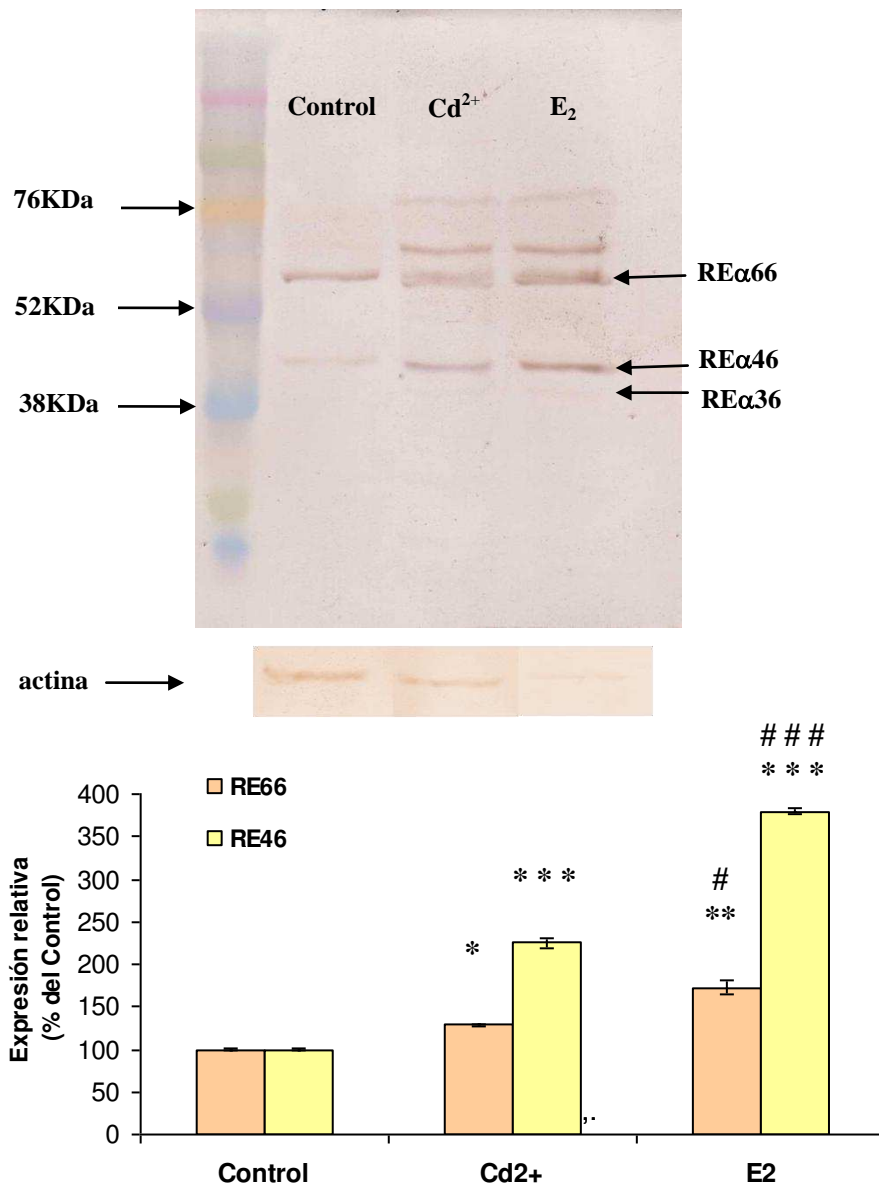
	Expresión relativa del ARNm del RE $\alpha$ (% del Control)	
	Control	Cd <sup>2+</sup>
<b>8 hs</b>	100,0 $\pm$ 3,5	138,7 $\pm$ 9,6 *
<b>24 hs</b>	100,0 $\pm$ 5,1	141,6 $\pm$ 2,0 **
<b>72 hs</b>	100,0 $\pm$ 3,5	60,0 $\pm$ 2,3 *

Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control) ó Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>). Al cabo de 8, 24 ó 72 hs los niveles del ARNm del RE $\alpha$  fueron determinados por RT-PCR semi-cuantitativa. Los valores densitométricos del RE $\alpha$  fueron normalizados respecto de la GAPDH y expresados como la media  $\pm$  SE (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Control.

### 5.2.3.2. El Cd<sup>2+</sup> estimula la expresión de la proteína del RE $\alpha$ y de sus variantes truncadas.

Las células adenohipofisarias expresan, además de la isoforma de longitud completa RE $\alpha$ 66, dos variantes de “splicing” o truncadas (RE $\alpha$ 46 y RE $\alpha$ 36), cuya expresión también es regulada por el E<sub>2</sub> (Shupnik, 2002). La isoforma RE $\alpha$ 66 y las variantes truncadas no pudieron ser distinguidas por la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa dado que el “primer” utilizado corresponde a una región común de los tres mensajeros. La identificación de las diferentes proteínas se realizó mediante Western blot. La exposición al Cd<sup>2+</sup> por 8 (Tabla 9) y 24 hs (Tabla 9 y Figura 30) aumentó la expresión proteica de la isoforma RE $\alpha$ 66 y de la variante de “splicing” RE $\alpha$ 46. El tratamiento con E<sub>2</sub> produjo efectos similares a los del Cd<sup>2+</sup>. La banda correspondiente a la variante RE $\alpha$ 36 fue muy tenue y, por lo tanto, difícil de cuantificar en nuestras condiciones experimentales. Ésta apenas pudo ser visualizada cuando las células fueron incubadas en presencia de E<sub>2</sub> al cabo de 24 hs (Figura 30). Debido

a dificultades técnicas, no pudo incrementarse aún más la cantidad de proteína total utilizada en estas determinaciones.



**Figura 30: El Cd<sup>2+</sup> estimula la expresión de la isoforma REα66 y de las variantes truncadas.**

Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>). Al cabo de 24 hs los niveles de proteína de los REα fueron determinados por Western blot. El panel superior muestra un Western blot representativo. Las barras representan la media ± SE de los valores densitométricos de los REα normalizados respecto de la actina (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Control.; #p<0,05, ###p<0,001 vs. Cd<sup>2+</sup>.

**Tabla 9: El Cd<sup>2+</sup> estimula la expresión de la isoforma RE $\alpha$ 66 y de la variante truncada RE $\alpha$ 46.**

	Expresión relativa del RE $\alpha$ (% del Control)					
	8 hs			24 hs		
	Control	Cd <sup>2+</sup>	E <sub>2</sub>	Control	Cd <sup>2+</sup>	E <sub>2</sub>
<b>RE<math>\alpha</math> 66</b>	100,0 $\pm$ 1,0	169,6 $\pm$ 15,0 *	210,8 $\pm$ 19,4 **	100,0 $\pm$ 1,0	128,4 $\pm$ 1,9 *	172,7 $\pm$ 7,7 ** #
<b>RE<math>\alpha</math> 46</b>	100,0 $\pm$ 1,5	217,3 $\pm$ 23,9 *	276,3 $\pm$ 16,9 *	100,0 $\pm$ 1,6	225,2 $\pm$ 5,3 ***	379,8 $\pm$ 3,0 *** ###

Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>). Al cabo de 8 y 24 hs los niveles de proteína de los RE $\alpha$  fueron determinados por Western blot. Los valores densitométricos de los RE $\alpha$  fueron normalizados respecto de la actina y expresados como la media  $\pm$  SE (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Control.; #p<0,05, ###p<0,001 vs. Cd<sup>2+</sup>.

### ***Expresión del RE $\alpha$ - Conclusiones***

- El Cd<sup>2+</sup> imita los efectos del E<sub>2</sub> sobre el RE $\alpha$
  
- El Cd<sup>2+</sup> regula la expresión del ARNm y de la proteína del RE $\alpha$  en las células adenohipofisarias
  
- El Cd<sup>2+</sup> incrementa la expresión de las variantes truncadas del RE $\alpha$

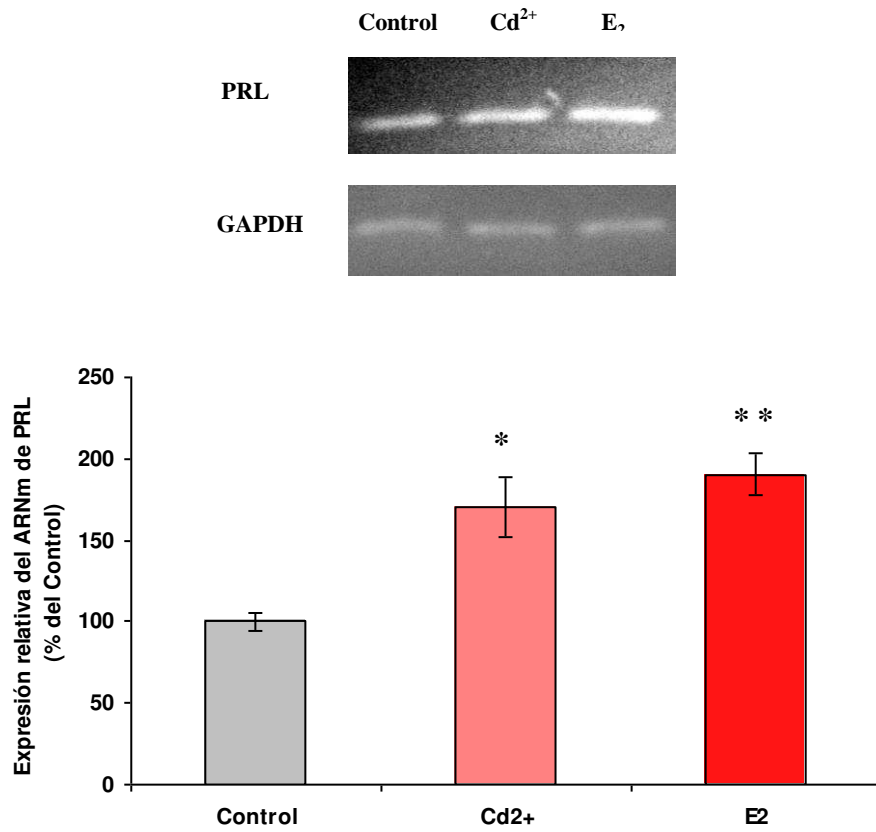


#### **5.2.4. El Cd<sup>2+</sup> estimula la secreción adenohipofisaria de PRL.**

La PRL es una hormona hipofisaria que participa en múltiples procesos fisiológicos (Freeman y col., 2000). Sus funciones más conocidas están relacionadas con el desarrollo y el crecimiento de la glándula mamaria y con el control del ciclo estral. Se sabe que la secreción de PRL está bajo control estrogénico (Rhode y Gorski, 1991) y que variaciones en sus niveles pueden traer consecuencias serias para el individuo (Bole-Feysot y col., 1998). Relativamente pocos estudios han investigado los efectos de los XEs sobre la producción de PRL (Steinmetz y col., 1997; Wade y col., 1997; Rousseau y col., 2002). Teniendo en cuenta los resultados informados hasta el momento que apoyan el carácter xenoestrogénico del Cd<sup>2+</sup>, nos interesó investigar si este metal es capaz de reproducir el efecto regulador del E<sub>2</sub> sobre la secreción de PRL en la adenohipofísis.

##### **5.2.4.1. El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión del ARNm y la liberación de PRL.**

Se examinó el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la expresión del ARNm de PRL mediante RT-PCR semicuantitativa y la liberación de la hormona al medio de incubación por RIA a diferentes tiempos. La exposición al Cd<sup>2+</sup> incrementó significativamente los niveles del mensajero de PRL (**Tabla 10 y Figura 31**) así como también la liberación de la hormona al medio (**Tabla 10**). Los niveles de la hormona mostraron una tendencia a aumentar en función del tiempo de exposición.



**Figura 31: El Cd<sup>2+</sup> estimula la expresión del ARNm de PRL.** Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) ó E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>). Al cabo de 8 hs los niveles del ARNm de PRL fueron determinados por RT-PCR semi-cuantitativa. El panel superior muestra una RT-PCR semi-cuantitativa representativa. Las barras representan la media ± SE de los valores densitométricos de PRL normalizados respecto de la GAPDH (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Control.

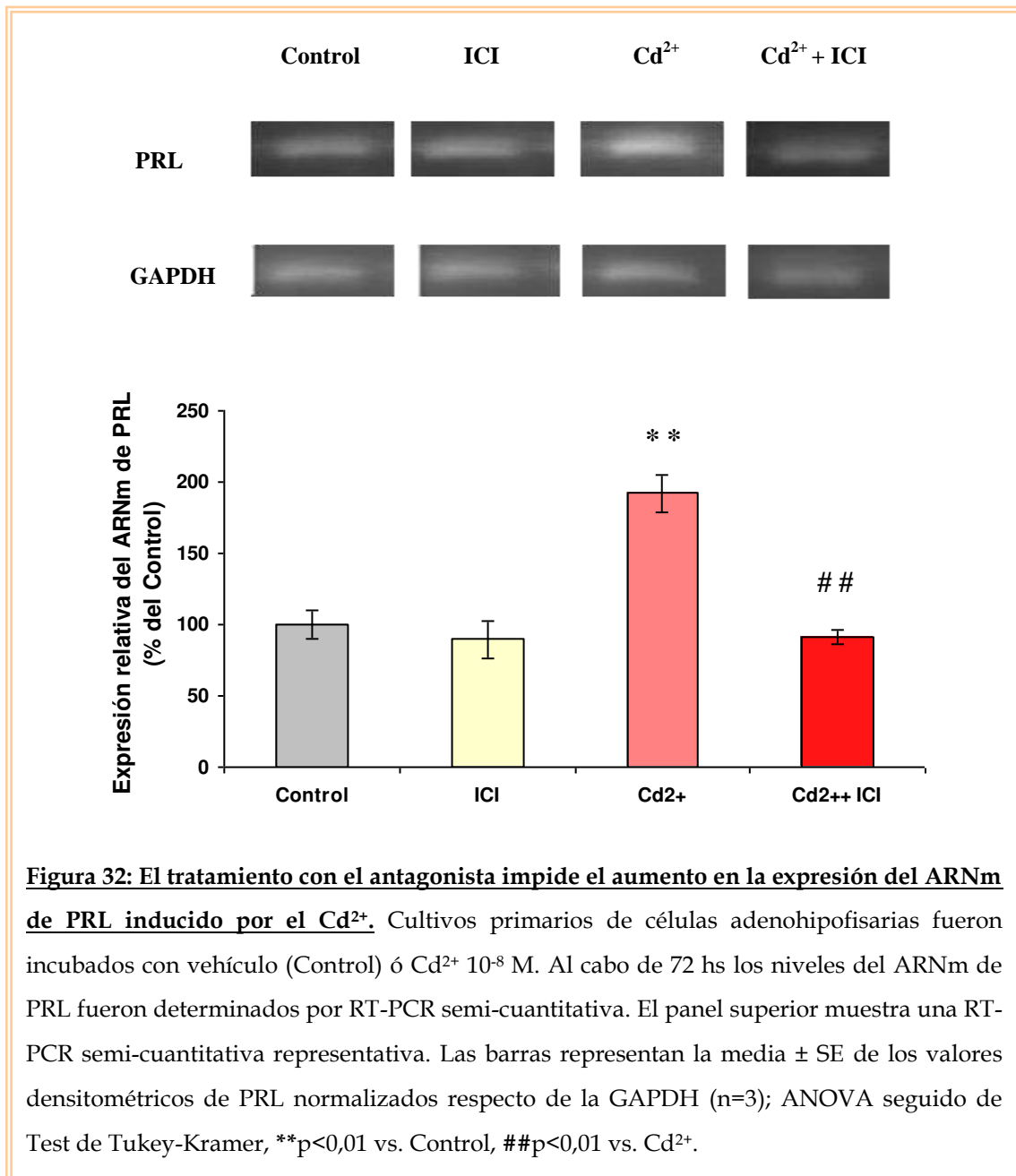
**Tabla 10: El Cd<sup>2+</sup> aumenta la expresión del ARNm de PRL y estimula la liberación de la hormona en función del tiempo de exposición.**

	Expresión relativa del ARNm de PRL (% del Control)		PRL liberada al medio (veces de aumento)
	Control	Cd <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>
<b>8 hs</b>	100,0 ± 5,2	169,9 ± 18,3 *	1,5
<b>24 hs</b>	100,0 ± 9,0	180,3 ± 15,5 **	3,0
<b>72 hs</b>	100,0 ± 9,7	192,4 ± 13,2 **	4,4

Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control) ó Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>) durante 8, 24 ó 72 hs. Los niveles de PRL liberada aL medio fueron determinados por RIA ([PRL]<sub>8h</sub>= 2825 ng/ml) y los niveles del ARNm de PRL fueron determinados por RT-PCR semi-cuantitativa. Los valores densitométricos del ARNm de PRL fueron normalizados respecto de la GAPDH y expresados como la media ± SE (n=3); ANOVA seguido de Test de Tukey-Kramer, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Control.

### 5.2.4.2. El antagonista del RE $\alpha$ impide el aumento en la expresión del ARNm de PRL inducido por el Cd $^{2+}$ .

Para comprobar si el efecto del Cd $^{2+}$  sobre la expresión del mensajero de PRL está mediado a través del RE $\alpha$  se utilizó el antagonista específico ICI. El tratamiento con ICI impidió el aumento en la expresión del ARNm de PRL inducido por el Cd $^{2+}$ . El antagonista por sí solo no modificó la expresión basal de este mensajero (Figura 32).



### ***Secreción de PRL - Conclusiones***

➤ El  $\text{Cd}^{2+}$  incrementa la expresión del ARNm y la liberación de PRL en las células adenohipofisarias

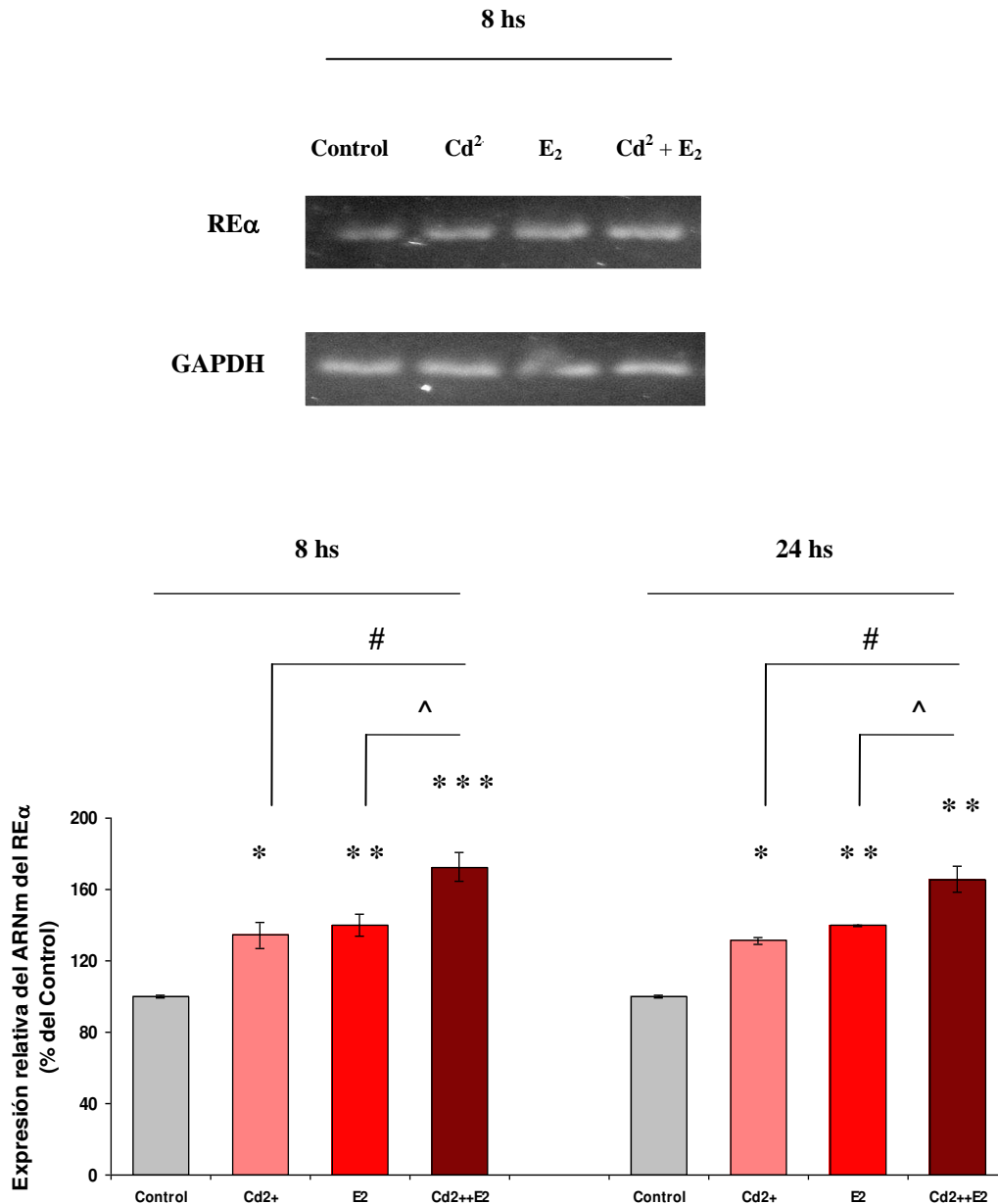
➤ El efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la secreción de PRL está mediado a través del  $\text{RE}\alpha$

### 5.2.5. El co-tratamiento con Cd<sup>2+</sup> y E<sub>2</sub> produce un efecto cooperativo sobre la expresión del ARNm del RE $\alpha$ y de PRL.

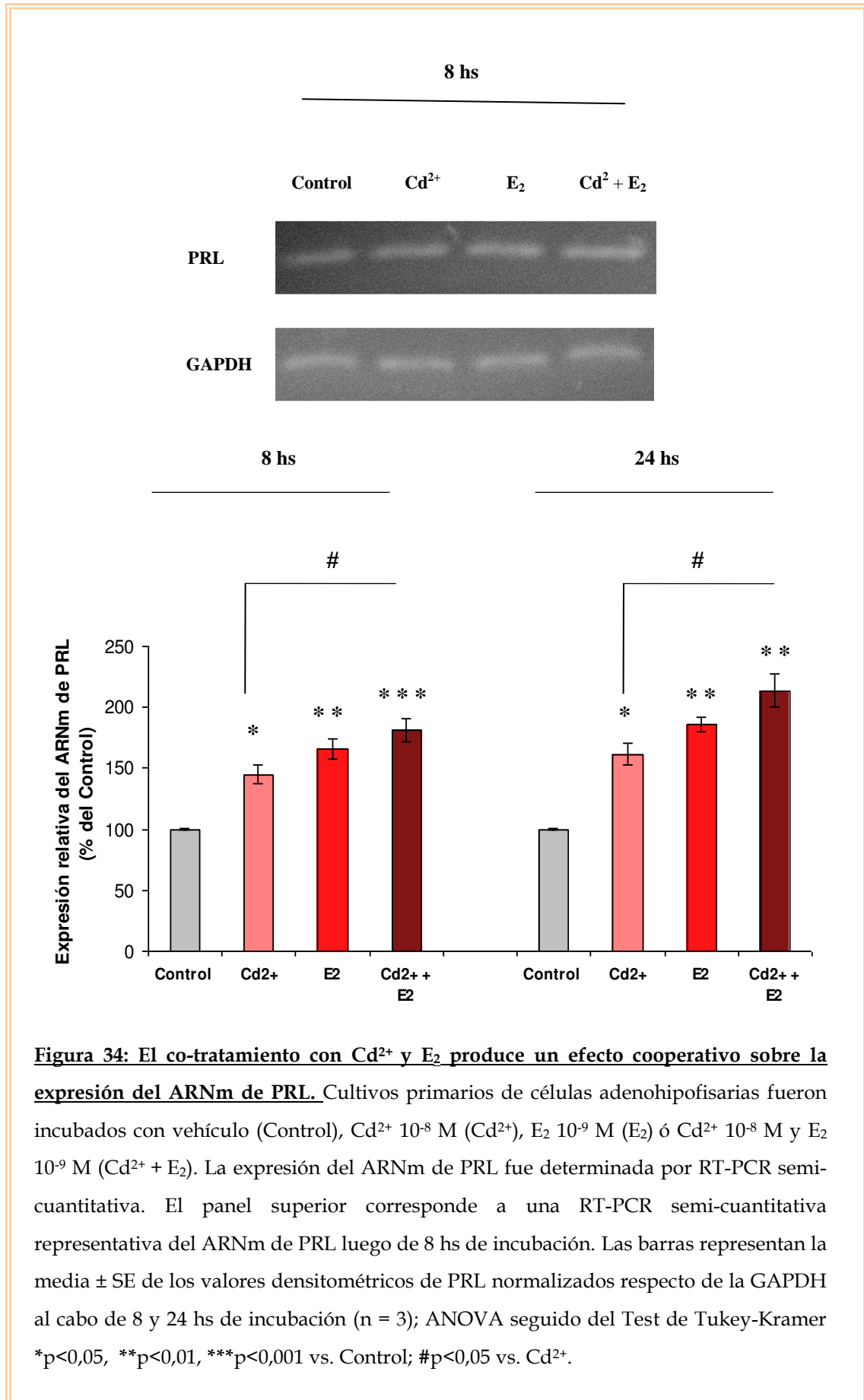
Poca información existe acerca de un posible efecto cooperativo (sinérgico o aditivo) del Cd<sup>2+</sup> con el E<sub>2</sub>. Experimentos realizados en anfibios (*Rana catesbeiana*), por ejemplo, mostraron que el co-tratamiento del Cd<sup>2+</sup> y E<sub>2</sub> provoca una mayor inducción de la vitelogénesis que el tratamiento con el E<sub>2</sub> solo (Lee y col., 2010). Para estimar esta posibilidad, determinamos la expresión del ARNm del RE $\alpha$  y de PRL en las células adenohipofisarias incubadas en presencia de Cd<sup>2+</sup>, E<sub>2</sub> ó Cd<sup>2+</sup> + E<sub>2</sub> mediante RT-PCR semi-cuantitativa.

La exposición al Cd<sup>2+</sup> o al E<sub>2</sub> produjo un aumento significativo de los niveles del mensajero del RE $\alpha$  al cabo de 8 hs de incubación (**Figura 33**). El co-tratamiento con Cd<sup>2+</sup> y E<sub>2</sub> incrementó la expresión del mensajero del RE $\alpha$ , efecto que fue significativamente mayor respecto al del Cd<sup>2+</sup> o al del E<sub>2</sub> por separado (**Figura 33**). Resultados similares se obtuvieron a las 24 hs (**Figura 33**).

Con respecto a la expresión del ARNm de PRL, ambos compuestos independientemente aumentaron en forma significativa los niveles del mensajero de PRL al cabo de 8 y 24 hs de incubación (**Figura 34**). El co-tratamiento con Cd<sup>2+</sup> y E<sub>2</sub> produjo una respuesta mayor que la de ambos compuestos por separado, sin embargo esta respuesta sólo fue significativa respecto a la del Cd<sup>2+</sup> a ambos tiempos estudiados (**Figura 34**).



**Figura 33: El co-tratamiento con Cd<sup>2+</sup> y E<sub>2</sub> produce un efecto cooperativo sobre la expresión del ARNm del REα.** Cultivos primarios de células adenohipofisarias fueron incubados con vehículo (Control), Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M (Cd<sup>2+</sup>), E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (E<sub>2</sub>) ó Cd<sup>2+</sup> 10<sup>-8</sup> M y E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M (Cd<sup>2+</sup> + E<sub>2</sub>). La expresión del ARNm del REα fue determinada por RT-PCR semi-cuantitativa. El panel superior corresponde a una RT-PCR semi-cuantitativa representativa del ARNm del REα luego de 8 hs de incubación. Las barras representan la media ± SE de los valores densitométricos del REα normalizados respecto de la GAPDH al cabo de 8 y 24 hs de incubación (n = 3); ANOVA seguido del Test de Tukey-Kramer \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Control; #p<0,05 vs. Cd<sup>2+</sup>; ^p<0,05 vs. E<sub>2</sub>.





### ***Co-tratamiento de Cd<sup>2+</sup> y E<sub>2</sub> - Conclusiones***

➤ El Cd<sup>2+</sup> y el E<sub>2</sub> muestran un efecto cooperativo sobre la expresión del mensajero del RE $\alpha$  y del de PRL en las células adenohipofisarias

### **5.3. *Discusión***

Los resultados de esta tesis muestran por primera vez que el  $\text{Cd}^{2+}$ , en concentraciones nanomolares, es capaz de actuar como un XE afectando la liberación hormonal y la proliferación celular adenohipofisaria.

Estudios epidemiológicos indican un aumento en la incidencia de enfermedades a nivel del sistema reproductor, tanto en humanos como en otros animales, así como también un incremento en la incidencia de cánceres hormono-dependientes. Diversas investigaciones sugieren que estas y otras patologías relacionadas son consecuencia de la exposición a contaminantes ambientales. Entre ellos, los conocidos como XEs, parecen jugar un papel importante en el desencadenamiento y desarrollo de dichas enfermedades (Jones y col., 1995).

El  $\text{Cd}^{2+}$  es un contaminante ambiental que ha sido clasificado como un carcinógeno humano de tipo I. Existen evidencias de que este metal es capaz de actuar como un DE estimulando la proliferación de células derivadas de cáncer de mama, endometrio y próstata (Byrne y col., 2009; Siewit y col., 2010).

La adenohipófisis es la glándula directriz que regula las diferentes glándulas periféricas. Sin embargo, aún teniendo un papel cardinal sobre el sistema reproductor, al momento del inicio de esta investigación no existían antecedentes sobre un posible efecto xenoestrogénico del  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel adenohipofisario. El eje hipotálamo-hipofisario juega un rol crucial en la supervivencia y la homeostasis del organismo. La integridad de dicha unidad es un factor fundamental para el desarrollo y funcionamiento normal del sistema reproductivo y del individuo como un todo. El  $\text{E}_2$  es el principal regulador de la secreción de PRL y de la proliferación celular (especialmente de los lactotropos) en la adenohipófisis.

## I. Proliferación celular adenohipofisaria.

En este trabajo demostramos que el  $\text{Cd}^{2+}$ , en concentraciones nanomolares, promueve la proliferación celular adenohipofisaria. Este efecto se manifiesta principalmente a nivel de los lactotrofos. Los somatotrofos y los gonadotrofos, en cambio, no modificaron su tasa de proliferación por efecto del metal. Siendo los lactotrofos el tipo celular adenohipofisario más sensible a los efectos proliferativos del  $\text{E}_2$ , estos resultados apoyan el papel xenoestrogénico y específico del  $\text{Cd}^{2+}$  a nivel adenohipofisario.

La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  también estimuló la proliferación celular de la línea GH3, línea celular lactosomatotropa derivada de un tumor sensible a  $\text{E}_2$ . Es decir que el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de incrementar la proliferación celular no sólo de las células normales sino también de las tumorales, a pesar de su alta tasa de proliferación intrínseca. En este sentido, existen evidencias de que el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de inducir un efecto similar en diferentes líneas celulares tumorales de mama humanas (Siewit y col., 2010; Byrme y col., 2009), así como también de próstata humana LNCaP (Martin y col., 2002).

El ciclo celular es un proceso extremadamente regulado, donde la expresión de ciertas proteínas controla estrictamente cada uno de sus pasos (Altucci y col., 1996; Dinda y col., 1997). Las ciclinas son una familia de proteínas involucradas directamente en la regulación de dicho proceso. Entre ellas, las ciclinas D, modulan la progresión de la transición G1/S (Qian y col., 1998; Kawashima y col., 2002). C-fos y c-myc son miembros importantes de la familia de factores de transcripción AP-1, cuya expresión es rápidamente inducida ante estímulos mitogénicos (Angel y Karin, 1991; Saulian y Karin, 2002). Un incremento en la expresión de estas proteínas es indicador de un estímulo de la proliferación celular.

La exposición al  $\text{Cd}^{2+}$  aumentó la expresión de las ciclinas D (ARNm y proteína) en el cultivo primario de células adenohipofisarias. Un resultado similar se obtuvo con la línea celular GH3. En concordancia con nuestros

resultados, otros grupos demostraron que el  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta la expresión de diferentes indicadores de proliferación celular tales como la expresión de la Cyc D1 en células tumorales mamarias de la línea MCF-7 (Brama y col., 2007; Siewit y col., 2010). El incremento en la expresión de las ciclinas D observado en el cultivo primario es muy posible que corresponda al producido por los lactotrofos dado que estas células son las que muestran el mayor índice de proliferación por la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , además al ser las que están en mayor proporción en la adenohipofipófisis (aproximadamente 40-50% del total de células) es difícil enmascarar su respuesta. La similitud de los resultados entre ambos tipos de cultivos celulares, el primario y el de la línea GH3, apoyan este resultado.

El  $\text{Cd}^{2+}$ , al igual que el  $\text{E}_2$ , también aumentó la expresión del mensajero de c-fos, proto-oncogen indicador de proliferación celular, en las células adenohipofisarias. En el mismo sentido otros autores han demostraron que el  $\text{Cd}^{2+}$  aumenta la expresión de los proto-oncogenes c-fos y c-myc en la línea MCF-7 (Brama y col., 2007; Siewit y col., 2010). De forma similar, el grupo de Ben Jonathan y col. demostraron que el tratamiento con  $\text{E}_2$  aumenta la expresión de c-fos en los lactotrofos de ratas Fischer 344, teniendo su máximo efecto al cabo de 6 hs de incubación (Allen y col., 1997).

## II. Secreción de PRL.

La PRL es una hormona hipofisaria secretada por los lactotrofos que participa en múltiples procesos fisiológicos (Freeman y col., 2000). Se sabe que variaciones en sus niveles pueden traer consecuencias serias para el individuo (Bole-Feysot y col., 1998).

Muchas de las funciones de los lactotrofos están reguladas por los estrógenos. Los estrógenos aumentan la expresión, el número de gránulos secretores y la liberación de PRL (Kiino y Dannies, 1981; Kiino y Dannies, 1982; Shull y Gorski, 1984; Maurer y col., 1990). Además, inducen la transdiferenciación de somatolactotrofos a lactotrofos (Boockfor y col., 1986; Kineman, 1992) y estimulan la proliferación de los lactotrofos (Lam y col., 1990, Hashi y col., 1996).

En este estudio mostramos por primera vez que el  $Cd^{2+}$  aumenta la expresión del mensajero de PRL y la liberación de la hormona en las células adenohipofisarias en cultivo. A pesar del papel esencial que cumple la PRL en el organismo, existen muy pocos trabajos que hayan estudiado los efectos xenoestrogénicos de los contaminantes ambientales sobre la secreción de dicha hormona. Wade y col. reportaron que el endosulfano (pesticida órgano clorado) no posee efectos sobre la liberación de PRL *in vivo* (Wade y col., 1997), mientras que Rousseau y col. postularon que dicho XE, al igual que el clordano (otro pesticida órgano clorado), aumentan la expresión de su mensajero en la línea celular GH3 (Rousseau y col., 2002). El BPA (compuesto utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato, resinas y selladores dentales) presenta una potente actividad xenoestrogénica y, en forma similar al  $Cd^{2+}$ , modula la liberación de PRL tanto *in vitro* como *in vivo*, además de inducir la proliferación celular de los lactotrofos (Steinmetz y col., 1997).

**Las evidencias hasta aquí presentadas muestran que El  $Cd^{2+}$  es capaz de inducir proliferación de las células adenohipofisarias, en especial**

**estimulando la proliferación de los lactotropos y de la línea celular GH3. Tanto la Cyc D1 y D3, como el proto-oncogen c-fos, están involucrados en dicho efecto. La exposición al Cd<sup>2+</sup> también aumenta la secreción de PRL en las células adenohipofisarias**

### **III. Participación del RE $\alpha$ en los efectos del Cd<sup>2+</sup> a nivel adenohipofisario.**

Hasta el momento nuestros resultados apoyan el papel xenoestrogénico del Cd<sup>2+</sup>. Este metal, en concentraciones nanomolares, es capaz de inducir la proliferación de los lactotopos y de la línea celular GH3 e incrementar la síntesis y liberación de PRL en las células adenohipofisarias.

Es conocido que los estrógenos estimulan la proliferación de los lactotopos y la secreción de PRL a través del RE $\alpha$ .

El ICI, un antiestrógeno puro que se une al RE (Wakeling y col., 1991), nos ha permitido establecer que los efectos del Cd<sup>2+</sup> sobre la proliferación celular y la secreción de PRL están mediados a través del RE $\alpha$ . Dicho antagonista previno el aumento en la expresión de las ciclinas D inducidos por el Cd<sup>2+</sup> en las células adenohipofisarias. Resultados similares fueron obtenidos por Siewit y col. en la línea celular MCF-7 (Siewit y col., 2010). Respecto a la PRL, y apoyando nuestros resultados, Elango y col. demostraron que el aumento en la expresión de esta hormona inducido por otros XEs como el DDT es impedido por la administración conjunta con ICI en cultivos primarios de adenohipófisis de trucha arcoíris (Elango y col., 2006).

**En suma, el RE $\alpha$  media el efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la proliferación celular y la secreción de PRL en las células adenohipofisarias.**

#### IV. Expresión del RE $\alpha$ .

Como se mencionó en la introducción, el E<sub>2</sub> es capaz de regular la expresión de su propio receptor en diferentes tejidos. La adenohipófisis expresa tanto la isoforma de 66 kDa del RE $\alpha$  (RE $\alpha$ 66), como las dos variantes truncadas (RE $\alpha$ 46 y RE $\alpha$ 36).

Nuestros resultados muestran por primera vez que el Cd<sup>2+</sup> es capaz de modular la expresión del mensajero del RE $\alpha$  en las células adenohipofisarias. Los niveles de dicho mensajero muestran un aumento durante los primeros tiempos de exposición al metal (8 y 24 hs), decayendo a tiempos más prolongados (72 hs). Martin y col. también observaron un efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre la expresión del RE $\alpha$ . Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, ellos encuentran una disminución en la expresión del mensajero del RE $\alpha$  al cabo de 24 hs de exposición al metal en las células MCF-7 (García Morales y col., 1994). Aunque los resultados no son totalmente comparables dado que la concentración de Cd<sup>2+</sup> utilizada por dicho grupo fue dos órdenes de magnitud mayor a la empleada por nosotros, apoyan el hecho de que el Cd<sup>2+</sup> sea capaz de afectar la expresión del RE $\alpha$ .

Cuando examinamos la expresión proteica del RE $\alpha$  pudimos ver que el Cd<sup>2+</sup> modifica los niveles de la isoforma del receptor RE $\alpha$ 66 y de su variante truncada RE $\alpha$ 46, siendo estos cambios paralelos a aquellos observados en la expresión del mensajero. La expresión de la variante RE $\alpha$ 36 fue comparativamente baja y difícil de detectar en las mismas condiciones de ensayo.

Existen evidencias bibliográficas que muestran que el tratamiento con E<sub>2</sub> afecta la expresión del RE $\alpha$ 66 y de sus variantes truncadas. En este sentido, el grupo de Ben-Jonathan y col. ha demostrado que el tratamiento con E<sub>2</sub> aumenta la expresión de los mensajeros de ambas variantes truncadas en las hipófisis de ratas Fischer 344, mientras que en las ratas Sprague-Dawley una sola de las



variantes es afectada (Mitchner y. col., 1998). Otros autores han observado que el tratamiento con E<sub>2</sub> induce la expresión de la isoforma RE $\alpha$ 66 y la variante RE $\alpha$ 46 en cultivos de macrófagos humanos (Murphy y col., 2009). Se ha propuesto que el RE $\alpha$ 46 es capaz formar un dímero con el RE $\alpha$ 66, el cual sería menos activo y por lo tanto funcionaría como un dominante negativo regulando así la actividad del receptor (Mitchner y. col., 1998). Futuros estudios son necesarios para determinar si el aumento en las variantes significa un aumento o una disminución en la actividad del receptor.

**El Cd<sup>2+</sup> modula la expresión del RE $\alpha$  y de sus variantes truncadas imitando los efectos del E<sub>2</sub> sobre su receptor en las células adenohipofisarias.**

## V. Co-tratamiento $\text{Cd}^{2+}$ y $\text{E}_2$ .

En esta investigación revelamos un efecto cooperativo entre el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{E}_2$  a nivel de la expresión de los mensajeros de PRL y del  $\text{RE}\alpha$  en las células adenohipofisarias.

Muy pocos son los estudios que han examinado el efecto de la combinación de XEs con los estrógenos naturales sobre alguna respuesta típicamente estrogénica (Jeng y col., 2010).

Con respecto a la PRL, la información bibliográfica muestra resultados contradictorios, posiblemente debido a las diferentes condiciones de estudio y del tipo celular utilizado. Jeng y col. observaron que la combinación de algunos XEs (alquilfenoles) con concentraciones fisiológicas de diferentes estrógenos naturales (estradiol, estriol y estrona) estimula o inhibe la liberación de PRL en la línea celular GH3/B6/F10, dependiendo tanto de la concentración como de la dupla estrógeno/XE utilizada (Jeng y col., 2010).

En cuanto al  $\text{RE}\alpha$ , existen evidencias de que el  $\text{Cd}^{2+}$  interacciona con el  $\text{RE}\alpha$  a través del sitio de unión al ligando (Stoica y col., 2000). Sin embargo, como la presencia del metal no altera la unión del  $\text{E}_2$  a su receptor, se ha postulado que esta unión es del tipo no competitiva (Fechner y col., 2011). El grupo de Stoica y col. mostró que la combinación de  $\text{E}_2$  con algunos metales (cobre, cobalto y plomo) tiene un efecto aditivo sobre la expresión del mensajero y de la de proteína de dicho receptor en la línea celular MCF-7 (Martin y col., 2003), apoyando nuestros resultados.

**En síntesis, el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{E}_2$  muestran un efecto cooperativo sobre la expresión del mensajero del  $\text{RE}\alpha$  y del de PRL en las células adenohipofisarias. Esta respuesta cooperativa podría ser del tipo aditiva más que sinérgica, dado que el  $\text{Cd}^{2+}$  interacciona con el  $\text{RE}\alpha$  a través del mismo sitio que lo hace  $\text{E}_2$ .**

## 6. Conclusiones

♣ En este trabajo de tesis investigamos si el tratamiento *a posteriori* con melatonina o la interrupción de la exposición al metal son capaces de revertir el estrés oxidativo y los cambios en la secreción hormonal inducidos por la exposición crónica al  $\text{Cd}^{2+}$  *in vivo* a nivel adenohipofisario. Este estudio nos permitió obtener la siguiente conclusión que consideramos de importancia para la salud:

El tratamiento con melatonina, ya sea simultáneo o *a posteriori* de la exposición al  $\text{Cd}^{2+}$ , o el cese de la exposición al metal son dos métodos efectivos para proteger a la glándula del efecto oxidante y del de disruptor endocrino del  $\text{Cd}^{2+}$ . Considerando las características de esta neurohormona, es plausible su utilización tanto en tratamientos preventivos como curativos o al menos paliativos.

**Nuestros resultados apoyan la relevancia de alejar a un individuo de la fuente de contaminación como uno de los primeros pasos a seguir, al menos en lo que respecta a la fisiología adenohipofisaria.**

Dada la alta sensibilidad de la adenohipófisis al efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  y en especial su papel sobre la secreción de PRL, un hallazgo significativo de nuestros resultados es la posibilidad de utilizar esta hormona como marcador de seguimiento en el tratamiento por intoxicación con dicho metal.

♣ También investigamos si el  $\text{Cd}^{2+}$  es capaz de actuar como un xenoestrógeno a nivel adenohipofisario. Nuestros resultados muestran por primera vez que el  $\text{Cd}^{2+}$ , en concentraciones nanomolares, posee una potente actividad xenoestrogénica, siendo capaz de inducir la proliferación celular

adenohipofisaria y la secreción de PRL. Este metal, al igual que el E<sub>2</sub>, regula la expresión del RE $\alpha$  y de sus variantes truncadas en estas células.

El Cd<sup>2+</sup> y el E<sub>2</sub> muestran además un efecto cooperativo sobre la expresión del mensajero del RE $\alpha$  y del de PRL.

**En su papel xenoestrogénico, el Cd<sup>2+</sup>, puede alterar el delicado balance hormonal que regula funciones básicas del organismo tales como la reproducción y además favorecer el desarrollo neoplásico de tejidos estrógeno-dependientes.**

## 7. Referencias

Adamson A D, Friedrichsen S, Semprini S, Harper C V, Mullins J J, White M R H and Davis J R E, 2008. Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: Convergence with tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling. *Endocrinology* 149(2): 687-694.

Akesson A, Julin B and Wolk A, 2008. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: A population-based prospective cohort study. *Cancer Res* 68(15):6435-41.

Akingbemi B T, Sottas C M, Koulova A I, Klinefelter G R and Hardy M P, 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145(2):592-603.

Alonso-Gonzalez C, Mediavilla D, Martinez-Campa C, Gonzalez A, Cos S and Sanchez-Barcelo E J, 2008. Melatonin modulates the cadmium-induced expression of MT-2 and MT-1 metallothioneins in three lines of human tumor cells (MCF-7, MDA-MB-231 and HeLa). *Toxicol Lett* 181(3):190-5.

Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker M G, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F and Weisz A, 1996. 17 $\beta$ -Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 12:2315-2324.

Allen D, Mitchner N, Uveges T, Nephew K, Khan S and Ben Jonathan N, 1997. Cell-specific induction of c-fos expression in the pituitary gland by estrogen. *Endocrinology* 138 (5):2128-2135.

Amara S, Abdelmelek H, Garrel C, Guiraud P, Douki T, Ravanat J L, Favier A, Sakly M and Ben Rhouma K, 2008. Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *J Reprod Dev* 54: 129-134.

American Cancer Society, 1993. *Cancer facts and figures-1993*. American Cancer Society, Atlanta, GA1.

Amiard J C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J and Rainbow P S, 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76(2):160-202.

Andoh T, Chock P B and Chiueh C C, 2002. Preconditioning-mediated neuroprotection: Role of nitric oxide, cGMP, and new protein expression. *Ann N Y Acad Sci* 962:1-7.

Andrews G K, 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59:95-104.

Angel P and Karin M, 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072: 129-157.

- Antila E, Mussalo-Rauhamaa H, Kantola M, Atroshi F and Westermarck T, 1996. Association of cadmium with human breast cancer. *Sci Total Environ* 186:251–256.
- Arese M, Magnifico M C, Mastronicola D, Altieri F, Grillo C, Blanck T J and Sarti P, 2012. Nanomolar melatonin enhances nNOS expression and controls HaCaT-cells bioenergetics. *IUBMB Life* 64(3):251-8.
- Balabanič D, Rupnik M and Klemenčič A K, 2011. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. *Reprod Fertil Dev* 23(3):403-16.
- Bedard K and Krause K H, 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245–313. |
- Benedetti J L, Samuel O, Dewailly E, Gingras S and Lefebvre M A, 1999. Levels of cadmium in kidney and liver tissues among a canadian population (Province of Quebec). *J Toxicol Environ Health A* 56(3):145-163.
- Ben-Jonathan N, 1980. Catecholamines and pituitary prolactin release. *J Reprod Fertil* 58(2):501-12.
- Ben-Jonathan N and Steinmetz R, 1998. Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metab* 9(3):124-8.
- Beveridge R, Pintos J, Parent M E, Asselin J and Siemiatycki J, 2010. Lung cancer risk associated with occupational exposure to nickel, chromium VI, and cadmium in two population-based case-control studies in Montreal. *Am J Ind Med* 53(5):476-85.
- Bhattacharyya M H, Wilson A K, Rajan S S and Jonah M, 2000. Biochemical pathways in cadmium toxicity. In: *Molecular Biology and Toxicology of Metals*. Zalup R K, Koropatnick J, (eds), Taylor and Francis, London: 1–74.
- Bokoch G M and Knaus U G, 2003. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!. *Trends Biochem Sci* 28:502-508.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N and Kelly P A, 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19(3):225-68.
- Boockfor F R, Hoeffler J P and Frawley L S, 1986. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *Am J Physiol* 250:E103–E105.
- Bottner M and Wuttke W, 2005. Chronic treatment with low doses of estradiol affects pituitary and thyroid function in young and middle-aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 6: 261–269.
- Boue S M, Wiese T E, Nehls S, Burow M E, Elliott S, Carter-Wientjes C H, Shih B Y, McLachlan J A and Cleveland T E, 2003. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem* 51(8):2193–2199.

Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G, Mariani S, Cherubini S, d'Abusco AS, Scandurra R and Migliaccio S, 2007. Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER $\alpha$  dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 264:102-108.

Brama M, Politi L, Santini P, Migliaccio S and Scandurra R, 2012. Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: Role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. *J Endocrinol Invest* 35(2):198-208.

Brann D W, Bhat G K, Lamar C A and Mahesh V B, 1997. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 65(6):385-395.

Brown N M and Lamartiniere C A, 1995. Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat. *Environ Health Perspect* 103:708-713.

Burger H, 2003. Hormone replacement therapy in the post-Women's Health Initiative era. Report a meeting held in Funchal, Madeira, February 24-25. *Climacteric* 6(1):11-36.

Burns G and Sarkar D K, 1993 Transforming growth factor- $\beta$ -like immunoreactivity in the pituitary gland of the rat: Effect of estrogen. *Endocrinology* 133:1444-1449.

Byrne C, Divekar S D, Storchan G B, Parodi D A and Martin M B, 2009. Cadmium - a metalloestrogen?. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 266-271.

Camacho M E, Carrion M D, Lopez-Cara L C, Entrena A, Gallo M A, Espinosa A, Escames G and Acuna-Castroviejo D, 2012. Melatonin synthetic analogs as nitric oxide synthase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 12(7):600-17.

Cardoso N, Pandolfi M, Ponzio O, Carbone S, Szwarcfarb B, Scacchi P and Reynoso R, 2012. Evidence to suggest glutamic acid involvement in bisphenol A effect at the hypothalamic level in prepubertal male rats. *Neuro Endocrinol Lett* 31(4):512-6.

Casalino E, Sblano C and Landriscina C, 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: The possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 346(2):171-9.

Casalino E, Sblano C and Landriscina C, 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement. *Arch Biochem Biophys* 346: 171-179.

Clemons M and Goss P, 2001. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344 (4):276-285.

Conn P M, Mc Ardle, C A, Andrews, W V and Huckle W R, 1987. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biol Reprod* 36(1):17-35.

Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair A R, Munters E, Artois T J, Nawrot T, Vangronsveld J and Smeets K, 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 23(5):927-40.

Chaney R L, Ryan J A, Li Y M and Brown S L, 1999. Soil cadmium as a threat to human health. In: McLaughlin, M J, Singh, B R (Eds.), *Developments in Plant and Soil Sciences*, vol. 85. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 219-256.

Chen H T, 1987. Postnatal development of pituitary lactotropes in the rat measured by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 120(1):247-53.

Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Zhou H, Chen W, Shen T, Han X, Kontos C D and Huang S, 2011. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 50(5):624-32.

Cherif J, Mediouni C, Ben Ammar W and Jemal F, 2011. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J Environ Sci (China)* 23(5):837-44.

Dada M O, Campbell G T and Blake C A, 1983. A quantitative immunocytochemical study of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone cells in the adenohypophysis of adult male rats and adult female rats throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 113(3):970-84.

Dada M O, Campbell G T and Blake C A, 1984. Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *J Endocrinol* 101(1):87-94.

Dawn, B and Bolli R, 2002. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 962:18-41.

De Figueiredo F J, 1965. Piqui Plant Food. *Rev Bras Med* 22(9):580-582.

Denef C, 2008. Paracrinicity: The story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 20(1):1-70.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J P, Giudice L C, Hauser R, Prins G S, Soto A M, Zoeller R T and Gore A C, 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30(4):293-342.

Dinda S, Kodali-Gali S, Sevilla L, Burkley M, Hurd C and Moudgil V K, 1997. Inhibition of proliferation of T47D human breast cancer cells: Alterations in progesterone receptor and p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biochem* 175:81-89.

Dorta D J, Leite S, DeMarco K C, Prado I M, Rodrigues T, Mingatto F E, Uyemura S A, Santos A C and Curti C, 2003. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J Inorg Biochem* 97:251-257.

Drummond A E, Baillie A J and Findlay J K, 1999. Ovarian estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA expression: impact of development and estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 149:153-161.



- Duvilanski B H, Seilicovich A, Diaz M C, Muñoz Maines V, Lasaga M and Debeljuk L, 1985. Effect of GABA-T inhibitors on prolactin secretion *in vitro*. *Eur J Pharmacol* 115(1):65-69.
- Ebadi M, Leuschen M P, El Refaey H, Hamada F M and Rojas P, 1996. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem Int* 29: 159-166.
- Elango A, Shepherd B and Chen T T, 2006. Effects of endocrine disrupters on the expression of growth hormone and prolactin mRNA in the rainbow trout pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 145(2):116-27.
- Falcón J, Besseau L, Fazzari D, Attia J, Gaildrat P, Beauchaud M and Boeuf G, 2003. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* 144(10):4648-58.
- Fechner P, Damdimopoulou P and Gauglitz G, 2011. Biosensors paving the way to understanding the interaction between cadmium and the estrogen receptor alpha. *PLoS One* 6(8):e23048.
- Fiala J, Hrubá D, Crha I, Rézl P and Totûsek J, 2001. Is environmental cadmium a serious hazard to Czech population? *Int J Occup Med Environ Health* 14:185-188.
- Fleury C, Mignotte B and Vayssière J L, 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. *Biochimie* 84:131-141.
- Freeman M E, Kanyicska B, Lerant A and Nagy G, 2000. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80(4):1523-1631.
- Frery N, Nessmann C, Girard F, Lafond J, Moreau T, Blot P, Lellouch J and Huel G, 1993. Environmental exposure to cadmium and human birth-weight. *Toxicology* 79:109-118.
- Galbraith R, 1999. Heme oxygenase: Who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 299-305.
- García-Morales P, Saceda M, Kenney N, Salomon D S, Kim N, Salomon D S, Gottardis M M, Solomon H B, Sholler P F, Jordan V C and Martin M B, 1994. Effect of cadmium on estrogen receptor levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269:16896-16901.
- Garrett S H, Sens M A, Todd J H, Somji S and Sens D A, 1999. Expression of MT-3 protein in the human kidney. *Toxicol Lett* 105: 207-114.
- Gershengorn M C, 1986. Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annu Rev Physiol* 48:515-526.
- Goering P L, Waalkes M P and Klaassen C D, 1995. Toxicology of cadmium, in: *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects, Handbook of Experimental Pharmacology*, Goyer RA, Cherian MG (eds), Springer, New York, 189-213.

Gotz F, Thieme S and Dorner G, 2001. Female infertility—effect of perinatal xenoestrogen exposure on reproductive functions in animals and humans. *Folia Histochem Cytobiol* 39(2):40–43.

Guenther A, Schmidt S and Laatsch H, 2005. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxy-ykynuramine) with reactive nitrogen species: Formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 39: 251–252.

Guenther A L, Schmidt S I, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressmeyer A R, Poeggeler B and Hardeland R, 2005. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-Acetyl-5-Methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 39(3):251-260.

Halliwell B, 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2):312–322

Hamada T, Tanimoto A and Sasaguri Y, 1997. Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* 2:359–367.

Hao C and Hao W, 2011. Role of ERK in the hormesis induced by cadmium chloride in HEK293 cells. *Wei Sheng Yan Jiu* 40(4):517-22.

Hardeland R, Poeggeler B and Niebergall R, 2003. Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. *J Pineal Res* 34: 17–25.

Hardeland R, Coto-Montes A and Poeggeler B, 2003. Circadian rhythms, oxidative stress and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* 20(6):921-962.

Hashi A, Mazawa S, Chen S, Yamakawa K, Kato J and Arita J, 1996 Estradiol-induced diurnal changes in lactotroph proliferation and their hypothalamic regulation in ovariectomized rats. *Endocrinology* 137:3246–3252.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M and Gustafsson J A, 2007. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87: 905–931.

Henson M and Chedrese P J, 2004. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* 229(5):383-92.

Henson M C and Anderson M B, 2000. The effects of cadmium on placental endocrine function. *Recent Res Dev Endocrinol* 1:37–47.

Herynk M and Fuqua S, 2004. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 25:869-898.

Himeno S, Yanagiya T, Enomoto S, Kondo Y and Imura N, 2002. Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese. *Tohoku J Exp Med* 196(1):43-50.

Höfer N, Diel P, Wittsiepe J, Wilhelm M, Kluxen F M and Degen G H, 2010. Investigations on the estrogenic activity of the metallo-hormone cadmium in the rat intestine. *Arch Toxicol* 84:541-552.

Hozumi I, Suzuki J S, Kanazawa H, Hara A, Saio M, Inuzuka T, Miyairi S, Naganuma A and Tohyama C, 2008. Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat. *Neurosci Lett* 438: 54-58.

Huff J, Lunn R M, Waalkes M P, Tomatis L and Infante P F, 2007. Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *Int J Occup Environ Health* 13(2):202-12.

Hunter D S, Hodges L C, Vonier P M, Fuchs-Young R, Gottardis M M and Walker C L, 1999. Estrogen receptor activation via activation function 2 predicts agonism of xenoestrogens in normal and neoplastic cells of the uterine myometrium. *Cancer Res* 59:3090-9.

Hyde J F, Engle M G and Maley B E, 1991. Colocalization of galanin and prolactin within secretory granules of anterior pituitary cells in estrogen-treated Fischer 344 rats. *Endocrinology* 129:270-276.

Iavicoli I, Fontana L and Bergamaschi A, 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 12(3):206-23.

International Agency for Research on Cancer, 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Working group views and expert opinions. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 58:1-415.

Itoh N, Shibayama H, Kanekiyo M, Namphung D, Nakanishi T, Matsuyama A, Odani T and Tanaka K, 2005. Reduced bactericidal activity and nitric oxide production in metallothionein-deficient macrophages in response to lipopolysaccharide stimulation. *Toxicology* 216: 188-196.

Jarup L, Berglund M, Elinder C G, Nordberg G and Vahter M, 1998. Health effects of cadmium exposure—A review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 24(1): 1-51.

Jeng Y J, Kochukov M and Watson C S, 2010. Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter calcium and kinase responses, prolactin release, and membrane estrogen receptor trafficking in rat pituitary cells. *Environ Health* 9:61.

Jiang G, Duan W, Xu L, Song S, Zhu C and Wu L, 2009. Biphasic effect of cadmium on cell proliferation in human embryo lung fibroblast cells and its molecular mechanism. *Toxicol In Vitro* 23(6):973-8.

Jiménez I, Gotteland M, Zarzuelo A, Uauy R and Speisky H, 1997. Loss of the metal binding properties of metallothionein induced by hydrogen peroxide and free radicals. *Toxicology* 120(1):37-46.

Johnson M D, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler P F, Lirio A A, Foss C, Reiter R, Trock B, Palk S and Martin M B, 2003.

Cadmium mimics the *in vivo* effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature Med* 9:1081–1084.

Jurczuk M, Brzoska M M, Moniuszko-Jakoniuk J, Gałazyn-Sidorczuk M and Kulikowska-Karpińska E, 2004. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol* 42(3):429–438.

Katakai K, Liu J, Nakajima K, Keefer L K and Waalkes M P, 2001. Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. *Toxicol Lett* 119: 103–108.

Kawashima K, Yamakawa K, Takahashi W, Takizawa S, Yin P, Sugiyama N, Kanba S and Arita J, 2002. The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by Insulin/IGF-1: A cell context-specific antimutagenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology* 143(7):2750–2758.

Kensler T W, Wakabayashi N and Biswal S, 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89–116.

Kiino D R and Dannies P S, 1981. Insulin and 17 $\beta$ -estradiol increase the intracellular prolactin content of GH4C1 cells. *Endocrinology* 109:1264–1269.

Kiino D R and Dannies P S, 1982 Hormonal regulation of prolactin storage in a clonal strain of rat pituitary tumor cells. *Yale J Biol Med* 55:409–420.

Kineman R D, Faught W J and Frawley L S, 1992. Steroids can modulate transdifferentiation of prolactin and growth hormone in bovine pituitary cultures. *Endocrinology* 130:3289–3294.

Klaassen C D, Liu J and Diwan B A, 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3):215–20.

Kloas W, Lutz I and Einspanier R, 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci Total Environ* 225:59–68.

Koller L D, 1998. Cadmium. In: *Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals*. Zelikoff J T, Thomas, P T (eds.), Taylor & Francis, London, 41–61.

Königsberg Fainstein, 2007. NRF2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* 26(001):18–25.

Kumar P, Prasad Y, Patra A K, Ranjan R, Swarup D, Patra R C and Pal S, 2009. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (*Clarias batrachus*). *Sci Total Environ* 407: 5024–5030.

Kusakabe T, Nakajima K, Nakazato K, Suzuki K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Arakawa K and Nagamine T, 2008. Changes of heavy metal, metallothionein and heat

shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicol In Vitro* 22(6):1469-75.

Laessig S A, McCarthy M M and Silbergeld E K, 1999. Neurotoxic effects of endocrine disruptors. *Curr Opin Neurol* 12:745-751.

Lafuente A, Cano P and Esquifino A, 2003. Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent? *Biometals* 16(2):243-50.

Lafuente A, Márquez N, Pazo D and Esquifino A I, 2001. Cadmium effects on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. *J Physiol Biochem* 57(3):231-6.

Lafuente A and Esquifino A I, 1999. Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male. *Toxicol Lett* 110(3):209-218.

Lam K S L, Srivastava G, Lechan R M, Lee T and Reichlin S, 1990. Estrogen regulates the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 52:417-421.

Langston W J, Chesman B S, Burt G R, Pope N D and McEvoy J, 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *Mar Environ Res* 53(3):263-93.

Lasaga M, Debeljuk L, Afione S, Aleman I T and Duvilanski B, 1989. Effects of passive immunization against vasoactive intestinal peptide on serum prolactin and LH levels. *Neuroendocrinology* 49(6):574-9.

Lasfer M, Vadrot N, Aoudjehane L, Conti F, Bringuier A F, Feldmann G and Reyl-Desmars F, 2008. Cadmium induces mitochondria-dependent apoptosis of normal human hepatocytes. *Cell Biol Toxicol* 24:55-62.

Lee K, Lau K and Ho S, 1999. Effects of cadmium on metallothionein-I and metallothionein-II mRNA expression in rat ventral. *Appl Pharmacol* 154: 20-27.

Lee K W, Chang Z, Oh B S, Lu M and Park J S, 2010. Estrogenic response in male bullfrog (*Rana catesbeiana*) hepatocytes after single or combined exposure to cadmium (Cd) and 17beta-estradiol (E2). *Bull Environ Contam Toxicol* 85(5):452-6.

Leret M L, Millan J A and Antonio M T, 2003. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology* 186:125-130.

Ling X, Zhang Y, Lu Y and Huang H, 2011. Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water. *Environ Technol* 32(13-14):1463-70.

Liu J, Qu W and Kadiiska M B, 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:209-214.

- Liu Y, Wang K, Xu P and Wang Z, 2012. Physiological responses and tolerance threshold to cadmium contamination in *Eremochloa ophiuroides*. *Int J Phytoremediation* 14(5):467-80.
- Liu Z, Yu X and Shaikh Z A, 2008. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 228:286-294.
- Liu J, Qu W, Saavedra J E and Waalkes M P, 2004. The nitric oxide donor, O<sup>2</sup>-vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (V-PYRRO/NO), protects against cadmium-induced hepatotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 310:18-24.
- Lopez E, Arce C, Oset-Gasque M J, Cañadas S and González M P, 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med* 40:940-951.
- Martin M B, Reiter R, Pham T, Avellanet Y R, Camara J, Lahm M, Pentecost E, Pratap K, Gilmore B A, Diverakar S, Dagata R S, Bull J L and Stoica A, 2003. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 144:2425-2436.
- Martin M B, Voeller H J, Gelmann E P, Lu J, Stoica E G, Hebert E J, Reiter R, Singh B, Danielsen M, Pentecost E and Stoica A, 2002. Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. *Endocrinology* 143(1):263-75.
- Matsushita N, Kato Y, Shimatsu A, Katakami H, Yanaihara N and Imura H, 1983. Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. *Life Sci* 32(11):1263-1269.
- Maurer R A, Kim K E, Day R N and Notides A C, 1990. Regulation of prolactin gene expression by estradiol. In: Sato G, Stevens J L (eds) *Molecular Endocrinology and Steroid Hormone Action*. Liss, New York, 159-169.
- Mayo K E, Miller T, De Almeida V, Godfrey P, Zheng J and Cunha S R, 2000. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Prog Horm Res* 55:237-267.
- Messaoudi I, Hammouda F, El Heni J, Baati T, Saïd K and Kerkeni A, 2010. Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Exp Toxicol Pathol* 62(3):281-8.
- Miler E A, Ríos de Molina M C, Domínguez G and Guerra L N, 2008. Thyroid hormone effect in human hepatocytes. *Redox Rep* 13(4):185-91.
- Miler E A, Nudler S I, Quinteros F A, Cabilla J P, Ronchetti S A and Duvilanski B H, 2010. Cadmium induced-oxidative stress in pituitary gland is reversed by removing the contamination source. *Hum Exp Toxicol* 29(10):873-80.
- Miller J and Boswell F, 1981. Cadmium, lead and zinc in growing rats fed corn leaf tissue grown on soil amended with sewage sludge or heavy metal salts. *Environ Health Perspect* 42: 197-202.

- Misra R R, Hochadel J F, Smith G T, Cook, J C, Waalkes M P and Wink D A, 1996. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 9:326-332.
- Mitchner N A, Garlick C and Ben-Jonathan N, 1998. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors {alpha} and {beta} in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139:3976-3983.
- Miura Nobuhiko, 2009. Individual susceptibility to cadmium toxicity and metallothionein gene polymorphisms: with references to current status of occupational cadmium exposure. *Ind Health* 47(5):487-94.
- Monje J, Bernhardt T, Muñoz-de-Toro M, Luque E and Ramos J, 2008. Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17 $\beta$ -estradiol. *Reprod Toxicol* 26:138-145.
- Morse D and Choi A M, 2002. Heme oxygenase-1: The "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27(1):8-16.
- Mosavi-Jarrahi A, Mohagheghi M, Kalaghchi B, Mousavi-Jarrahi Y and Noori M K, 2009. Estimating the incidence of lung cancer attributable to occupational exposure in Iran. *Popul Health Metr* 7:7.
- Murad F, 2006. Shattuck lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355(19):2003-2011.
- Murphy A J, Guyre P M, Wira C R and Pioli P A, 2009. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ER $\alpha$ 46 in human macrophages. *PLoS One* 4(5):e5539.
- Nakajima T, Yamaguchi H and Takahashi K, 1980. S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 191(2):523-31.
- Nath R, Kambadur R, Gulati S, Paliwal V K and Sharma M, 1988. Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins. *Crit Rev Food Nutr* 27: 41-85.
- Navarro Silvera S A and Rohan T E, 2007. Trace elements and cancer risk: A review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control* 18:7-27.
- Nogawa K, Kobayashi E, Okubo Y and Suwazono Y, 2004. Environmental cadmium exposure, adverse effects and preventive measures in Japan. *Biometals* 17(5):581-587.
- Nordberg G, Jin T and Nordberg M, 1994. Sub-cellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis. *Environ Health Perspect* 102: 191-194.
- Ognjanović B I, Marković S D, Pavlović S Z, Zikić R V, Stajin A S and Saicić Z S, 2008. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol Res* 57: 403-411.

- Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T and Morii S, 1993. Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *Anat Record* 235: 111-120.
- Rivera O E, Varayoud J, Rodríguez H A, Muñoz-de-Toro M and Luque E H, 2011. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reprod Toxicol* 32: 304-312.
- Otterbein L E, Soares M P, Yamashita K and Bach F H, 2003. Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24(8):449-455.
- Page R, 1994. The anatomy of hipothalamus-hipophysial complex. Ed. Knobil E and Neill J. The physiology of reproduction 2<sup>nd</sup> edition. Raven Press, New York.
- Paksy K, Rajczy K, Forgács Z, Lázár P, Bernard A, Gáti I and Kaáli G S, 1997. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J Appl Toxicol* 17:321-327.
- Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Requena J R, Thorpe S R, López-Torres M and Barja G, 2000. Low fatty acid unsaturation: A mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55(6):B286-91.
- Pandi-Perumal S R, Srinivasan V, Maestroni G J, Cardinali D P, Poeggeler B and Hardeland R, 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 273: 2813-2838.
- Piasek M, Blanusa M, Kostial K and Laskey J W, 2001. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod Toxicol* 15:673-681.
- Pillai A, Priya L and Gupta S, 2003. Effects of combined exposure to lead and cadmium on the hypothalamic-pituitary axis function in proestrous rats. *Food Chem Toxicol* 41: 379-384.
- Poderoso J J, Carreras M C, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F and Boveris A, 1996. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328(1):85-92.
- Poliandri A, Cabilla P, Velardez M, Bodo C and Duvilanski, 2003. Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 190: 17-24.
- Poliandri A H, Velardez M O, Cabilla J P, Bodo C C, Machiavelli L I, Quinteros A F and Duvilanski B H, 2004. Nitric oxide protects anterior pituitary cells from cadmium-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 37:1463-1471.
- Poliandri A B, Machiavelli L I, Quinteros A F, Cabilla J P and Duvilanski B H, 2006a. Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 40:679 - 688.



- Poliandri A, Esquifino A, Cano P, Jiménez A, Lafuente A, Cardinali P and Duvilanski B, 2006b. *In vivo* protective effect of melatonin on cadmium-induced changes in redox balance and gene expression in rat hypothalamus and anterior pituitary. *J Pineal Res* 41:238-246.
- Pollack A Z, Schisterman E F, Goldman L R, Mumford S L, Albert P S, Jones R L and Wactawski-Wende J, 2011. Cadmium, lead, and mercury in relation to reproductive hormones and anovulation in premenopausal women. *Environ Health Perspect* 119(8):1156-61.
- Poon H F, Calabrese V, Scapagnini G and Butterfield D A, 2004. Free Radicals: Key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59(5):478-493.
- Potts C L, 1965. Cadmium proteinuria-The health of battery workers exposed to cadmium oxide dust. *Ann Occup Hyg* 8:55-61.
- Post J and Hoffman J, 1968. Cell renewal patterns. *New Eng J Med* 279: 248-258.
- Prins G S, 2008. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 15(3):649-56.
- Qian X, Kulig E, Jin L and Lloyd R, 1998. Expression of D-type cyclins in normal and neoplastic rat pituitary. *Endocrinology* 139(4): 2058-2067.
- Quaife C J, Findley S D, Erickson J C, Froelick G J, Kelly E J, Zambrowicz B P and Palmiter R D, 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33: 7250-7259.
- Racagni G, Apud J A, Locatelli V, Cocchi D, Nistico G, di Giorgio R M and Muller E E, 1979. GABA of CNS origin in the rat anterior pituitary inhibits prolactin secretion. *Nature* 281(5732):575-578.
- Ramirez A, 2002. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anuales de la Facultad de Medicina* 63:51-64.
- Rao M and Chhunchha B, 2009. Protective role of melatonin against the mercury induced oxidative stress in the rat thyroid. *Food Chem Toxicol* 48(1):7-10.
- Rayment G E, 1995. Sources of cadmium in agricultura products. National Cadmium Workshop. DPIE/NFA Canberra, Australia.
- Reiter R J, Tan D X and Burkhardt S, 2002. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: Amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev* 123: 1007-1019.
- Reiter R J, Tan D X and Manchester L C, 2003. Melatonin: Detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 527: 539-548.

- Reiter R J, Tan D X, Terron M P, Flores L J and Czarnocki Z, 2007. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol* 54: 1-9.
- Reiter R J, 2003. Melatonin: Clinical Relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17(2):273-285.
- Rhode P R and Gorski J, 1991. Inhibitory effects of serum and stimulatory effects of estrogen on prolactin mRNA levels in GH3 rat pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 82(1):1-9.
- Rivier C, 2001. Role of gaseous neurotransmitters in the hypothalamic-pituitary-adrenal Axis *Ann N Y Acad Sci* 933:254-264.
- Rodríguez C, Mayo J C, Sainz R M, Antolín I, Herrera F, Martín V and Reiter R J, 2004. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36(1):1-9.
- Romero A, Cabaleiro T, Caide A and Lafuente A, 2008. Posible papel protector de la melatonina frente a la toxicidad neuroendocrina inducida por cadmio. *Rev Toxicol* 25: 3-11.
- Rousseau J, Cossette L, Grenier S and Martinoli M G, 2002. Modulation of prolactin expression by xenoestrogens. *Gen Comp Endocrinol* 126(2):175-82.
- Samson W K, Taylor M M and Baker J R, 2003. Prolactin-releasing peptides. *Regul Pept* 114:1 - 5.
- Sánchez I and Dynlacht B D, 2005. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 16(3):311-21.
- Sancho P, Fernández C, Yuste V J, Amrán D, Ramos A M, de Blas E, Susin S A and Aller P, 2006. Regulation of apoptosis/necrosis execution in cadmium-treated human promonocytic cells under different forms of oxidative stress. *Apoptosis* 11:673-686.
- Satarug S, Baker J R, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly P E B and Willians D J, 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett* 137: 65-83.
- Satoh M, Koyama H, Kaji T, Kito H and Tohyama C, 2002. Perspectives on cadmium research. *Tohoku J Exp Med* 196:23-32.
- Scandalios J G, 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38(7):995-1014.
- Scherer G and Barkemeyer H, 1983. Cadmium concentrations in tobacco and tobacco smoke. *Ecotoxicol Environ Saf* 7(1):71 8.
- Selim M E, Rashed el H A, Aleisa N A and Daghestani M H, 2012. The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation* 8(1):58-64.

- Shanle E K and Xu W, 2010. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 62(13):1265-76.
- Shanle E K and Xu W, 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 24: 6-19.
- Shaulian E and Karin M, 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131-E136.
- Shih C M, Ko W C, Wu J S, Wei Y H, Wang L F, Chang E E, Lo T Y, Cheng H H and Chen C T, 2004. Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *J Cell Biochem* 91:384-397.
- Shiverick K T and Salafia C, 1999. Cigarette smoking and pregnancy I: Ovarian uterine and placental effects. *Placenta* 20:265-272.
- Shukla D, Kesari R, Mishra S, Dwivedi S, Tripathi R D, Nath P and Trivedi P K, 2012. Expression of phytochelatin synthase from aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. enhances cadmium and arsenic accumulation in tobacco. *Plant Cell Rep* [En prensa].
- Shull J D and Gorski J, 1984. Estrogen stimulates prolactin gene transcription by a mechanism independent of pituitary protein synthesis. *Endocrinology* 114:1550-1557.
- Shupnik M A, 2002. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J Neuroendocrinol* 14:85-94.
- Siewit C L, Gengler B, Vegas E, Puckett R and Louie M C, 2010. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER alpha and c-Jun. *Mol Endocrinol* 24: 981-992.
- Sonnenschein C and Soto A M, 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:143-150.
- Sosić-Jurjević B, Filipović B, Ajdžanović V, Savin S, Nestorović N, Milosević V and Sekulić M, 2010. Suppressive effects of genistein and daidzein on pituitary-thyroid axis in orchidectomized middle-aged rats. *Exp Biol Med* 235(5):590-8.
- Spink B C, Bennett J A, Pentecost B T, Lostritto N, Englert N A, Benn G K, Goodenough A K, Turesky R J and Spink D C, 2009. Long-term estrogen exposure promotes carcinogen bioactivation, induces persistent changes in gene expression, and enhances the tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 240 (3):355-66.
- Stasenکو S, Bradford E M, Piasek M, Henson M C, Varnai V M, Jurasović J and Kusec V, 2010. Metals in human placenta: focus on the effects of cadmium on steroid hormones and leptin. *J Appl Toxicol* 30(3):242-53.
- Steinmetz R, Brown N G, Allen D L, Bigsby R M and Ben-Jonathan N, 1997. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 138(5):1780-6.

- Stohs S J and Bagchi D, 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18(2):321-336.
- Stoica A, Katzenellenbogen B S and Martin M B, 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol* 14:545-553.
- Sugita M and Tsuchiya K, 1995. Estimation of variation among individuals of biological half-time of cadmium calculated from accumulation data. *Environ Res* 68(1):31-7.
- Susiarjo M, Hassold T J, Freeman E and Hunt P A, 2007. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet* 3:e5.
- Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H and Iguchi T, 2002. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 16:107-16.
- Thornton I, 1992. Sources and pathways of cadmium in the environment. *IARC Sci Publ* (118):149-162.
- Turnbull A V and Rivier C, 1997. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med* 215(1):1-10.
- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y and Tomonaga M, 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7: 337-347.
- Urani C, Melchiorretto P, Canevali C, Morazzoni F and Gribaldo L, 2007. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol In Vitro* 21: 314-319.
- Vallee B L, 1995. The function of metallothionein. *Neurochem Int* 27: 23-33.
- Vankelecom H, Andries M, Billiau A and Denef C, 1992. Evidence that folliculo-stellate cells mediate the inhibitory effect of interferon-gamma on hormone secretion in rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* 130(6):3537-46.
- Varga B, Zsolnai B, Paksy K, N aray M and Ungv ary G Y, 1993. Age dependent accumulation of cadmium in the human ovary. *Reprod Toxicol* 7:225-228.
- Vař ak M and Meloni G, 2011. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* 16(7):1067-78.
- Viaene M K, Masschelein R, Leenders J, De Groof M, Swerts L J and Roels H A, 2000. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occup Environ Med* 57:19-27.
- Waalkes M P, 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533(1-2):107-120.

- Waalkes M P, Anver M R and Diwan B A, 1999. Chronic toxic and carcinogenic effects of oral cadmium in the Noble (NBL/Cr) rat: Induction of neoplastic and proliferative lesions of the adrenal, kidney, prostate, and testes. *J Toxicol Environ Health A* 58:199-214.
- Wade M G, Desaulniers D, Leingartner K and Foster W G, 1997. Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes *in vitro* and *in vivo*. *Reprod Toxicol* 11, 791-798.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B and Beyersmann D, 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis: a review. *Toxicology* 192: 95-117.
- Wakeling A E, Dukes M and Bowler J, 1991. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51:3867-3873.
- Wang Y, Fang J, Leonard S S and Rao K M , 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36(11):1434-1444.
- Waring R H and Harris R M, 2005. Endocrine disruptors: A human risk? *Mol Cell Endocrinol* 244:2-9.
- Wink D A and Mitchell J B, 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25(4-5):434-456.
- Wirth J J and Mijal R S, 2010. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst Biol Reprod Med* 56(2):147-67.
- Wlostowski T, Krasowska A and Godlewska-Zylkiewicz B, 2000. Dietary cadmium decreases lipid peroxidation in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J Trace Elem Med Biol* 14, 76-80.
- Yalin S, Comelekoglu U, Bagis S, Sahin N O, Ogenler O and Hatungil R, 2006. Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 65(1):140-144
- Zadorozhnaja T D, Little R E, Miller R K, Mendel N A, Taylor R J, Presley B J and Gladen B C, 2000. Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, and zinc in human placentas from two cities in Ukraine. *J Toxicol Environ Health* 61:255-263.
- Zilli C G, Santa Cruz D M, Polizio A H, Tomaro M L and Balestrasse K B, 2011. Symbiotic association between soybean plants and *Bradyrhizobium japonicum* develops oxidative stress and heme oxygenase-1 induction at early stages. *Redox Rep* 16(2):49-55.
- Zylber-Haran E A, Gershman H, Rosenmann E and Spitz I M, 1982. Gonadotrophin, testosterone and prolactin interrelationships in cadmium-treated rats. *J Endocrinol* 92(1):123-130.

## *Apéndice: Abreviaturas*

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Análisis de la varianza
AP-1	Proteína activadora-1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BrdU	5-Bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CAT	Catalasa
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
Cd <sup>2+</sup>	Cadmio
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
c.s.p	Cantidad suficiente para
Cys	Cisteína
Cyc	Ciclina
Cyc D1	Ciclina D1
Cyc D3	Ciclina D3
DABCO	1,4 diazabicyclooctano
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE/DEs	Disruptor/es endocrino/s
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FITC	Fluoresceína isotiocianato

FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Acido gamma-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GH	Hormona de crecimiento
GPx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation
GSSG	Glutation oxidado
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico]
HO-1	Hemo-oxigenasa-1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
ICI 182,780	7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -[9[(4,4,5,5,5-pentafluoropentil)sulfinil]nonil]estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol
KRB	Buffer Krebs-Ringer-bicarbonato
KRB-CMF	Buffer Krebs-Ringer-bicarbonato libre de Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup>
LH	Hormona luteinizante
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
M-MLV RT	Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina Moloney
MT/MTs	Metalotioneína/s
NaCl	Cloruro de Sodio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS1	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS2	Óxido nítrico sintasa inducible

NOS3	Óxido nítrico sintasa endotelial
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2-factor derivado 2
NRS	Suero normal de conejo
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro
PVDF	difluoruro de polivinilideno
PRL	Prolactina
RE/RE $\alpha$ /RE $\beta$	Receptor de estrógenos $\alpha$ ó $\beta$
RE $\alpha$ 66	Isoforma de 66 kDa del RE $\alpha$
RE $\alpha$ 36/RE $\alpha$ 46	Variantes truncadas del RE $\alpha$ de 36 y 46 kDa
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
RIA	Radioinmunoensayo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Error estándar
SFBA	Suero fetal bovino adsorbido con carbón-dextrán
SOD	Superóxido dismutasa
TBE	Buffer tris-borato-EDTA
T-PBS	Buffer Tween-fosfato salino
TRH	Hormona liberadora de TSH
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TRITC	Tetrametil rodamina isotiocianato
TSH	Hormona estimulante de tiroides
XE/XEs	Xenoestrógeno/xenoestrógenos