



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Presencia de *corticosteroid-binding globulin* (CBG) en tejidos extrahepáticos y alteraciones fisiológicas consecuencia de su déficit

Jose Gulfo Cabrales

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**Presencia de *corticosteroid-binding globulin* (CBG)
en tejidos extrahepáticos y alteraciones fisiológicas
consecuencia de su déficit**

Jose Gulfo Cabrales

BARCELONA, DICIEMBRE 2016

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACÓ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

Presencia de *corticosteroid-binding globulin* (CBG) en tejidos extrahepáticos y alteraciones fisiológicas consecuencia de su déficit

Memoria presentada por Jose Gulfo Cabrales para
optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Visto bueno de las directoras

Dra. Montserrat Esteve Ràfols

Dra. Maria del Mar Grasa Martínez

El interesado

Jose Gulfo Cabrales

La tutora del Programa de Doctorado

Dra. Josefa Badia Palacin

“La paciència és aguantar en l’adversitat. Significa lluitar, patint. I això, sens dubte, implica llàgrimes, però, a la fi, esdevé joia i podem somriure perquè hem aconseguit allò que anhelàvem....”.

Ramón Llull

A Dios, mi Madre y Floriana

Creo que ha llegado el momento que debido mi buen comportamiento y dedicación se me promueva de patio en este manicomio llamado “Escola de doctorat” al patio post-doc. Lo digo con sentido del humor. Por esta razón quiero agradecer a todos los que de alguna manera me acompañaron a conseguir este objetivo.

En primer lugar agradecer a “la Montse y a la Mar” como cariñosamente llamo a mis dos directoras de tesis. Dos mujeres diferentes pero con un mismo objetivo, formarme como científico, como investigador, como persona. Ha sido difícil pero creo que lo han conseguido. Gracias infinitamente por todo el tiempo, dedicación, motivación y paciencia que me han dedicado. Una de las cosas que más llevo incrustado en mis recuerdos, es las veces que de cierta manera las dos fueron unas compañeras de poyata enseñándome cosas tan simples como por ejemplo como cargar las muestras en un gel de agarosa Mar, igual Montse un gel de acrilamida, Pero en mi opinión son esas pequeñas cosas las que crean verdaderos lazos entre doctorando y director.

Agradezco a la Dra. Josefa “pepita” Badia su colaboración, disposición y apoyo para solucionar cualquier obstáculo administrativo, para no extenderme Pepita: eres la mejor.

Al Dr. Marià Alemany, es difícil resumir tu aportación Mariá!! Más de 30 años dedicados a la ciencia formando investigadores, ha sido un honor tenerte en este proceso, he aprendido mucho de ti, no solo de ciencia también de otras cosas no menos importantes en este tiempo. Pero hay una, la más importante para mí, una vez sentado en tu despacho me dijiste como tenía que pensar y razonar un investigador cuando analizaba los resultados. Esto ha sido uno de los cimientos más fuertes en este camino. A Xavier gracias por todo tu apoyo por tus comentarios de ciencia, política e historia de Catalunya. José Antonio gracias por tu disponibilidad, Carmen Benito tu ayuda y disponibilidad ha sido invaluable a la hora de trabajar en radioisótopos y gracias a nuestra súper secre Merce Calvo y su eterna sonrisa!!

Mar Romero nuestra post-doc senior, por estar siempre en primera línea para responder mis dudas, por tu manera de ser, siempre dándome calma y tranquilidad en momentos difíciles. Gracias Mar.

Ahora toca a mis colegas, a mis primeras compañeras Elizabet, Nuria y Marina fuimos los que iniciamos este proyecto, gracias porque de cada una apporto algo importante en este trabajo y sobretodo porque fueron insuperables compañeras. Silvia Agnelli, ordenada, responsable, comprometida con el trabajo, gracias Silvi, algo de eso aprendí. Sofí Arriaran, lo del orden y puntualidad no se nos da muy bien pero a la hora de trabajar y sacar resultados la sangre indígena manda!! También me echaste una mano con los análisis de rtPCR, pero sobre todo por la amistad, gracias Sofí. Angelo Ledda mi compañero en este

viaje que ahora culmina, cuantos momentos vividos “Lerda” gracias por tu compañía, por los cafés, donde rajábamos de todo el mundo, fue una pasada compartir este viaje contigo. Gracias a mi amigo Fredrik Holmgren, somos imbatibles cuando de beber cerveza se trata. Aleee Caballero gracias por haberte conocido, por esa gran amistad que nos une!! Arantxa aunque tu paso fue fugaz por esta sección, cuando las personas son como tú, no hace falta mucho tiempo para descubrir lo maravillosa que son. A Serena Memmolo, Sere esa caída que me hiciste dar en el lab jamás se me olvidará fui culpable 100%. Anna Fernández excelente como persona y a la hora de currar una de las mejores. A los nuevos enfermos mentales por la ciencia que remitieron a esta sección: Laia, Ceci, mucha suerte en esta aventura gracias por su apoyo y por su omnipresente e incómoda preguntita: cuando depositas? Ahh tú también entras allí Lucia!! A Ricard y sus adrenales con sus siestas en el lab.

Lo único que me resta decirles a todos los que se embarcan en esta aventura de hacer un doctorado es qué para esto hay que tener: COLLONSSS!!!

A la Dra. Cristina Cabot, Cris definitivamente vaya suerte la que he tenido de ser tu alumno, me enseñaste de tal manera que hoy día una de las técnicas de las que más tengo destreza es la inmunohistoquímica en todo su contexto. Puedo decir que este periodo de tiempo, a pesar del exceso de trabajo ha sido uno de los que más he disfrutado en el doctorado. Gracias infinitamente Cris, te puedo asegurar que en cada inmuno que hago está tu sello!!

Agradezco al Departamento de Biología Celular especialmente a la Dra. Esther Verdaguer tus comentarios, tu colaboración, paciencia, disponibilidad, hicieron que te convirtieras en parte fundamental para poder alcanzar este objetivo, tu aportación a este proceso no tiene precio.

También quiero dar las gracias a todos los que de alguna forma hicieron este trabajo más agradable: en el estabulario Jordi, Pedro (Q.E.P.D.) y especialmente a Antonio sin tus cuidados y manera de trabajar no hubiera tenido podido establecer la colonia de ratones. En la cafetería de biología: José, Miguel y la Gumer...hacían que apeteciera un café, birra, bocadillo etc. Su manera de tratarme siempre la recordaré (hasta me daban crédito).

Un agradecimiento muy especial a una señora: Elda Valdés Valdés, cuando tenía 76 años de cierta forma empezó la tesis conmigo, cada mañana comentaba con ella el éxito o frustración del experimento del día anterior, hoy con 81 años y un ictus reciente, todavía me pregunta: cuando vas a acabar la puñetera tesis??? Fuiste mi sponsor y mi apoyo, espero que hoy te sientas feliz; al fin se acabó. Has sido como una segunda madre para mí. Gracias.

Debido a que mi situación me ha llevado a convertirme en un híbrido momentáneo entre pre y post-doc. Tengo que dar un profundo agradecimiento a la Dra Carmen Peralta quien me ha dado el impulso final para acabar esta tesis, gracias por confiar en mi Dra, a Monikin, Mona no tengo palabras para agradecerte...al resto de este equipo que me ha acogido y me han impulsado cada día para finalizar y que también se convirtieron en parte esencial en este proceso: Cindy “Cavallo”, Elsitá, Esther, Maru, Anabel y la Dra. Araní Casillas.

Agradecer a mi Madre de ella he heredado el coraje para enfrentar cada situación adversa que se me ha presentado en la vida, mi vieja sin tu amor, tus consejos, tu sabiduría, en fin mami la verdad sin ti ni siquiera hubiera nacido!! A mi hermano Toño, mi cuñada Astrid, y mi sobrino Juan David, sin ustedes tampoco hubiera sido posible.

Por último quiero agradecer a lo más hermoso que me ha sucedido en la vida y la parte más importante en cada decisión que tomo en la vida: FLORIANA ROTONDO, por ti se que en la tierra existen ángeles, porque tú eres uno de ellos. Mi apoyo mi compañera, la única que me ha soportado y me ha visto sufrir durante todo este tiempo, mi apoyo moral, tú me diste las fuerzas cuando ya no las tenía, me diste la paz cuando la necesitaba, me diste la calma para poder pensar, la verdad no hay palabras para agradecer lo que has hecho por mí, grazie amore mio!!

“For a fervent materialist, few things in life bring more pleasure than contemplating the neurobiology of stress....”

Robert M Sapolsky

ABREVIATURAS

Akt/PKB: Protein kinase B
A β : Proteina beta amiloide
ACOD: Acil-CoA Oxidasa
ACTH: Hormona Adenocorticotropica
ADH: hormona antidiurética
AME: Apparent Mineralocorticoid Excess
AMP: Adenosina monofosfato
AMPc: Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
AMPK: Proteína quinasa dependiente de AMP
ANOVA: Análisis de la varianza
AP-1: Proteína activadora 1
ATP: Adenosina trifosfato
 α 1-PI: α 1-Inhibidor de Proteinasa
 α 1-ACT: α 1-antiquimotripsina
BB: Ratas BioBreeding
BSA: Albúmina de suero bovino
BCA: Ácido Bicinconínico
CBG: Corticosteroid-Binding Globulin
CEEA: Comité Ético de Experimentación Animal
CoA: Coenzima A
CLS: Crown Like Structure
CYPs: Citocromos P-450
CYP11A1 (P450_{scc}): Enzima Esteroides 20-22 liasa
CYP11B1: Enzima Esteroides 11- β -hidroxilasa
CYP11B2: Enzima Aldosterona Sintasa
CYP21 o P450_{c21}: cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1
CREB: Elemento de respuesta a AMPc
CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina
CRHR1: Corticotropin releasing hormone receptor 1
CRHR2: Corticotropin releasing hormone receptor 2
CNS: Sistema Nervioso Central

C: Dieta control

C-SAL: ratas control salino

DBD: Dominio de Unión a DNA

DNTPs: Deoxynucleotide triphosphates

DAB: Diaminobenzidina

DAG: Diacilglicerol

DP: Doble positivo

DMSO: Dimetilsulfóxido

DUSP 1: Fosfatasa de doble especificidad

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EPM: Prueba del Laberinto Elevado

ER: Retículo Endoplasmático

ERK 1/2: Proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

FKBP5: FK506 binding protein 5

GC: Glucocorticoides

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GH: Hormona del Crecimiento

GHIH: Hormona Inhibidora de la Hormona del Crecimiento

GILZ: glucocorticoid-induced leucine zipper

GR: Receptor de Glucocorticoides

GR α : Receptor de Glucocorticoides alfa

GR β : Receptor de Glucocorticoides beta

GRdim: GR Dimerization

GRE's: Elementos de Respuesta de Glucocorticoides

GRKO: *knockout* total del gen GR

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

haCBG: CBG con alta afinidad al glucocorticoide

HepG2: Celulas de hepatoma humano

HHA: Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal

HL: Dieta Hiperlipídica
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HCl: Ácido clorhídrico
HSDs: Hidroxiesteroides Deshidrogenasas
Hsp: Chaperonas o Proteína de choque térmico
HTBA: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
H6PDH: Hexosa-6-Fosfato Deshidrogenasa
ICV: Inyecciones intracerebroventriculares
IGF-I: Crecimiento Insulínico Tipo 1.
IGF-II: Factor de Crecimiento Insulínico tipo II
IHC: Inmunohistoquímica
IL-1: Interleucina 1
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleucina-10
IMC: Índice de Masa Corporal
JNK: Quinasa c-Jun N-terminal
RI: Receptor de Insulina
HMW: Peso molecular alto
H&E: Hematoxilina y Eosina
laCBG: CBG con baja afinidad para el glucocorticoide
LBD: Dominio de Unión a Ligando
LPS: Lipopolysaccharides
LXR α : Receptor Hepático X alfa
MAKP: Mitogen Activated Protein Kinase
MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7 cell line
MC2R: Receptor de Melanocortina tipo 2
mGR: Receptor de glucocorticoides Específico de Membrana
MEHA: 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina
MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos
MPO: Mieloperoxidasa
MR: Receptor de Mineralocorticoides

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

NEFA: Ácidos Grasos No Esterificados

NFκB: Factor nuclear kappa β

NR3C1: Receptor Nuclear subfamilia 3 grupo c miembro 1

NTD: Dominio Amino-terminal altamente variable

PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

p38 MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno p38

PBS: Tampón fosfato salino

PBSG: gelatin phosphate buffered saline

PAI 1: Plasminogen activator inhibitor type 1

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEPCK: Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa

PI: Punto Isoelectrico

PI3K: Fosfatidil inositol 3-quinasa

PPARs: Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas

PPARα: Receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa

PPARγ: Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma

POMC: Propiomelanocortina

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

PVN: Núcleo Para-Ventricular Hipotalámico

p65Nfκβ: nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit

RCL: Reactive Centre Loop

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RI: Resistencia a la Insulina

S→R: Estado de transición “Estresado” “Relajado”

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SA-HRP: Peroxidasa-estreptavidina.

SON: Núcleo Supra Optico

SC: Subcutáneo

SCN: Núcleo Supraquiasmático

SOD: Superóxido dismutasa

TBS: Solución salina tamponada con Tris

TCA: Ácido tricloroacético

SNS: Sistema Nervioso Simpático

StAR: Steroidogenic acute regulatory protein

TCR: T cell Receptor

TMB: Tetrametilbencidina

TBST: Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20

TAB: Tejido Adiposo Blanco

TAG: Triacilgliceroles

TAT: Tirosina Aminotransferasa

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta

TNF: Factor de necrosis tumoral

11 β -HSD1: enzima 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 1

11 β -HSD2: enzima 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 2

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	I
1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	1
2. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL Y GLUCOCORTICOIDES	7
2.1. LA GLÁNDULA ADRENAL: ESTEROIDOGENESIS	9
2.2. REGULACIÓN DEL EJE HHA: RITMO CIRCADIANO Y ULTRADIARIO	11
2.3. ALTERACIONES DEL EJE HHA Y CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS	14
2.3.1. GLUCOCORTICOIDES Y ESTRÉS	14
2.3.2. GLUCOCORTICOIDES Y OBESIDAD	18
2.3.3. GLUCOCORTICOIDES E INFLAMACION	22
3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES	25
3.1. EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES	25
3.2. EL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES	28
3.3. ACCIONES GENÓMICAS Y NO GENÓMICAS DE LOS GLUCOCORTICOIDES	29
4. BIODISPONIBILIDAD DE LOS GLUCOCORTICOIDES	32
4.1. LA TEORÍA DE LA HORMONA LIBRE	32
4.2. LA CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN (CBG)	33
4.2.1. BIOSÍNTESIS DE LA CBG	34
4.2.2. ESTRUCTURA DE LA CBG	35
4.2.3. FISIOLÓGÍA DE LA CBG	37
4.2.4. POLIMORFISMOS DE LA CBG Y CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS	39
4.3. LA ENZIMA 11 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (11 β -HSD)	42
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. MODELO ANIMAL Y CONDICIONES ESPERIMENTALES	53
1.1. GENOTIPADO DE LOS RATONES DE LA COLONIA DE KO PARA LA CBG	53
1.2. INDUCCIÓN DE PANCREATITIS AGUDA EN RATONES	56
1.3. INDUCCIÓN DE OBESIDAD DIETÉTICA EN RATONES	57
2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS	58
2.1. METABOLITOS EN SUERO	58
2.1.1. Glucosa	58
2.1.2. Urea	59
2.1.3. Triacilglicérols	59
2.1.4. Colesterol total	60
2.1.5. Ácidos grasos no esterificados (NEFA)	60
2.1.6. Proteínas	61
2.2. HORMONAS EN SUERO	61
2.2.1. Insulina	61

2.2.2 Leptina	61
2.2.3. Determinación de corticosterona libre y total	62
2.3. CAPACIDAD DE UNIÓN DE LA CBG EN SUERO	63
2.4. LIPASA PANCREÁTICA EN SUERO	63
3. VALORACIONES EN MUESTRAS DE TEJIDOS	64
3.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	64
3.1.1 Obtención del extracto de proteína en pulmón y tejido adiposo	64
3.1.2 Homogenado de hipocampo	64
3.1.3. Homogenado de glándulas adrenales	65
3.1.4. Determinación de la concentración de proteína	65
3.2. ACTIVIDAD DE LA MIELOPEROXIDASA EN PÁNCREAS Y PULMÓN	65
3.3. DETERMINACIÓN DE GLICÓGENO HEPÁTICO	66
3.4. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS HEPÁTICOS	66
3.5. DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA TOTAL Y LIBRE EN HIPOCAMPO	67
4. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	67
4.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO	67
4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN: ARN a ADNc	68
4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	69
5. WESTERN BLOT	70
5.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	71
5.2. TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A LA MEMBRANA DE PVDF	71
5.3. INMUNODETECCIÓN	72
6. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	74
6.1. FIJACIÓN DE LOS TEJIDOS	74
6.2. OBTENCIÓN DE LOS BLOQUES DE PARAFINA	75
6.3. OBTENCIÓN DE LOS CORTES, DESPARFINACIÓN Y TINCIÓN HEMATOXILIN-EOSINA (H-E)	75
6.3 INMUNOHISTOQUIMICA (IHC)	76
6.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS ADIPOCITOS A PARTIR DE PREPARACIONES TENYIDAS CON H-E	77
6.5. EVALUACION EN EL TEJIDO ADIPOSEO DE LA INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS POR MEDIO DE IHC DE ELASTASA.	77
6.6. EVALUACION EN EL TEJIDO ADIPOSEO DE LAS CROWN LIKE STRUCTURE (CLS) POR MEDIO DE IHC DE F4/80.	78
RESULTADOS	79
ALTERED LIPID PARTITIONING AND GLUCOCORTICOID AVAILABILITY IN CBG-DEFICIENT MALE MICE WITH DIET-INDUCED OBESITY	81
EXACERBATED PRO-INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES IN EPIDIDYMAL ADIPOSE TISSUE OF CBG-DEFICIENT MALE MICE WITH DIET-INDUCED OBESITY	95

NEW ROLES FOR CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN AND OPPOSITE EXPRESSION PROFILES IN LUNG AND LIVER	121
DOWN-REGULATED ADRENAL CORTICOSTERONE SYNTHESIS IN CBG-DEFICIENT MICE	139
LACK OF CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN PROMOTES COGNITIVE DAMAGE IN THE HIPPOCAMPUS	161
<i>DISCUSIÓN</i>	<i>187</i>
<i>CONCLUSIONES</i>	<i>199</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>203</i>
<i>ANEXO</i>	<i>233</i>

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

La primera referencia a las glándulas adrenales deriva de las observaciones del anatomista Claudius Galen (130-201dC.) quien las describe como un “trozo de carne” encima del riñón izquierdo refiriéndose a algo anexo al tejido renal. No obstante, el primero en describir las glándulas adrenales sin ambigüedad, incluyendo varias ilustraciones, fue el anatomista Bartholomeus Eustachius (1520-1574) quien en 1563 publicó un trabajo donde describía en detalle los riñones y se refería a las glándulas adrenales como *Glandulae renibus incubentis* un término que admitía un papel renal auxiliar [1]. Sin embargo, el descubrimiento de los glucocorticoides se sitúa unos años más tarde junto con la descripción del concepto de hormona y control endocrino. Así, el médico francés Bordeau de Montpellier en 1775 introduce el concepto de secreciones internas en tejidos de animales, pero no es hasta el 1849 cuando Berthold demuestra experimentalmente estas secreciones en caso de la testosterona. Berthold en sus trabajos con gallos castrados observó que la reimplantación ectópica de los testículos restablecía el comportamiento sexual típico de los gallos (agresividad, interés por las gallinas, el canto). Es decir, alguna sustancia secretada por los testículos que actuaba independientemente del sistema nervioso era responsable de los caracteres perdidos en los gallos castrados. Sin embargo, la comprensión de la naturaleza precisa de estas secreciones y la introducción del concepto de hormona y sus principios generales esperaron unos 50 años hasta que Bayliss y Starling (considerados los padres de la endocrinología) en 1904 en sus estudios sobre el control de secreciones pancreáticas por parte del intestino acuñan el concepto de “mensajero químico” y más tarde el de hormona para referirse a una sustancia secretada en un órgano en concreto pero que coordina la actividad de diferentes partes del cuerpo [2].

La importancia de la glándula adrenal y su influencia en el balance energético del individuo fue descrita por Thomas Addison en 1855 y por Brown Séquard en 1856 [3]. Sin embargo, los primeros en describir que las hormonas secretadas por la corteza adrenal

inflúan en el metabolismo de la glucosa fueron los investigadores franceses Bierry y Malloizel en 1908 quienes encontraron que la concentración de azúcar en sangre de perros adrenalectomizados disminuía hasta la mitad o más en relación a los niveles de animales normales. Independientemente, Porgues 1909 describió un fenómeno similar en pacientes con la enfermedad de Addison y un año más tarde observó como disminuía el glucógeno a nivel hepático y muscular en perros adrenalectomizados [4], [5]. La enfermedad de Addison o insuficiencia adrenal primaria es el resultado de una inadecuada producción de glucocorticoides y mineralocorticoides, entre los síntomas que pueden presentar están la fatiga crónica, la anorexia, el desorden alimentario y la hipoglucemia [6].

La relación entre obesidad, intolerancia a la glucosa o diabetes, hipertensión y disfunción gonadal fue reconocida inicialmente a principios del siglo XX. En 1932 Harvey Cushing describió una hiperplasia en las glándulas adrenales con basofilia pituitaria lo que sería el descubrimiento de una nueva enfermedad que lleva su nombre “síndrome de Cushing” la cual refleja los diversos efectos deletéreos que causan el exceso de los glucocorticoides [7]. En el síndrome de Cushing los pacientes manifiestan un fenotipo particular caracterizado por obesidad central, acumulación de grasa en el tronco y además otras características propias del síndrome metabólico (resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión, hipercoagulabilidad, hipercitoquinemia) [8].

Los primeros extractos de tejido cortical que contribuirían a mantener con vida a animales adrenalectomizados fueron preparados en 1930 por Hartman y Brownell, Swingle y Pfiffner y el principio activo se identificó con el nombre de “cortin” [9].

En 1935, de forma paralela pero independientemente, diferentes investigadores y sus colaboradores encabezaron unos años de intensa investigación con el objetivo de aislar y caracterizar químicamente las hormonas de la corteza adrenal. Entre ellos destacaron E.C. Kendall, J.J. Pfiffner y O. Wintersteiner en los Estados Unidos y T. Reichstein en Suiza. En 1936 el grupo de Kendall publicó un protocolo para la purificación de cinco compuestos cristalinos activos derivados del extracto de las glándulas adrenales de *Bos Taurus* y que designaron con el nombre de extracto A, B, C, D y E diferenciándose entre ellos por su solubilidad en diferentes solventes. Entre todos los grupos de investigación llegaron a aislar 29 compuestos de extracto de glándula adrenal de *Bos Taurus* (Fig. 1) [9].

Uno de los problemas al intentar determinar la fórmula química, fue que cada grupo tenía su propia forma de nombrar los compuestos y estos no se correspondían (Fig.2). Así por ejemplo, el compuesto F de Wintersteiner tenía las mismas características que el Fa de Reichstein y que el E de Kendall y posteriormente se identificaría como cortisona [2], [10].

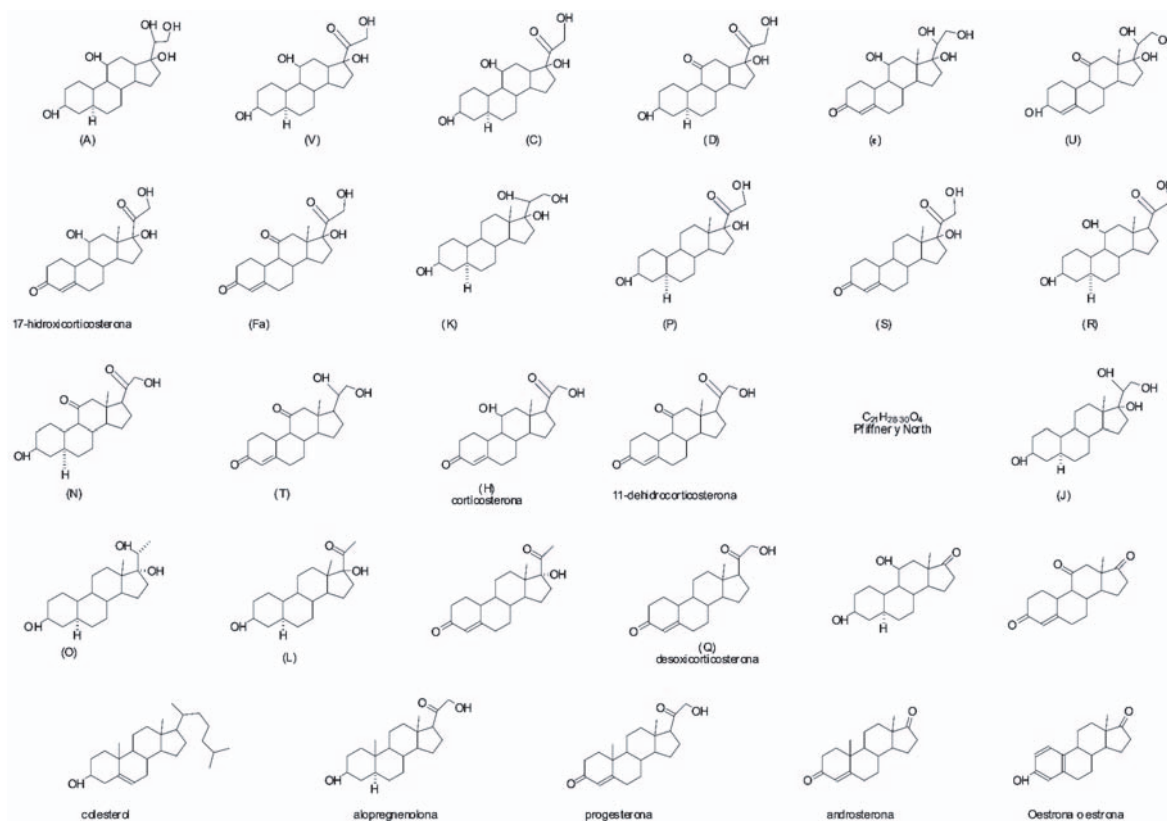


Fig. 1. Ilustración de las diferentes fórmulas químicas de los 29 compuestos aislados del extracto de glándula adrenal de *Bos Taurus* y que fue mostrada por T. Reichstein en la conferencia del Premio Nobel de Medicina que se le concedió junto a E.C Kendall y P.S. Hench en 1950. Adaptado de [9]

En 1937 Reichstein, publicó las características químicas de un nuevo compuesto, este resultó ser idéntico al compuesto B de Kendall y era menos potente que la fracción no cristalina cuando se suministraba para mantener con vida a perros adrenalectomizados. Trabajando en una intensa competición los cuatro grupos entre sí, lograron aislar purificar y determinar la estructura química para los 29 diferentes esteroides [11]. Una vez completada la estructura de estos compuestos fue posible asignarles nombres; en la serie de compuestos de Kendall, el compuesto B fue corticosterona, el compuesto A fue la 11-dehidro-corticosterona, el compuesto E fue la 17-hidroxi-11-dehidrocorticosterona (cortisona), y compuesto F correspondió a la 17-hidroxycorticosterona (cortisol o hidrocortisona). Cada uno de estos compuestos resultó activo en pruebas de trabajo muscular, siendo el cortisol el más potente. En 1938 el profesor C.N.H. Long y sus estudiantes habían demostrado que cada uno de estos compuestos afectaba el metabolismo de los carbohidratos y se podía probar midiendo el nivel de glucógeno hepático en ratas o ratones adrenalectomizados en condiciones de ayuno [2], [10].

TABLE I
Comparison of Labels Applied to Steroid Substances of Adrenal Gland

Our compounds	Reichstein	Wintersteiner and Páffner
Compound A	Dehydrocorticosterone*	
“ B	Substance H (corticosterone)	
“ C	“ C	Compound D
“ D	“ A	“ A
“ E	“ Fa	“ F
“ F	“ M	
“ G	“ D	
“ H		
Ketone 4†	Substance G (adrenosterone)	
	“ E	
	“ J	
	“ L	Compound G

* Not isolated from the extract but prepared from corticosterone.

† Prepared by degradation of Compound E but not isolated from cortical extracts.

Fig. 2 Tabla que ilustra la correspondencia entre los compuestos aislados por Kendall con los de Reichstein y Wintersteiner (Manson HL, Hoehn WM and Kendall EC. (1938) J. Biol. Chem. 124:459-474)

Los intentos obtener cortisona a partir del macerado de glándulas suprarrenales de *Bos taurus* en el laboratorio eran lentos y pesados, pues se requerían 1.000 kg de glándulas para obtener la ridícula cantidad de 25g de la preciada hormona. En 1937, la industria farmacéutica logra producir en su laboratorio una cortisona semi-sintética a partir del ácido desoxicólico procedente del macerado de vesícula biliar de ganado y ovejas, pero aún el precio de producción era elevado: a razón de mil dólares el gramo de acetato de desoxicortisona, impidiendo su comercialización masiva, sin contar con que, además, era relativamente inactiva.

El principal obstáculo para la síntesis de la cortisona estaba relacionado con los dos grupos funcionales que debía formar parte del núcleo de la molécula, un grupo hidroxilo en la posición 17 y un grupo cetona en la posición 11. Señalar que durante 50 años fue imposible producir un corticosteroide terapéuticamente activo que no tuviera estos dos grupos funcionales. El problema se resolvió con el uso de plantas (sisal, ñame mexicano) como punto de partida para la semi-síntesis. Estaba claro que cuando los compuestos A, B, E y F de Kendall eran oxigenados en la posición 11 del núcleo del esteroide estos tenían sus principales efectos en el metabolismo intermediario, mientras que la falta de oxigenación

en posición 11 y un principio que aun no había sido identificado en el residuo amorfo afectaba el metabolismo de los electrolitos. Así, el profesor Hans Selye llamó a los 11-oxi-compuestos “glucocorticoides” y los últimos “mineralocorticoides” [2], [10].

Con la ayuda de la información suministrada por Reichstein, Merck Research Laboratories logró sintetizar con éxito 100 gramos de compuesto A (deshidrocorticosterona), pero las pruebas clínicas en la enfermedad de Addison fueron negativas. A pesar que Kendall presionó para que se desarrollara la cortisona, que era más difícil de sintetizar, no fue hasta 1948 que Lewis Sarett de Merck Research Laboratories logró desarrollar la primera producción a gran escala de cortisona a un costo de 14 millones de dólares. Merck distribuyó su preciada cortisona a algunos investigadores como Kendall que facilitó varios gramos a su colaborador Hench (médico de la clínica Mayo) con el objetivo de comenzar sus ensayos clínicos. Trató a una paciente mujer de 29 años que estaba en silla de ruedas a causa de una artritis reumatoide; después de recibir 100mg durante 4 días fue capaz de salir caminando de la clínica. Posteriormente se trataron otros 15 pacientes obteniendo resultados similares. Anunció sus resultados, y con la precaución que a dosis excesivas podía causar síndrome de Cushing, el mundo elogió “la cura milagrosa” [11], [12]. Así, Tadeus Reichstein, Philip Showalter Hench, y Edward Calvin Kendall compartieron el premio Nobel de medicina y fisiología en 1950 “*for research on the structure and biological effects of adrenal cortex hormones*” [9] y en el mismo año la cortisona fue oficialmente lanzada como fármaco.

Sin embargo, en esos primeros estudios también se hizo evidente que el uso prolongado de estas hormonas producía algunos efectos adversos como la retención de sodio, hipercalcemia o hiperpotasemia, cambios psicológicos así como fracturas óseas en pacientes osteoporóticos [12].

Con el fin de contrarrestar los efectos secundarios de estas hormonas en los años 1950-60 fueron desarrollados nuevos glucocorticoides sintéticos. Esta síntesis se vio favorecida gracias a la llegada del análisis conformacional que permitió asignar en función de los parámetros físico-químicos cuantitativos estructuras moleculares y conformaciones estereoquímicas concretas. Así, la adición de un átomo de oxígeno en posición 11 del esteroide era esencial para la regulación del metabolismo de los carbohidratos, mientras que si la adición de un átomo de oxígeno se hacía en posición 17 representaba una pérdida de esta capacidad. De este modo la combinación 11-desoxi-17-hidroxycorticosterona resulta en un esteroide relativamente inactivo. En cambio, la adición de un átomo de oxígeno en la posición 17 en compuestos ya oxidados en posición 11 confería un aumento notable en la actividad glucocorticoide. De este modo se deriva la importancia fisiológica y farmacológica de la cortisona y la hidrocortisona y de su eficacia como glucocorticoide [4]. Durante este mismo periodo de tiempo (1950-1960), se reveló que mientras una 9 α -

fluorización incrementaba los efectos antiinflamatorios de la molécula también causaba pérdida excesiva de proteína, potasio, retención de sodio y edema [13]. La introducción de un doble enlace en posición 1,2 del anillo A (síntesis de prednisona a partir de la cortisona o de prednisolona a partir del cortisol) mejorada las propiedades antiinflamatorias de la molécula y presentaba menos efectos secundarios indeseables. Los compuestos 16 α -hidroxilados mantenían la actividad glucocorticoide sin efecto en la retención de sales y de fluidos y la 16 α -metilación aumentó aun más la actividad antiinflamatoria. Combinando la 9 α -fluorización, la 1-deshidrogenación y la 16 α -metilación se sintetizó la dexametasona, que resultó ser el antiinflamatorio más potente y con menos efecto en la retención de sales. Hoy en día todavía permanecen en uso las formulaciones genéricas de prednisolona y dexametasona. Aunque estas nuevas formulaciones lograron atenuar los efectos secundarios producidos por la cortisona, no consiguieron eliminarlos del todo, los cambios en los parámetros cardiometabólicos como la inducción de intolerancia a la glucosa, de diabetes, de adiposidad visceral, de dislipidemia, de atrofia muscular y de hipertensión siguen cursando como efectos secundarios a su tratamiento [13]–[15].

En la actualidad sabemos que los glucocorticoides producidos en la corteza adrenal (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) son hormonas esteroideas de 21 carbonos que son metabolizados en el hígado, que los riñones eliminan el 95% de sus metabolitos conjugados y que el resto se pierde via bilis. La potencia clínica de varios de los glucocorticoides sintéticos depende de su tasa de absorción, de su concentración en el tejido diana, de su afinidad por el receptor, de su regulación metabólica y de su posterior eliminación [15].

Debido a su naturaleza lipofílica los glucocorticoides no pueden ser almacenadas en vesículas por lo que tienen que ser sintetizadas de *novo* en respuesta a un estímulo. Su síntesis y secreción se realiza en la corteza de la glándula adrenal bajo el control del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA), el sistema nervioso autónomo y el sistema de glándulas endocrinas. Estas hormonas juegan un papel fundamental en la respuesta del organismo a condiciones estresantes, modulando estados conductuales, el metabolismo de la glucosa, de lípidos y proteínas manteniendo la homeostasis energética y en el sistema inmune, siendo ente este caso la primera respuesta del organismo frente a procesos inflamatorios. Su amplia implicación en todos estos procesos fisiológicos, hace que su acción a nivel celular y molecular sea muy compleja. Su estudio ha puesto en evidencia de que tanto la exposición crónica o hipersecreción como la hiposecreción de los glucocorticoides están involucradas en una variedad de desordenes metabólicos, endocrinos, inmunes y neurológicos [16]–[20].

Tras un estímulo los glucocorticoides son liberados rápidamente hacia la circulación por difusión [21]. Una vez entran a la circulación sistémica los glucocorticoides se unen a proteínas plasmáticas, solo una baja concentración permanece libre y es biológicamente activa. Mayoritariamente, en un 90%, los glucocorticoides circulantes se unen a la *Corticosteroid-Binding Globulin* (CBG) y en menor proporción, 4-5%, se unen de forma inespecífica a la albumina, permaneciendo libre aproximadamente el otro 5-6% [22].

Como se ha mencionado, el uso crónico de los glucocorticoides como terapia está asociado con un incremento en la concentración de glucosa en sangre, intolerancia a la glucosa y diabetes. Los mecanismos subyacentes a estos efectos son la inhibición de la secreción de insulina, el incremento de la gluconeogénesis en el hígado y la inhibición de la captación de glucosa por los tejidos periféricos [23]. Sin embargo hoy en día sabemos que el término “glucocorticoide” no refleja sus efectos altamente versátiles en la regulación de hasta 20% de los genes del genoma de los mamíferos [21].

2. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL Y GLUCOCORTICOIDES

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) comprende: varios núcleos hipotalámicos, la hipófisis anterior o adenohipófisis y la glándula adrenal. El núcleo para-ventricular hipotalámico (PVN) es la principal fuente de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), una proteína de 41 aminoácidos. También neuronas motoras del PVN sintetizan otra proteína, la arginina-vasopresina (AVP o hormona antidiurética (ADH)) que sinérgicamente con la CRH estimulan las células corticotropicas de la adenohipófisis promoviendo la síntesis de la proopiomelanocortina (POMC). El estímulo que ejercen la CRH y AVP es de tipo pulsátil manteniendo un ritmo circadiano. El procesamiento de la macro-molécula POMC rinde, entre otras moléculas, la hormona adenocorticotropica (ACTH) que es almacenada en vesículas secretoras. Mediante el estímulo de la CRH/AVP la ACTH almacenada es liberada hacia la circulación sistémica. Un incremento en los niveles de ACTH en el sangre estimula en la zona fasciculata de la corteza adrenal la síntesis y posterior secreción de glucocorticoides los cuales ejercen su acción en los tejidos diana periféricos. Los efectos de los glucocorticoides son mediados a través de la unión a su receptor: receptor nuclear subfamilia 3 grupo c miembro 1 (NR3C1). Además, los glucocorticoides adrenales en los tejidos diana pueden ser convertidos a la forma inactiva cortisona por acción de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2), o contrariamente a cortisol activo por la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1) a partir de cortisona. Los niveles circulantes de glucocorticoides se regulan, mayoritariamente, por retroalimentación negativa del eje HHA, así los glucocorticoides circulantes inhiben la síntesis de CRH y ACTH a nivel de hipotálamo y adenohipofesis

repercutiendo a la vez en la síntesis y secreción de glucocorticoides por parte de la glándula adrenal. Fig 3 [24]–[26].

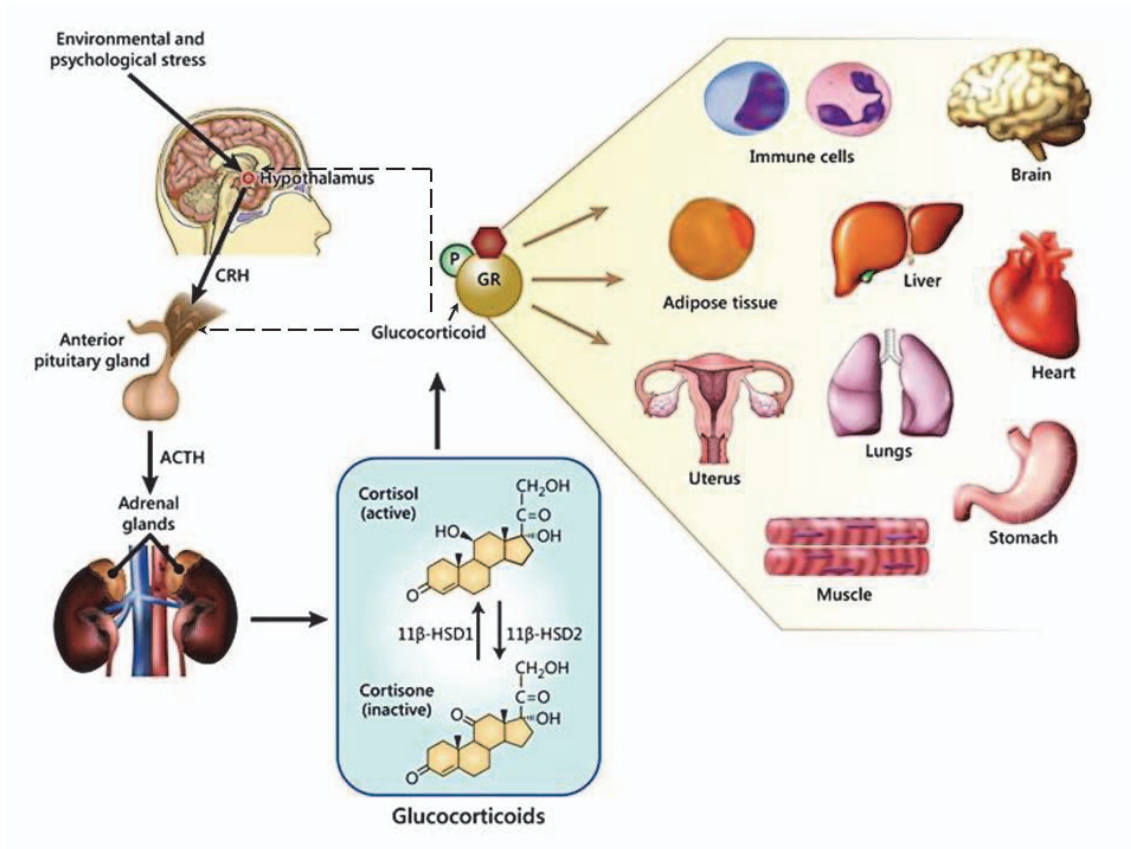


Fig. 3 Regulación de la secreción de los glucocorticoides por el eje hipotálamo hipófisis adrenal. Adaptado de [25].

A pesar que la principal función de la CRH es la regulación de la síntesis de ACTH, también esta implicada en la regulación de algunas funciones del sistema nervioso autónomo relacionadas con la memoria, alimentación, y comportamiento sexual. La CRH se expresa ampliamente en el CNS y en algunos tejidos periféricos como son la glándula adrenal, testículos, timo, piel, placenta, tracto gastrointestinal [27], [28]. La respuesta fisiológica a la CRH esta mediada a través de sus dos receptores: CRHR1 en cerebro y CRHR2 en los tejidos periféricos [27], [29].

La vasopresina es un péptido compuesto de nueve aminoácidos altamente expresado en el PVN, núcleo supra óptico (SON) y el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo. La vasopresina es liberada directamente a la circulación a nivel de la neurohipófisis para regular la homeostasis osmótica. Sin embargo, a través de la circulación portal hipofisaria la vasopresina también llega a la adenofipofisis donde potencia los efectos de la CRH en la liberación de la ACTH como ya se ha mencionado [30].

La proopiomelanocortina (POMC) es una pro-hormona que está altamente expresada en la hipófisis y el hipotálamo. El procesamiento de la POMC rinde varios péptidos activos, entre los cuales se encuentra la ACTH [31]. La ACTH ejerce su acción a través de su único ligando, el receptor de melanocortina tipo 2 (MC2R) situado en la membrana de la glándula adrenal [32]. Todos los receptores tipo melanocortina están acoplados positivamente a la adenil ciclasa. La unión de la ACTH a su receptor induce la producción de cAMP y así la esteroidogénesis, dando como resultado la secreción de los glucocorticoides. El efecto inmediato de la ACTH es incrementar la conversión de colesterol a $\Delta 5$ pregnenolona, que es el paso inicial en la síntesis de cortisol. El efecto crónico de la ACTH es incrementar la producción de todas las enzimas implicadas en la vía de la síntesis de las hormonas esteroideas [27], [33].

2.1. LA GLÁNDULA ADRENAL: ESTEROIDOGÉNESIS

En la glándula adrenal la esteroidogénesis se da en el córtex adrenal y concretamente en la zona fasciculada intermedia es donde se sintetizan los glucocorticoides. Todas las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir del colesterol, por lo que guardan una estrecha relación en su estructura química basada con la notación de los 4 anillos ciclopentanofenantreno clásica (Fig 4) [34]. En el estudio de la esteroidogénesis pueden distinguirse algunas aéreas que han marcado su desarrollo: 1) la clonación de la proteína esteroidogénica reguladora aguda (StAR) y el posterior estudio de los mecanismos de transporte del colesterol a nivel intracelular, 2) la expansión del conjunto de las hidroxisteroides deshidrogenasas y 3) la elucidación de las vías adicionales de la

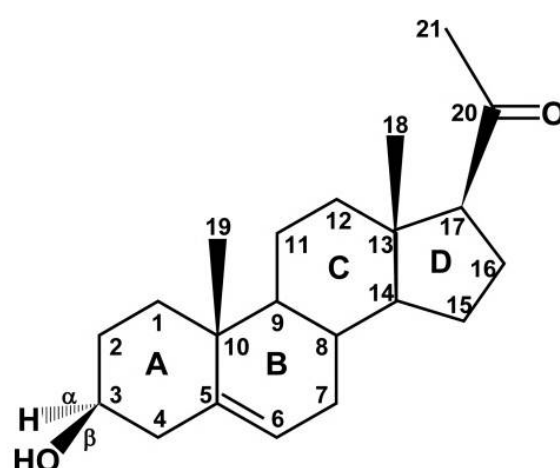


Fig. 4 Estructura de la pregnenolona en su conformación de anillo ciclopentanofenantreno común a todas la hormonas esteroideas. Los átomos de carbón son indicados por los números y los anillos con letras. Adaptado de [27].

esteroidogenesis en tejidos periféricos extra glandulares. Durante varios años se intentó relacionar la estructuras de las hormonas esteroideas con su actividad, pero solo hasta que sus receptores fueron identificados y clonados no se pudo comprender este conjunto de complejas interacciones [27].

Las enzimas involucradas en la biosíntesis de las hormonas esteroideas comprenden los citocromos P-450 (también llamadas CYPs), las hidroxisteroides deshidrogenasas (HSDs) y las esteroides reductasas. Cada una de las enzimas P-450, son producto de un único gen con una diferente traducción, mientras que las distintas isoformas de las deshidrogenasas están codificadas por genes distintos. El número de isoformas puede variar entre las diferentes especies, distribución tisular, actividad catalítica, sustrato, especificidad y localización sub-celular [27], [35], [36].

La síntesis de las hormonas esteroideas (Fig 5) se inicia en la mitocondria de las células adrenales, por tanto, existe un primer paso limitante de esta síntesis que es la entrada del colesterol a la mitocondria para que sea disponible a los enzimas de la vía. Este paso está regulado por la proteína StAR que en respuesta al estímulo de la ACTH se fosforila y entra el colesterol a la mitocondria facilitando la síntesis de hormonas esteroideas [37].

Una vez el colesterol ha entrado en la mitocondria de las células del cortex adrenal el colesterol pasa a pregnonolona, reacción mediada por la enzima esteroide 20-22 liasa (CYP11A1 o P450_{scc}) localizada en la mitocondria [27]. La pregnonolona puede dirigirse al retículo endoplasmático donde se convierte en progesterona reacción que es catalizada por la enzima la 3 β HSD. La pregnonolona y la progesterona son las moléculas precursoras del resto de las hormonas esteroideas sintetizadas por la glándula adrenal. La enzima esteroide 21-hidroxilasa (CYP21 o P450_{c21}) se expresa en el retículo endoplasmático liso y es responsable de la conversión de progesterona y de la 17 α -hidroxiprogesterona en 11-deoxicorticosterona y 11-deoxicortisol respectivamente [27]. Estos precursores se convierten en las hormonas activas corticosterona y cortisol mediante la enzima esteroide 11- β -hidroxilasa (CYP11B1). La corticosterona, que es el glucocorticoide mayoritario en roedores que no producen cortisol, puede convertirse en aldosterona mediante la aldosterona sintasa (CYP11B2) [35].

La regulación de síntesis de las hormonas esteroideas por parte de la ACTH es compleja y depende del tiempo de interacción de la hormona con la glándula. Así, una exposición crónica a la ACTH (por ejemplo la que tiene lugar en el síndrome de Cushing) provoca una hipertrofia de la glándula adrenal. Este crecimiento se da como consecuencia de la respuesta que desencadena la ACTH a través de AMPc como segundo mensajero que promueve la síntesis intra-adrenal del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II), del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y del factor de crecimiento epidérmico (EGF)

que serán los responsables de la hiperplasia e hipertrofia celular determinando una esteroidogénesis incrementada. También encontramos una respuesta a ACTH que podríamos decir tiene lugar a medio término (varios días) y que es mediada por AMPc y angiotensina II vía calcio/calmodulina promoviendo la transcripción de genes que codifican para las enzimas esteroidogénicas, especialmente de CYP11A1 que es la enzima limitante de la vía, incrementando la maquinaria esteroidogénica en la célula. Finalmente, existe una respuesta que se da en minutos, en este caso la ACTH estimula rápidamente la transcripción de StAR, además de la fosforilación de la proteína StAR ya existente, con la finalidad de incrementar el flujo de colesterol al interior de la mitocondria para abastecer de sustrato al primer paso de la esteroidogénesis. Esta respuesta rápida es inhibible por inhibidores de la síntesis de proteínas indicando que especies de proteínas de vida corta median este proceso [35], [37].

2.2. REGULACIÓN DEL EJE HHA: RITMO CIRCADIANO Y ULTRADIARIO

La vida en la tierra ha evolucionado desde hace más de 30 billones de años en condiciones de luminosidad natural. Esto condujo a que la mayoría de los organismos, desde los más simples a los más complejos, desarrollaran una especie de cronometro interno para

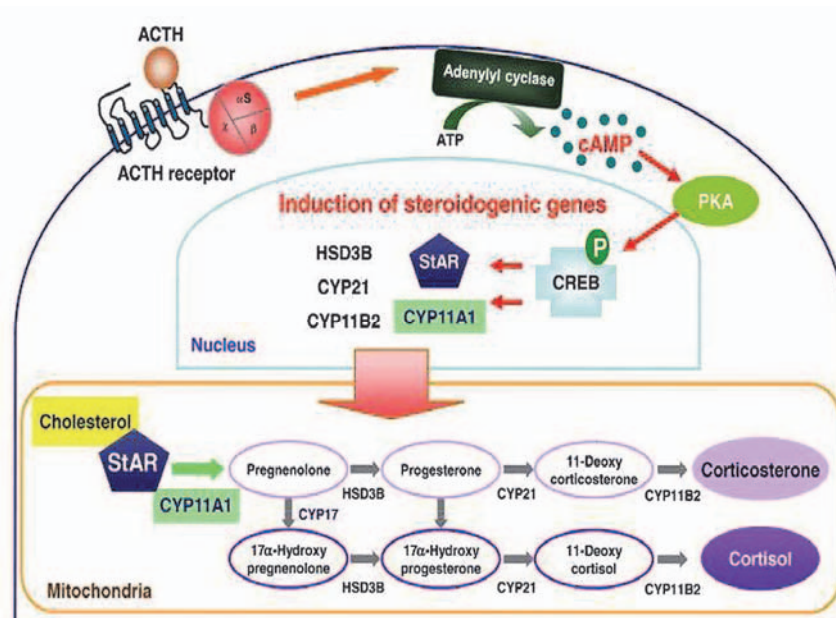


Fig. 5 Los GC principalmente se sintetizan en un subconjunto de células esteroidogénicas adrenocorticales por sucesivas modificaciones enzimáticas del colesterol en las mitocondrias. La transferencia del colesterol desde el citosol en los compartimentos mitocondriales es mediada por la StAR. La ACTH secretada en la adenohipofisis induce la producción de GC en la glándula suprarrenal mediante la promoción de la expresión génica y a través de la activación de las cascadas de señalización ACTHR/cAMP/PKA/CREB. adaptada de [40].

sincronizar los procesos fisiológicos y conductuales internos con el ciclo solar externo. Los relojes biológicos juegan un papel fundamental en la coordinación de las interacciones de un individuo con el medio externo (por ejemplo una referencia interna a la hora del día puede ayudar a los animales a evitar la depredación o participar en el apareamiento) pero también sincronizan los procesos fisiológicos y bioquímicos internos de un individuo (regulación hormonal) [38]. Así encontramos que las variaciones diarias entre el sueño/ayuno/catabolismo y la vigilia/alimentación/anabolismo son coordinadas por un reloj central situado a nivel del núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SCN) y que está regulado por la luz solar. Además del reloj central, existen relojes secundarios situados en los distintos órganos pero finalmente todos ellos están sincronizados y regulados por el reloj central [39].

La secreción de los glucocorticoides está sujeta a un ritmo circadiano pero también a un ritmo ultradiario, es decir con una duración menor de 24h [40]. Los impulsos de secreción de la CRH se dan con una frecuencia más o menos constante pero con variación en la intensidad afectando así la liberación de la ACTH y de los glucocorticoides. Bajo condiciones basales se observan de 18 a 25 impulsos de ACTH en 24 horas, con una variación de la intensidad según la hora del día, siendo mayor por la mañana [41][42]. El estrés también incrementa la intensidad de los picos de ACTH [43]. Como consecuencia de

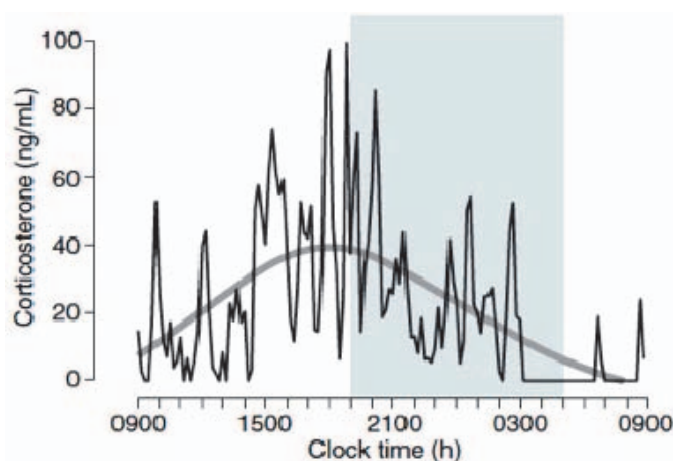


Fig. 6 Bajo condiciones basales, la dinámica de la secreción de los glucocorticoides se caracteriza por un ritmo circadiano (línea de color gris) y un ritmo ultradiano de aproximadamente 1 hora (línea de color negro). En los roedores, los niveles máximos de corticosterona se producen durante la fase de noche. La región sombreada indica la fase oscura. Adaptado de [42]

estos pulsos en la secreción de CRH y ACTH se observa también una secreción pulsátil de glucocorticoides con una frecuencia de aproximadamente una hora. La intensidad de estas secreciones pulsátiles ultradiarias cambia a lo largo del día de forma que están coordinada

con el pico circadiano. Esto quiere decir que cuando los niveles de glucocorticoides circulantes son más bajos (al anochecer en humanos) los pulsos de secreción son menos frecuentes y menos intensos, mientras que cuando los niveles de glucocorticoides son elevados (por la mañana) los pulsos de secreción son más frecuentes y más intensos [41], [44]. Los niveles de glucocorticoides circulantes más elevados en humanos se encuentran entre las 6h y las 10h de la mañana y los más bajos después de la media noche, mientras que en roedores los picos de secreción ocurren en la fase nocturna ya que son animales de hábitos nocturnos (Fig. 6).

Se observa que la secreción pulsátil de CRH y ACTH son imprescindibles para mantener el ritmo circadiano en los niveles de glucocorticoides, cuando se administra ACTH de forma constante en vez de pulsátil se altera la secreción de glucocorticoides por parte de la glándula adrenal [41] (Fig. 7). De forma que la glándula adrenal por se tiene adaptado un mecanismo para responder preferencialmente a una señal digitalizada de ACTH que con su propio sistema de *feedforward/feedback* amplifica las características pulsátiles de la señal entrante [45].

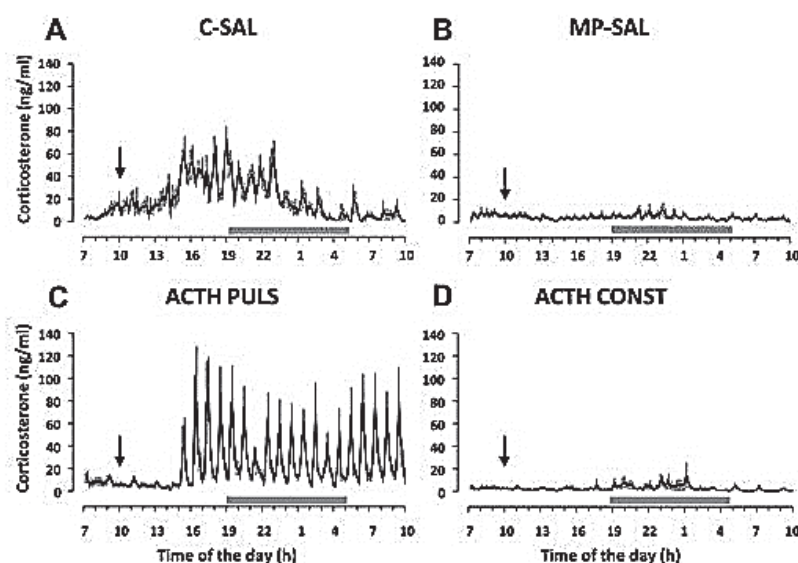


Fig. 7 Regulación de la secreción de los glucocorticoides en la glándula adrenal. A) Ratas control tratadas con solución salina (C-SAL) muestran el ritmo ultradiano normal de corticosterona, B) Ratas tratadas crónicamente con metil-prednisolona en solución salina (MP-SAL) muestran una disminución de la secreción de corticosterona con pérdida del ritmo circadiano y ultradiano, C) Ratas tratadas con metil prednisolona y pulsos de ACTH (ACTH-PULS) muestran una secreción ultradiana de corticosterona, pero con alteración del circadiano y D) Ratas tratadas con metil prednisolona y ACTH constante (ACTH CONST), se observa que la ACTH no tiene efecto sobre la glándula adrenal en la liberación de corticosterona. Apatada de [41].

2.3. ALTERACIONES DEL EJE HHA Y CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS

El eje HHA está altamente controlado por un sistema de retroalimentación con gran sensibilidad que regula la secreción de los glucocorticoides con el fin de evitar altas concentraciones periféricas de glucocorticoides que a largo plazo conllevan efectos no deseados. Los efectos mejor conocidos del exceso o defecto de glucocorticoides hacen referencia al estrés, al control del peso corporal y obesidad y a la inflamación, todos ellos a la vez estrechamente relacionados [43], [46], [47].

2.3.1. GLUCOCORTICOIDES Y ESTRÉS

El estrés suele definirse como una amenaza real o implícita a la homeostasis. En el uso común el estrés se refiere a un evento o una sucesión de acontecimientos que causan una respuesta, a menudo en forma de angustia pero también en algunos casos, refiriéndose a un desafío que conduce a una sensación de euforia, se podría hablar de alguna forma de estrés “bueno” [48]. El mantenimiento de la homeostasis ante la presencia de estímulos adversos requiere de la activación de un complejo conjunto de respuestas que involucran los sistemas endocrino, nervioso e inmune, configurando la respuesta al estrés [49].

En una respuesta normal a un evento estresante cuando el cerebro detecta un cambio homeostático se activa el sistema nervioso simpático (SNS) que libera neurotransmisores y catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Posteriormente en una activación más lenta el hipotálamo secreta CRH activándose el eje HHA [46], [49].

Dependiendo del tipo de estrés, bien sea agudo o crónico, conlleva a diferencias en la actividad del eje HHA. Así, la activación del eje HHA como consecuencia del estrés agudo produce un aumento transitorio en los niveles de los glucocorticoides en sangre y una resistencia parcial a la inhibición por retroalimentación de los glucocorticoides. Esta respuesta persiste durante un corto periodo de tiempo después de la ocurrencia del episodio de estrés agudo e implica una rápida desensibilización a los glucocorticoides en el cerebro [50].

Los cambios observados en la exposición al estrés crónico varían en relación a si el organismo ha desarrollado una adaptación a situaciones estresantes. Estas adaptaciones al estrés crónico están acompañadas de una reducción de los niveles de glucocorticoides y ACTH en plasma al compararlos con los niveles que genera el estrés agudo. No obstante, el estrés crónico resulta con frecuencia en una hipersecreción de glucocorticoides y una activación sostenida a nivel de sistema nervioso central, simpático y también periférico

[50]. Se observa que en esta respuesta al estrés crónico, al igual que el agudo, también se altera el control del eje HHA, con resistencia a la inhibición por retroalimentación con desensibilización de los receptores de glucocorticoides [51]. Existen evidencias experimentales de que exposiciones previas a estímulos estresantes pueden aumentar la respuesta de los glucocorticoides a situaciones estresantes subsiguientes. De esta manera el estrés crónico con frecuencia actúa como un desencadenante en la aparición de la depresión, que está asociada con hipersecreción de la CRH y una alteración en la respuesta de retroalimentación por cortisol [52]. Además, se ha observado que la naturaleza del estímulo estresante condiciona la ruta de activación de la CRH. Así, frente a un estímulo nocivo (infección, inflamación, o hipoglucemia) se activa la ruta mono-sináptica, mientras que estímulos estresantes de tipo psicológicos activan la síntesis de CRH en la zona cortico-límbica que es la región donde están las funciones cognitivas y emocionales [50].

Rosmond et al [53] propusieron tentativamente una clasificación de cuatro estados con el objetivo de evaluar el funcionamiento del eje HHA en humanos. El primer estado comprende el normal funcionamiento del eje HHA, el cual sigue un ritmo circadiano normal y con una retroalimentación normal estando, pues, asociado con condiciones saludables. El segundo estado correspondería a condiciones de estrés agudo donde se mantiene la regulación central del eje HHA, así como, su control por medio de retroalimentación, pero con una secreción elevada de cortisol que en caso de mantenerse ocasionaría daños en tejidos periféricos. En el tercer estado sería aquel donde tendrían lugar cuadros de estrés repetidamente que comprometerían la regulación central del eje HHA, con un control deficiente de la retroalimentación, un incremento de la secreción de cortisol y de sus niveles circulantes, además de la pérdida de su ritmicidad diaria. El cuarto estado está relacionado con el estrés crónico, con agotamiento a nivel central de los sistemas de regulación, se observa un marcado descenso en la producción neta de cortisol y pérdida del ritmo circadiano con una curva muy nivelada respecto al patrón de secreción diurno. Además se alteran, inhiben, otras vías endocrinas, dando como resultado un síndrome metabólico.

En una revisión Salposki et al [54] sugieren dos clases de acciones de los glucocorticoides a nivel central: por un lado tendríamos las *acciones moduladoras* las cuales afectan la respuesta del organismo frente al estrés y por otro las *acciones preparativas* que “preparan” una respuesta del organismo frente situaciones de estrés futuras o lo ayudan a adaptarse frente a situaciones de estrés crónico. Dentro de las *respuestas moduladoras* se distinguen las siguientes posibilidades:

- ❖ Acciones permisivas: son las ejercidas por los niveles basales de glucocorticoides en situaciones de reposo y provee los mecanismos de defensa por los cuales un organismo responde al estrés, constituirían la dotación “anti-estrés” de un individuo.

Sus efectos son los primeros que se manifiestan en la respuesta inicial al estrés y no dependen de un incremento en la concentración de los glucocorticoides.

- ❖ Acciones supresoras: están determinadas por un aumento en los niveles de glucocorticoides y ocurren aproximadamente a la hora del inicio de la condición de estrés, estas acciones relativamente tardías controlan las reacciones de defensa y evitan un exceso en la respuesta.
- ❖ Acciones estimuladoras: también están determinadas por un aumento en la concentración de los glucocorticoides, afectan a nivel de ritmo ultradiano desde el inicio de la respuesta y potencian la primera ola de respuesta hormonal al estrés y por lo tanto son el reverso de las acciones supresoras.

La liberación de glucocorticoides puede ocurrir en cualquier momento como forma de respuesta a un factor estresante. En conjunto con otros mediadores de estrés, el aumento en la concentración de los glucocorticoides en situaciones estresantes facilita la adaptación del organismo al nuevo entorno teniendo como objetivo la restauración de la homeostasis, por mejora de la activación emocional y promoviendo procesos cognitivos y motivacionales entre otras cosas, que confieren al organismo la capacidad de predecir próximos eventos y de esta manera poder controlar situaciones futuras. Los procesos que controlan la respuesta al estrés han sido denominados alostáticos [51].

La alostasis se define como la capacidad de lograr la estabilidad a través del cambio, es pues, un proceso que mantiene la homeostasis a través de cambios en los factores fisiológicos esenciales para la vida. Los mediadores primarios de la alostasis son el sistema nervioso autónomo y el neuroendocrino actuando a través de las catecolaminas y los glucocorticoides [48]. Se denomina carga alostática al costo a la adaptación de un organismo a un evento amenazador, si el costo de restablecer la homeostasis es demasiado alto la respuesta al estrés resulta inadecuada o excesivamente prolongada [45]. El estrés es pues un estado de amenaza a este equilibrio y la adaptación al estrés o alostasis confiere ventajas de sobrevivencia. La activación del eje HHA da como resultado la secreción de los glucocorticoides, cuya principal función es la restricción de los efectores de la respuesta al estrés [55].

Se ha descrito que aproximadamente el 25% de pacientes con patologías relacionadas con el estrés tales como, depresión atípica, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia, estrés post-traumático, y dolor crónico, presentan hipocortisolemia relacionada con hiposensibilidad del eje HHA [56]. Parece ser que la hipocortisolemia puede estar relacionada con una disminución en la activación de los receptores de CRH en la adenohipófisis, a pesar de existir hipersecreción de CRH en el hipotálamo, provocando

finalmente una disminución de la actividad de la glándula adrenal presentando atrofia. En individuos con estrés post-traumático se ha descrito una disminución en el volumen del hipocampo, involucrado en la regulación inhibitoria del eje HHA [56], [57].

La secreción de los glucocorticoides ocasionada por el estrés activa la zona límbica del cerebro, que incluye la amígdala y el núcleo accumbens, centro importante en el control de las emociones. Así, los glucocorticoides activan la expresión de la CRH en el nucleo central de la amígdala aumentando la predisposición a actividades compulsivas como el consumo de sacarosa y grasa, o sea la ingesta de alimentos altos en calorías promoviendo el aumento de los depósitos de grasa [58], [59] Fig. 8.

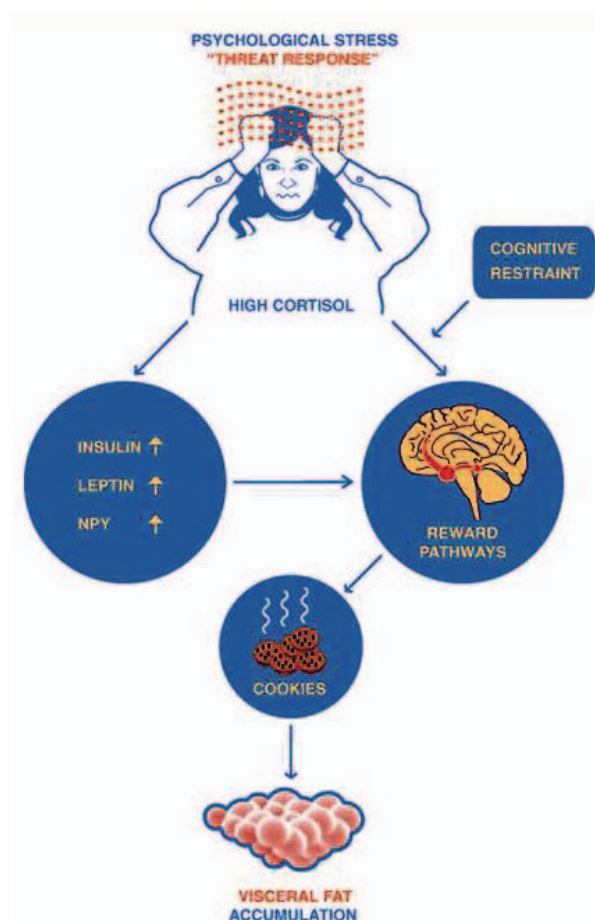


Fig. 8 Los glucocorticoides estimulan los comportamientos placenteros como son la toma de drogas, la ingesta de alimentos apetecibles (bollería industrial, alimentos ricos en carbohidratos, grasas, etc) en animales de experimentación, probablemente a través del sistema de recompensa. Adaptado de [58]

2.3.2. GLUCOCORTICOIDES Y OBESIDAD

La administración intravenosa de glucocorticoides incrementa la ingesta tanto en humanos como en roedores. Sin embargo, la administración de diferentes dosis de corticosterona a ratas adrenalectomizadas y alimentadas con dieta normal no provoca ningún incremento de ingesta, pero cuando los animales son alimentados con una dieta rica en lípidos o en sacarosa estos responden incrementando la ingesta de forma proporcional a las dosis de corticosterona [47].

El consumo de dietas ricas en grasas saturadas y azúcares supone el mayor factor que influye en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones metabólicas, tales como la diabetes tipo 2 o mellitus y alteraciones cardiovasculares [60]. El balance energético, es decir el ajuste entre la ingesta, el gasto y el almacenamiento de energía, está regulado a nivel neuroendocrino. Además, hay evidencias que estrés y balance energético están estrechamente relacionados, de hecho los efectos del estrés crónico pueden ser acentuados por una dieta hipercalórica [43]. También se ha observado que la obesidad puede incrementar el riesgo de depresión y ansiedad en individuos susceptibles [61]–[63]. McNeilly et al. [64] demostraron que ratas alimentadas con dieta hiperlipídica durante 12 semanas, presentaban niveles elevados de corticosterona y una conducta ansiolítica al ser expuestas a la prueba del laberinto elevado (EPM) respecto de ratas control.

El incremento de estrés que perciben los individuos en la sociedad actual tiende a afectar su comportamiento con respecto al consumo de alimentos [65]–[67]. De hecho, en un estudio dirigido a examinar la relación entre diferentes estados emocionales y el consumo de alimentos se demostró que cuando a un grupo de personas se les inducía un cuadro emocional relacionado con la angustia consumían un 30% más de aperitivos que cuando, al mismo grupo se les inducía un estado de ánimo relacionado con el bienestar. En este mismo trabajo se analizó el comportamiento de individuos frente a dos tipos de aperitivos. Los individuos que presentaban angustia optaron por el consumo de aperitivos “basura” mientras el grupo con sensación de felicidad optó por consumir frutos secos [68]. Las bases de este comportamiento y otras conductas que desencadenan obesidad incluyen vías corticales y subcorticales que relacionan el aprendizaje con la memoria del placer y la recompensa que son complejas y difíciles de entender.

La obesidad y sus complicaciones metabólicas presentan una comorbilidad significativa con el estrés y desordenes psicológicos como la ansiedad y la depresión [69], [70]. Luppino et al. [71] en un meta-análisis encontraron que la obesidad incrementaba el riesgo de depresión y viceversa, concluyendo que existe un vínculo recíproco entre la obesidad y la depresión. Esto es debido probablemente a que los circuitos neuronales que controlan la homeostasis energética y la respuesta al estrés están entrelazados, otorgando prioridad al

eje HHA para redistribuir la energía en respuesta a amenazas agudas o percibidas al bienestar de un organismo, dando como resultado una interacción recíproca entre estrés y metabolismo que es fundamental para comprender la etiología de las enfermedades metabólicas y los desórdenes psicológicos relacionados con el estrés [72].

La influencia del sistema neuroendocrino sobre las funciones metabólicas se evidenció por primera vez a principios del siglo XX cuando se relacionó la adiposidad excesiva con la disfunción de tumores en la hipófisis y daño en el hipotálamo [73]. En experimentos realizados a mediados del siglo XX en los que se inducían lesiones quirúrgicas en diversas áreas del hipotálamo en ratas, se encontró una relación directa entre el área lesionada y un incremento de peso (grasa) o por el contrario una situación de extremo adelgazamiento [74]. Sin embargo, uno de los descubrimientos más importantes y que marcó un antes y un después en el estudio de la relación eje HHA y metabolismo energético fue la clonación del gen *ob* en 1994 [75]. El gen *ob* codifica para la proteína leptina que es una hormona producida y secretada por el tejido adiposo, sus niveles en la circulación correlacionan con el índice de grasa del organismo. La deficiencia del gen de la leptina en ratones causa obesidad mórbida, diabetes y varios desórdenes neuroendocrinos [76].

La leptina inhibe la CRH mediante una retroalimentación negativa sobre el HHA, así la falta de leptina o de una respuesta normal a esta conduciría a un hipercortisolismo como una forma de compensar el incremento en la secreción de la CRH. Por lo que la retroalimentación del eje HHA implicaría también al tejido adiposo y la leptina [77]. Varios estudios muestran que la leptina está intrínsecamente regulada por los glucocorticoides y la insulina. La administración de insulina y dexametasona de forma conjunta incrementan los niveles de leptina de forma sinérgica en humanos, sin embargo cuando ambas se administran separadamente los niveles de leptina no se incrementan [78].

La cantidad de grasa corporal que mantiene un organismo refleja un sistema homeostático firmemente regulado que ecualiza el aporte calórico con el gasto de energía y donde sistema nervioso central (CNS) es el principal regulador [72]. Esta regulación homeostática está agudamente controlada por un conjunto de señales de saciedad que surgen desde el intestino y son secretadas según la frecuencia en la ingesta de alimentos [79]. Mientras las señales de saciedad dan información acerca de la cantidad exacta de alimento consumido, las señales provenientes del tejido adiposo como, la leptina, y del páncreas, la insulina, nos dan una información adecuada de la cantidad de grasa corporal de un organismo [72]. Cuando un organismo incrementa su grasa corporal incrementan los niveles de leptina lo que conlleva que a nivel de cerebro exista una respuesta dirigida a reducir la ingesta e incrementar el gasto de energía con el objetivo de restablecer los niveles de grasa corporal normales del organismo [80].

Existen numerosos estudios que intentan esclarecer el papel de los glucocorticoides en la obesidad ya que, si bien, en humanos se encuentra cierta relación entre hipercortisolemia y obesidad, en la mayoría de los casos los individuos obesos presentan niveles normales de glucocorticoides circulantes [81]. Por otro lado, los modelos de obesidad animal más utilizados, el raton *ob/ob* y la rata *fa/fa*, se caracterizan por presentar unos niveles elevados de glucocorticoides, y curiosamente la adrenalectomía revierte el estado obeso. [82].

Como se ha descrito anteriormente, la activación del eje HHA resulta en la secreción de glucocorticoides los cuales juegan un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa y el metabolismo lipídico [83]. El papel esencial de los glucocorticoides es suministrar suficiente cantidad de glucosa en la circulación para alimentar el cerebro y garantizar la supervivencia del organismo en condiciones de estrés agudo o reducción de la ingesta de alimentos Fig.9. Los mecanismos por los que los glucocorticoides producen este efecto incluyen: 1) el aumento de la producción hepática de glucosa; 2) disminución de la captación de glucosa periférica en el músculo y el tejido adiposo; 3) aumento de la degradación de la grasa y proteína a nivel periférico para proporcionar sustratos adicionales para la producción de glucosa y 4) la inhibición de la liberación de insulina a partir de las células β -pancreáticas [84]–[90] (Fig. 9)

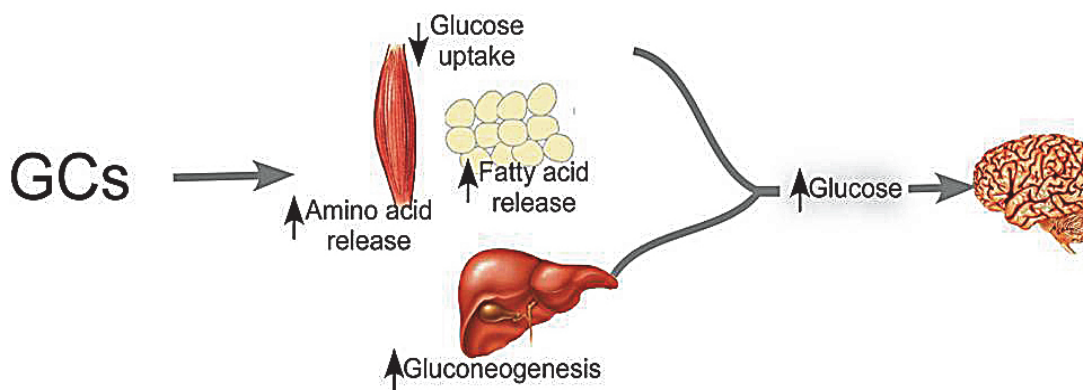


Fig. 9 En respuesta al aumento de los niveles de glucocorticoides el hígado, músculo y tejido adiposo actúan en conjunto para aumentar los niveles de glucosa circulante con el fin de proporcionar la energía necesaria para mantener la función cerebral. Adaptado de [90]

La secreción continua y excesiva de glucocorticoides o bien su administración en dosis farmacológicas se asocia ampliamente con depresión, hipertensión, osteoporosis, inmunosupresión y todas las características del síndrome metabólico incluyendo obesidad visceral, resistencia a la insulina, dislipidemia y las enfermedades producto de sus complicaciones como son la arteriosclerosis y la disfunción del sistema cardiovascular. De

todas formas, cada una de estas manifestaciones podría ser producida a pesar de existir un funcionamiento normal del eje HHA y como consecuencia de una hipersensibilidad a los glucocorticoides por parte de los tejidos diana [91]–[93], (Fig. 10).

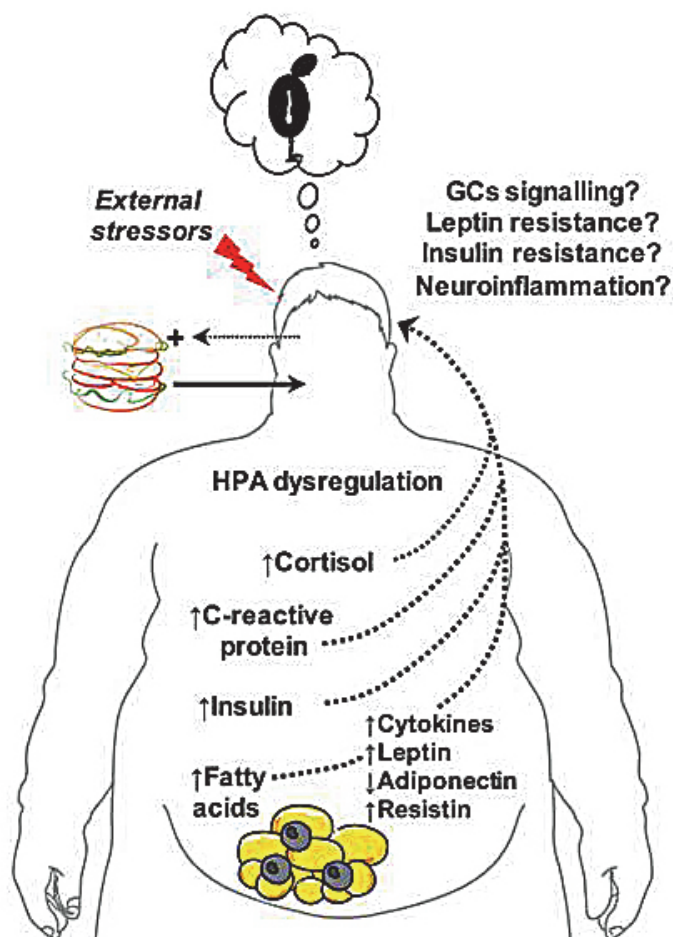


Fig. 10 La ingesta excesiva de alimentos ricos en grasa promueve el incremento de peso, acumulación de grasa visceral. Los cambios endocrinos relacionados con la obesidad abdominal incluyen disregulación del eje HHA y niveles alterados de glucocorticoides, leptina, insulina, resistina, adiponectin. La obesidad induce alteraciones en los glucocorticoides a nivel cerebral. La acumulación de grasa también estimula la liberación de citoquinas inflamatorias, proteína c-reactiva e incrementa los niveles de ácidos grasos libres, lo cual ocasiona una respuesta neuroinflamatoria. La asociación de todos estos factores incrementa en paralelo la vulnerabilidad a los factores estresantes externos, estados emocionales negativos, comportamientos cognitivos adversos (baja autoestima) asociados con obesidad y sobre peso potenciando el consumo de alimentos hipercalóricos “placenteros” alimentando un círculo vicioso de obesidad, disfunción metabólica y depresión. Adaptado de [93]

En la fase aguda del estrés los glucocorticoides estimulan la secreción de la GH (hormona del crecimiento), sin embargo con un estrés más prolongado la CRH induce un incremento de los niveles de somatostatina o GHIH (hormona inhibidora de la hormona del

crecimiento) que inhibe la secreción de GH. Por otro lado los glucocorticoides inhiben directamente en los tejidos diana los efectos de la GH mediatizados por factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). El eje GH-IGF-1 juega un papel importante en el control del metabolismo periférico de los glucocorticoides, ejerciendo su efecto a través 11 β -HSD1. Experimentos *in vivo* y *ex vivo* han evidenciado que el sistema GH-IGF-1 inhibe la expresión y actividad de la enzima 11 β -HSD1 en el tejido adiposo e hígado y como consecuencia una reducida regeneración de glucocorticoides a nivel local [94].

Las complicaciones por hipercortisolismo pueden ser debidas a un efecto directo o indirecto a través de su acción sobre otras hormonas. Friedman et al. [92] encuentran que los niveles de colesterol total y de triglicéridos son más elevados en pacientes con síndrome de Cushing que en individuos obesos. Sorprendentemente cuando a ambos tipos de pacientes se les somete a una carga oral de glucosa, los pacientes con síndrome de Cushing presentan unos niveles más elevados de glucosa y menores de insulina con respecto a los pacientes obesos con síndrome metabólico. Los autores concluyen que esta insulinopenia observada en los pacientes con síndrome de Cushing podría ser debido a un efecto toxico ejercido directa o indirectamente por los glucocorticoides sobre las células β -pancreáticas [92]. Con posterioridad se ha descrito que incremento de los glucocorticoides en el páncreas afecta el funcionamiento de las células β -pancreáticas ocasionando resistencia a la insulina [95].

Las consecuencias más importantes debidas a la sobreexposición de los glucocorticoides suelen ocurrir durante el periodo postprandial, cuando ejercen sus efectos anti-insulinicos en el tejido hepático, muscular, óseo y adiposo. La insulina favorece la captación y almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en musculo, reduce la lipólisis inhibiendo la liberación de los ácidos grasos hacia el torrente sanguíneo desde el tejido adiposo, también inhibe la gluconeogenesis y la glucogenolisis, por lo que un exceso de glucocorticoides puede afectar toda esta homeostasis metabólica conduciendo al organismo a desarrollar resistencia a la insulina [96].

2.3.3. GLUCOCORTICOIDES E INFLAMACION

A mediados del siglo XIX tuvieron lugar las primeras observaciones en que se relacionaron los glucocorticoides con la respuesta del sistema inmune. Así, Thomas Addison en 1855 observó que pacientes con insuficiencia adrenal tenían elevado número de linfocitos, siendo la primera evidencia de que las hormonas secretadas por la glándula adrenal tenían una relación con el sistema inmune [3]. H Jaffe en 1920 [97] demostró que ratas adrenalectomizadas exhibían una hipertrofia del timo y Hans Selye en 1930 [98] publicó un trabajo donde animales expuestos a varios factores estresantes experimentaron

una involución del timo y atrofia de la glándula adrenal. En 1948 se descubrió que el compuesto E de Kendall (cortisona) tenía efectos antiinflamatorios al suministrarse a una paciente con artritis reumatoide, una enfermedad autoinmune [12]. Desde entonces ha existido una intensa investigación sobre los glucocorticoides y sus efectos relacionados con la regulación del sistema inmune [99]. Inicialmente se dedujo que los efectos inmunomoduladores de los glucocorticoides solo se producían cuando se administraban dosis farmacológicas, sin embargo Besedovsky et.al. [100] demostraron que al administrar suero de oveja a ratas los niveles endógenos de corticosterona incrementaban de dos a tres veces.

La activación del eje HHA tiene profundos efectos inhibidores de la respuesta inmunitaria, a través del incremento de glucocorticoides son inhibidas prácticamente todos los componentes de la respuesta inmune [101], [102]. Así, el sistema nervioso central regula la respuesta inmune de manera sistémica, regional y local, mientras que el sistema nervioso periférico actúa como primera línea de defensa en los sitios locales de inflamación a través de la liberación de neuropéptidos que generalmente incrementan la respuesta inmunes locales. Las respuestas neuroendocrinas por medio del eje HHA controlan la inflamación a nivel sistémico a través de la liberación final de los glucocorticoides y sus efectos antiinflamatorios [103].

Estudios realizados entre las décadas de 1970 y 1980 demostraron que existe una regulación del eje HHA por parte de las citoquinas [104]. Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño (8-60kDa) sintetizados por diversos tipos celulares, destacando las células del sistema inmune, claves para comunicación celular regulando multitud de procesos fisiológicos. La mayoría de citoquinas están implicadas en la regulación de procesos inflamatorios de forma que las citoquinas producidas a nivel local durante la respuesta inflamatoria pueden llegar al cerebro para inducir respuestas específicas, por ejemplo la fiebre [105]. Existe pues una interconexión entre los sistemas neuroendocrinos, inmune y nervioso con una implicación destacada de las citoquinas es su regulación [106].

Los cambios en los niveles circulantes de glucocorticoides están asociados con cambios en los niveles de citoquinas y producción de leucocitos [107]. Las citoquinas más importantes en la regulación del eje HHA son el TNF- α , IL-1 y IL-6 [105]. La IL-6 actúa sinérgicamente con los glucocorticoides en la estimulación de las proteínas de fase aguda [106]. Estas tres citoquinas activan el eje HHA y el SNS de forma independiente pero sus efectos son sinérgicos, esta señalización ocurre a través de una compleja ruta dependiente de la CRH. También se ha descrito que ciertas citoquinas o combinaciones de ellas pueden causar resistencia a los glucocorticoides [107], [108].

Introducción

Aunque existen diferencias en las secuencias entre las dos formas de IL-1 (α y β), ambas inducen la activación del eje HHA causando incremento en la concentración de ACTH y glucocorticoides [109]. Inyecciones intracerebroventriculares (ICV) inducen todos los síntomas de la reacción de la fase aguda, incluyendo fiebre, activación del eje HHA y comportamiento depresivo [109] [110]. La IL-6 es la principal citoquina con un papel determinante en la activación del eje HHA, su administración subcutánea incrementa los niveles de ACTH [102]. Los niveles de IL-6 están fuertemente incrementados durante el estrés inflamatorio y en menor cantidad durante el estrés psicológico estando implicada en las patologías relacionadas con el estrés psicológico y envejecimiento. En ratones *knockout* para IL-6 presentan unos niveles de corticosterona normales o disminuidos con niveles de TNF- α incrementados respecto a los *wildtype*.

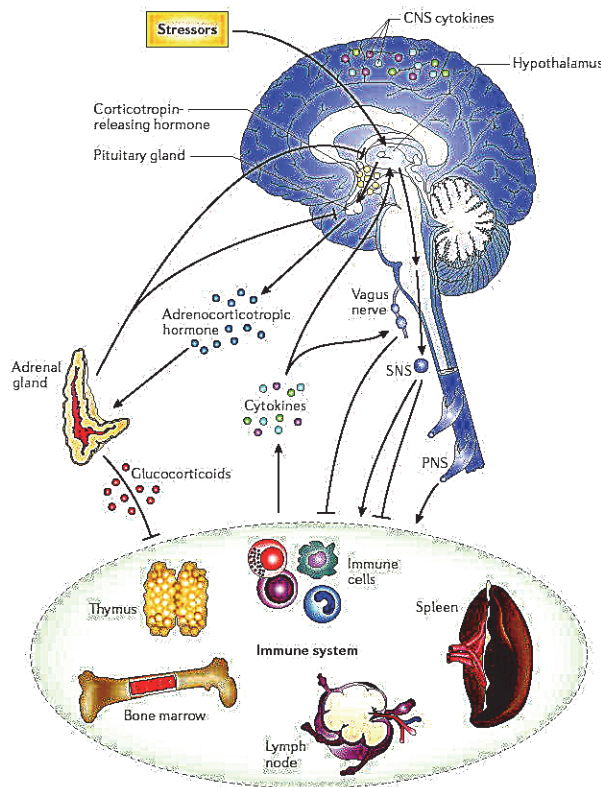


Fig. 11 Representación gráfica de la conexiones entre el sistema nervioso, neuroendocrino e inmune. Adaptada de [103]

La activación crónica del eje HHA al igual que un estado de inflamación crónica ocasiona una respuesta adaptativa de protección recíproca. Así, por ejemplo los pacientes con síndrome de Cushing presentan una leve respuesta inmune, sugiriendo que estos pacientes desarrollan una tolerancia a los glucocorticoides [101]. En ratas con colestasis aguda, un

modelo animal de inflamación crónica, hay incremento moderado de corticosterona los cuales, sorprendentemente están asociados a niveles bajos de CRH y altos de AVP en el hipotálamo. Este hecho estaría de acuerdo con la teoría de que estos animales adaptarían su respuesta inmune de manera alostática frente al estado inflamatorio crónico [111].

3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides, al igual que el resto de hormonas esteroideas, actúan a través de receptores nucleares. En concreto, los glucocorticoides se unen al denominado receptor de glucocorticoides (GR) pero también e incluso con mayor afinidad al receptor de mineralocorticoides (MR). Recientemente, también se ha descrito que algunas de las acciones reguladas por los glucocorticoides son independientes de transcripción génica [112].

3.1. EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

El receptor de glucocorticoides (GR) es una proteína de 94 kDa que fue clonado y expresado por primera vez en 1985 [112]. Se caracterizaron dos isoformas, por un lado la isoforma α (GR α) de 777 aminoácidos; y por otro lado una isoforma β (GR β) de 742 aminoácidos que difiere de la forma α en los 15 aminoácidos del extremo carboxi-terminal y en que no presenta capacidad de unión a la forma activa de los glucocorticoides [113][114]. No obstante, el GR β se expresa en varios tejidos y actúa como un ligando independiente que regula negativamente la acción de los glucocorticoides actuando como un inhibidor del GR α y produciendo en el organismo un estado de resistencia a la acción de los glucocorticoides [115][116][117]. El GR α muestra una alta afinidad por el glucocorticoide sintético dexametasona, afinidad más moderada por el cortisol y la corticosterona y muy baja afinidad por la aldosterona, los esteroides sexuales y la desoxicorticosterona tanto in vivo como in vitro [113].

El GR está codificado por el gen *NR3C1* “*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*” y pertenece a la familia de los receptores nucleares representada por unos 48 miembros en humanos y por 49 en ratones. Hoy en día más de un tercio de los 48 miembros (17 en total) son dianas de fármacos actualmente comercializados [118].

Los receptores nucleares comparten en su estructura muchas similitudes encontrándose en ellos varios dominios moduladores. Así, existe un dominio amino-terminal altamente variable (NTD) denominado también dominio inmunogénico, un dominio de unión a DNA

(DBD) altamente conservado, una región de bisagra o la región H que es una región flexible entre el dominio de unión al DNA y el dominio de unión al ligando y finalmente, un dominio de unión a ligando (LBD) con un extremo carboxi-terminal variable [119].

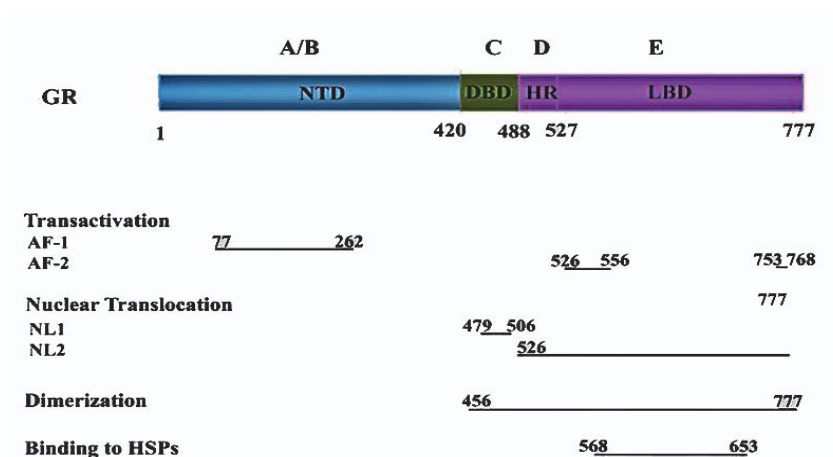


Fig. 12 Los dominios funcionales del GR. Los dominios funcionales y subdominios se indican debajo de las estructuras de las proteínas linealizadas. AF, la función de activación; DBD, el dominio de unión al ADN; LBD, el dominio de unión al ligando; NLS, señal de localización nuclear. Adaptado de [117].

El dominio N-terminal (NTD) que incluye los 420 primeros aminoácidos del GR, es el dominio más variable tanto en términos de longitud como de secuencia de aminoácidos entre los receptores nucleares. Este dominio contiene una potente región de transactivación AF-1 situada entre los aminoácidos 77 y 262, esta región, que es independiente del ligando, juega un papel importante en la interacción del receptor con las moléculas reguladoras de la transcripción como los coactivadores, moduladores de cromatina y factores implicados en la transcripción basal. Además, se ha observado que la región AF-1 contiene los principales sitios de fosforilación del GR pero no es indispensable para la supervivencia. El dominio DBD comprende los aminoácidos del 420-488 y es responsable de reconocer secuencias palindrómicas específicas en el promotor del gen, en concreto los elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) dentro del genoma. El DBD también es importante para la dimerización funcional del receptor. La región bisagra (HR) comprendida entre los aminoácidos 488-527 es una porción flexible en la cual el DBD y el LBD pueden rotar y adoptar diferentes conformaciones. La zona de localización nuclear 1 (NL1), esta situada en la unión entre la región bisagra (HR) y el DBD. El LBD se sitúa entre los aminoácidos 528-577 y contiene las funciones para la unión al ligando, la dimerización, la unión de los correguladores y la activación transcripcional. Se ha observado que este dominio contiene una región de trans-activación AF-2 que es

dependiente de ligando y que aparte de la capacidad esencial para el reconocimiento de la hormona, tiene una marcada actividad en la dimerización del receptor, la translocación nuclear, la unión a proteínas de choque térmico y la interacción con coactivadores, asegurando por lo tanto la especificidad y selectividad de la respuesta fisiológica. El LBD funciona como un interruptor molecular que tras su unión al ligando el receptor cambia a un estado transcripcionalmente activo [117], [119]–[122] Fig.12.

El receptor de glucocorticoides se encuentra normalmente en el citoplasma de las células como un complejo hetero-oligomérico de proteínas, las chaperonas o proteínas de choque térmico (hsp) (hsp90, hsp70 y hsp50) y las inmunofilinas (FKBP5, Cyp44, PP5) que se unen al receptor y lo mantienen retenido e inactivo en el citoplasma, cubriendo los sitios del receptor necesarios para su translocación al núcleo [123].

Con el fin de estudiar la relevancia del GR a nivel fisiológico se han desarrollado dos tipos de ratones transgénicos, que han resultado presentar consecuencias letales en el 90% de los casos al momento de su nacimiento. Así, en el *knockout* total del gen GR (GRKO) se observan efectos mínimos sobre el desarrollo embrionario, pero sin embargo ocasiona letalidad perinatal como resultado de atelectasia de los pulmones [124]. Se ha descrito que en los ratones GRKO los genes diana de los glucocorticoides presentan resistencia a la inducción por dexametasona. Mientras que los glucocorticoides disminuyen la expresión de la CBG, en ratones GRKO esta proteína se encuentra marcadamente incrementada. También en estos ratones GRKO los niveles plasmáticos de corticosterona y ACTH están incrementados lo que indica una regulación a través del eje HHA alterada. [125].

Debido a que los ratones GRKO han resultado inviables para estudiar las funciones del GR en la etapa adulta, se han generado mutaciones más puntuales en el gen de GR que limitan el efecto de la mutación a un tejido específico o a un tipo celular específico, lo que posibilita el estudio del animal transgénico en la etapa adulta. Los ratones denominados GRdim presentan una mutación puntual A458T en un dedo de zinc del receptor que suprime la capacidad del receptor para homodimerizar y poder unirse a las secuencias de DNA[126]. Sorprendentemente los ratones homocigotos para esta mutación sobreviven permitiendo el estudio *in vivo* de los mecanismos de acción a nivel génico que sean independientes de la formación de homodimeros de GR (trans-activación). Mientras que la trans-represión que no necesita de la formación de homodimeros puesto la unión al DNA se realiza a través del GR monomérico junto con factores de transcripción permanece intacta [124], [127].

Además de las acciones ejercidas por los glucocorticoides modulando la expresión génica a través del GR, se observan respuestas que por la rapidez en que aparecen no pueden implicar un proceso de transcripción y traducción[128]. Se demostró por primera vez la

existencia de un receptor de membrana (mGR) en neuronas de anfibios y posteriormente en células de linfoma y células mononucleares periféricas humanas [129]–[131]. Existen evidencias que apoyan la idea de que este receptor no es simplemente una fracción del GR que se transporta a la superficie celular, sino que es un producto de splicing alternativo o uso alternativo de promotores de forma que el mismo gen codificaría tanto para la versión citoplasmática como para la asociada a membrana [132].

3.2. EL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES

Además del GR, se conoce que las acciones de los glucocorticoides son también mediadas a través del MR también llamado *Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 2* (NR3C2), al cual se unen con mayor afinidad que al GR [133]. El MR es el único entre los receptores de esteroides en tener dos ligandos fisiológicos, aldosterona y cortisol (corticosterona en roedores). Puesto que el cortisol se une al MR con una afinidad equivalente a la de la aldosterona pero este circula a concentraciones 100 veces mayores a las de aldosterona, en condiciones fisiológicas normales el acceso de la aldosterona al MR estaría impedido si no fuera por la presencia de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 (11 β HSD2) en las células diana de la aldosterona. La 11 β HSD2 metaboliza el cortisol en cortisona que en contraste con el cortisol es incapaz de unirse o activar el MR [113], [134]–[136].

Sin embargo, se ha observado que el MR también se expresa en una amplia variedad de tejidos, donde la expresión de la 11 β HSD2 es baja o inclusive no hay expresión y en consecuencia la unión al cortisol se ve favorecida, sugiriendo la existencia de funciones de los glucocorticoides a través de MR no del todo conocidas [134]. El reciente descubrimiento de la expresión de MR en el tejido adiposo, y su papel en la diferenciación y función de los adipocitos, plantea la posibilidad de que la activación MR por glucocorticoides podría desempeñar un papel directo en el desarrollo de síndrome metabólico. Así, Caprio et al [137] demostraron que la exposición crónica de células 3T3-L1 a aldosterona inducía activación de factores de transcripción adipogénica. Sin embargo, teniendo en cuenta la poca expresión de la 11 β HSD2 en los adipocitos y de la prevalencia de los corticosteroides circulantes en el plasma, el efecto pro-adipogénico de la aldosterona *in vivo* es poco probable que sea fisiológicamente relevante. Pero, debido a la ocupación del MR por los glucocorticoides *in vivo*, el MR podría desempeñar un papel importante en la mediación de la diferenciación de los adipocitos inducida por glucocorticoides [137], [138]. Estas evidencias sugieren que la acción de glucocorticoides podría ser ejercida principalmente a través de MR en los adipocitos, aunque la vía MR-glucocorticoides en el tejido adiposo no ha sido completamente dilucidada [139]. En un estudio reciente, el

bloqueo de GR y MR por el antagonista CORT118335 en ratones machos y hembras bloqueó la expansión del tejido adiposo confirmando que ambos receptores juegan un papel importante en la función del tejido adiposo [140].

3.3. ACCIONES GENÓMICAS Y NO GENÓMICAS DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides regulan numerosos procesos fisiológicos, como la homeostasis de la glucosa, el metabolismo lipídico y proteico, los procesos anti-inflamatorios e inmunosupresores. El modelo clásico que explica el mecanismo de acción de los glucocorticoides se basa en que una vez la hormona se une al GR el complejo se transloca hacia al núcleo donde interactúa con los elementos de respuesta de glucocorticoides (GRE's) situados en las regiones reguladoras de los genes diana, regulando así la transcripción de estos genes. El efecto de los glucocorticoides puede ser de inducción o represión de la transcripción. La expresión de GR es prácticamente ubicua pero el patrón de genes regulados en cada tejido es específico de este [141]. Los genes diana de los glucocorticoides pueden comprender entre un 10% a un 20% del genoma humano [21]. Además de acciones genómicas, los glucocorticoides también pueden realizar sus efectos a través de mecanismos que no incluyen mecanismos de regulación génica [142].

Las acciones genómicas, que fueron las primeras en ser descritas, son las que están involucradas en la mayoría de los efectos regulados por los glucocorticoides [143]. La formación de homodímeros GR-GR es uno de los eventos clave en el mecanismo de trans-activación, o dicho de otra manera, en el mecanismo de acción del GR como activador de la transcripción [144]. Los principales genes controlados por el proceso de trans-activación están involucrados en la regulación del metabolismo intermediario, incrementando la gluconeogénesis y la movilización de los aminoácidos y ácidos grasos. De hecho una manera de estudiar la eficacia de la trans-activación es medir tirosina aminotransferasa (TAT) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) dos enzimas gluconeogénicas dianas de los glucocorticoides [145]. Dentro de los mecanismos genómicos también existe la trans-represión, es decir que la acción de los glucocorticoides en esos genes inhibe su transcripción, en este caso el GR puede actuar además como monómero. La trans-represión es el principal mecanismo por el cual los glucocorticoides ejercen sus efectos antiinflamatorios, inhibiendo por ejemplo los efectos proinflamatorios promovidos por NF κ B o AP-1 [117], [119], [131], [146].

Además, en ciertos genes el GR no se une directamente al DNA para ejercer su efecto, sino que es reclutado por factores de transcripción unidos a un complejo regulador,

comportándose como un regulador de co-ligando-inducible que emplea interacciones proteína-proteína para ejercer su efecto. De este tipo de regulación de la transcripción por parte de los glucocorticoides puede resultar tanto en una activación como una inhibición de la expresión génica [119], [132], [141], [147] Fig. 13.

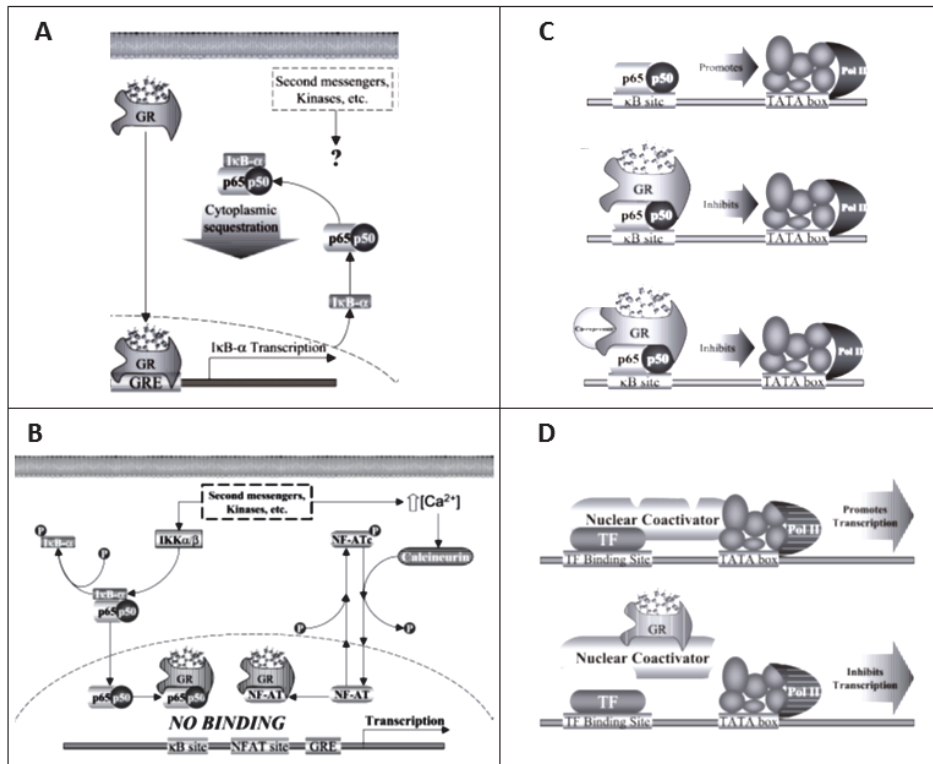


Fig. 13. Mecanismo de acción de los glucocorticoides al ADN inhibiendo la transcripción, D) el complejo glucocorticoides-GR y los glucocorticoides: A) El glucocorticoides se une al GR y este complejo se une a las secuencias GRE del ADN activando la transcripción, B) el complejo glucocorticoides-GR no se une al ADN sino que se une a factores reguladores de la transcripción inhibiendo su unión al ADN, C) el complejo glucocorticoides-GR no se une al ADN sino que se une a factores activadores de la transcripción y interactúa con factores de transcripción compitiendo con sus coactivadores nucleares. Adaptada de [147]

Las respuestas que tienen lugar mediante un mecanismo de transcripción y traducción conllevan un cierto tiempo (horas) antes de poder observar sus efectos. Algunos de los efectos observados en respuesta a los glucocorticoides son demasiado rápidos para implicar una respuesta genómica. De forma que se ha definido la vía no genómica como mecanismo de acción de los glucocorticoides para aquellos efectos de acción rápida los cuales ocurren en segundos o minutos y donde su acción es independientemente del GR como factor de transcripción [130], [143], [148].

La clasificación de Mannheim en relación a los mecanismos de acción rápida no genómicos de los glucocorticoides incluye dos categorías principales. Por un lado los efectos directos de los glucocorticoides y por otro los efectos indirectos donde los glucocorticoides inducen la respuesta rápida a través de un agonista [149].

La activación no genómica de los glucocorticoides se puede dar por tres diferentes vías o mecanismos. Un primer mecanismo involucra la acción directa de altas concentraciones de glucocorticoides, independientemente de la unión a su receptor, a través de su interacción con membranas celulares. Ejemplos del mismo son la modulación del transporte de cationes a través de la membrana plasmática o el incremento en la filtración de protones en la membrana mitocondrial, que lleva a una disminución en la producción de ATP. Estas acciones en las células del sistema inmune contribuirían a los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de los glucocorticoides [130], [148], [150].

Un segundo mecanismo involucra la unión de los glucocorticoides a un receptor específico de membrana (mGR). Como se ha mencionado anteriormente la existencia de ese receptor se ha demostrado en neuronas de anfibios, y en células de linfoma y mononucleares periféricas humanas. Parece ser que el mGR es una variante transcripcional del GR citoplasmático, de forma que el mismo gen codificaría tanto para el GR citoplasmático como para el GR asociado a la membrana. Sin embargo, a pesar de que se ha descrito todavía no se ha podido asociar a este ninguna vía de señalización específica [130], [148], [150], [151].

Por último, se han descrito algunos efectos no genómicos asociados al propio GR. Por ejemplo, se ha documentado una interacción directa entre el GR y JNK, explicando al menos en parte el efecto rápido (no genómico) de los glucocorticoides sobre esta vía de señalización. También, se ha encontrado en linfocitos T que una fracción del GR en ausencia de ligando se encuentra asociado al receptor TCR (T cell receptor) implicado en el reconocimiento de antígenos. La unión de los glucocorticoides al GR produce la disociación de éste con el TCR, inhibiendo la señalización del mismo. Finalmente, se ha descrito que el GR, además de migrar al núcleo en presencia de ligando, puede también translocar a la mitocondria. Aparentemente esta translocación podría tener una función relevante en la apoptosis mediada por glucocorticoides [130], [148], [150]–[153].

La administración farmacológica de glucocorticoides como antiinflamatorios acarrea el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico. Así, desde un punto de vista clínico/farmacológico, se acepta que los genes regulados por el mecanismo de transactivación están asociados a los efectos metabólicos de los glucocorticoides, es decir los clínicamente considerados efectos adversos indeseables, mientras que los genes regulados por trans-represión se asocian a efectos antiinflamatorios e inmunosupresores en este caso

asociados a efectos benéficos [154]. Sin embargo, los glucocorticoides a través de la transactivación génica también inducen la expresión de proteínas antiinflamatorias, tales como la anexina 1, MKP-1 y GILZ [155]–[157]. Además los glucocorticoides modulan efectos no genómicos específicos en los que interviene el GR que interactuando con miembros de la familia MAPK modifica su actividad. Finalmente se han descrito los efectos no genómicos inespecíficos que son múltiples y no son uniformes, y son GR independiente y son mediados por interacciones de los glucocorticoides a nivel de membrana la plasmática [158].

4. BIODISPONIBILIDAD DE LOS GLUCOCORTICOIDES

La biodisponibilidad de los glucocorticoides, es decir la cantidad efectiva de glucocorticoide a nivel de célula diana que es capaz de unirse al receptor y producir el efecto fisiológico correspondiente, depende de: a) su síntesis en la glándula adreanal bajo control del eje HHA, b) de la capacidad y la afinidad de su proteína transportadora la *Corticosteroid Binding Globulin* (CBG), c) de la síntesis neta de glucocorticoide intracelular resultante de la actividad de las enzimas 11 β hidroxí-esteroide deshidrogenasa de tipo 1 y 2 (11 β HSD1 y 11 β HSD2) y d) finalmente de la afinidad y capacidad de unión al receptor.

4.1. LA TEORÍA DE LA HORMONA LIBRE

Las hormonas liposolubles, como los glucocorticoides, circulan en plasma mayoritariamente unidas a proteínas plasmáticas quedando sólo una pequeña fracción, alrededor de un 5-15%, que circula libre. Existen proteínas que unen de manera específica estas hormonas con alta afinidad y baja capacidad, como la CBG en el caso de los glucocorticoides. Una pequeña parte de la hormona también se une de forma inespecífica a la albumina la cual posee alta capacidad pero baja afinidad de unión. Se postuló la "hipótesis de la hormona libre" que promulga que sólo la fracción de hormona (glucocorticoide) que circula libre en sangre es fisiológicamente activa y por tanto la determinación de esta fracción *in vitro* constituye un indicador fiable del efecto hormonal *in vivo* [159]. La hipótesis se basa en observaciones donde se encuentra una amplia correlación entre el estado endocrino y las concentraciones de hormona libre medidos en el suero por lo que esta teoría ha sido ampliamente aceptada por la comunidad científica. Sin embargo, en los últimos años se han encontrado algunas evidencias que ponen en entredicho la total validez de la hipótesis otorgando un posible papel importante a la hormona ligada a la proteína transportadora [160]. Así, la proteína transportadora y

concretamente la CBG, no tendría sólo un papel pasivo de transporte de glucocorticoide sino que estaría implicada de forma más activa en la respuesta tisular al esteroide [161]–[164]

4.2. LA CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN (CBG)

La Corticosteroid Binding Globulin (CBG) es la principal proteína de transporte de glucocorticoides en la sangre de casi todas las especies de vertebrados [165], [166]. En humanos el 80-90% del cortisol circulante está unido a la CBG. La fracción restante se distribuye más uniformemente entre la albúmina y el pool de esteroides "libre" que se asume generalmente es la parte biológicamente activa. La progesterona también se une a la CBG con afinidad relativamente alta [165]. La CBG es una glicoproteína monomérica con un único sitio de unión a esteroides por molécula y se satura cuando los niveles de cortisol en plasma están por encima de 400-500 nM. La CBG es sintetizada principalmente en el hígado y secretada en sangre. Se ha descrito una ligera variación de los niveles en plasma de CBG en relación al ciclo circadiano y que fluctúan en oposición a las variaciones circadianas en los niveles de glucocorticoides [167]. La CBG también es una proteína de fase aguda que puede ser liberada desde el hígado en respuesta a un cuadro de estrés agudo [163], [166].

La existencia del CBG se conoce desde 1956 y se purificó a finales de 1960 por varios grupos independientes, a partir de muestras de sangre humana y de rata [162]. Más recientemente a la CBG se le denominó SerpinA6 debido a la similitud de secuencia con otras serpinas. El gen *SERPINA6* ha sido clonado y caracterizado en 20 especies según la base de datos Ensembl (www.ensembl.org).

En humanos el gen de la CBG, está compuesto de 5 exones y se encuentra en el brazo largo del cromosoma 14, en la región q32.1 y es parte de un grupo de 11 genes que pertenecen a la superfamilia de la Serpinas de clase A [166]. Las Serpinas son un grupo de proteínas altamente conservadas capaces de inhibir proteasas, concretamente las serina proteasas, tal como lo indica su acrónimo: inhibidores de las proteasas de serina y substratos. El gen de la CBG (*SERPINA6*), se deriva probablemente de un ancestro común. La dirección de transcripción de los genes, en que se agrupan las Serpinas, se invierte de un subconjunto a otro sugiriendo que derivan de un ancestro común por un proceso de duplicación inversa [168]. El hecho que la CBG se encuentre en una amplia variedad de especies y que su estructura esté altamente conservada apoya la idea de que la CBG cumple un papel fundamental en la regulación de los glucocorticoides [169]

Los miembros de la familia de las serpinas contienen un dominio funcional, que interactúa con una serina proteasa específica. El α 1-inhibidor de proteinasa (α 1-PI), la α 1-antiquimotripsina (α 1-ACT) y la *thyroxine binding globulin* (TBG) son las serpinas con más similitud a la CBG. Las enzimas diana de α 1-PI y α 1-ACT son la elastasa y la catepsina G, respectivamente, y ambas son producidas por neutrófilos activados. En base a este conocimiento se predijo que la CBG podría actuar como un sustrato para proteasas de serina en sitios de inflamación. Se ha descrito que la elastasa de neutrófilos rompe la molécula de CBG en una posición, que está estrechamente relacionada con el sitio de unión de la CBG al corticoide esto se traduce en una disminución dramática de la afinidad para el esteroide y por tanto su liberación [168]. También, se ha descrito la hidrólisis de la CBG por la elastasa en la superficie de los neutrófilos activados procedentes de pacientes con enfermedades inflamatorias agudas, como sepsis [161].

4.2.1. BIOSÍNTESIS DE LA CBG

La CBG es sintetizada mayoritariamente en el hígado y secretada al torrente circulatorio [166]. Como muchas otras proteínas plasmáticas de transporte, la CBG es producida por los hepatocitos como un péptido inmaduro, en este caso de 383aa que después de la escisión del péptido señal de 22 aminoácidos es secretado a la circulación. Las concentraciones fisiológicas de CBG están en el rango de 30 a 52 pg/ml [170]. Además, existe evidencia de la síntesis extra-hepática de CBG en varios tejidos que además son dianas de los glucocorticoides como: riñón, páncreas, placenta, corazón, sistema nervioso central, y tejido adiposo blanco [171]–[175]. También se ha descrito que la CBG puede interactuar directamente con las membranas plasmáticas de algunas células [176]. Debido a su tamaño, es improbable que la CBG pueda atravesar la barrera hematoencefálica, pero se ha encontrado que en humanos la CBG se expresa a nivel de sistema nervioso y en concreto en hipotálamo y líquido cefalorraquídeo [177], [178]. Por otro lado, en roedores también se ha descrito su presencia a nivel intra-neuronal sugiriendo un papel regulador del acceso de los glucocorticoides a sus receptores en el SNC [177]. La secuencia de cDNA del gen de la CBG localizado en los distintos tipos celulares del cerebro coincide con la del hígado, lo que confirma que las formas de CBG del hígado y del SNC son idénticas [179].

Aunque se ha detectado la expresión de CBG y la presencia de proteína en diversos tipos de celulares hoy en día no está claro su significado. La CBG detectada en un tejido extra hepático puede ser de producción endógena pero también puede proceder de la circulación sanguínea. La CBG podría ser captada por las células mediante la unión del complejo de CBG-glucocorticoide a un receptor de membrana de CBG y así ser

internalizado por endocitosis. Dentro de la célula, la CBG se excindiría para liberar el glucocorticoide provocando un aumento en los niveles de glucocorticoide libres disponibles para activar los receptores intracelulares. En la década de los años 80 del siglo XX se evidenció que la CBG se unía a la membrana plasmática y ello correlacionaba con un aumento de AMPc dentro de la célula [176]. Estos estudios se realizaron en una línea celular de cáncer de mama, MCF-7 y en células trofoblásticas a partir de embriones humanos [180], [181]. A pesar de estos hallazgos, el receptor CBG nunca ha sido clonado o caracterizado hasta la fecha, solo existen pruebas indirectas *in vitro* de su existencia, así como tampoco hay evidencia de la internalización de la CBG en las células.

4.2.2. ESTRUCTURA DE LA CBG

La CBG es una glicoproteína monomérica con un peso molecular de 50-60 kDa. El polipéptido consta de 383 aminoácidos y contiene sólo un sitio de unión a esteroides por molécula [166]. La composición de aminoácidos de CBG indica que la molécula es rica en metionina y contiene unos pocos residuos de cisteína. También contiene una gran cantidad de aminoácidos con carga negativa que son en parte responsables de su punto isoeléctrico (PI) ácido y puede ser acentuado por la presencia de carbohidratos [182].

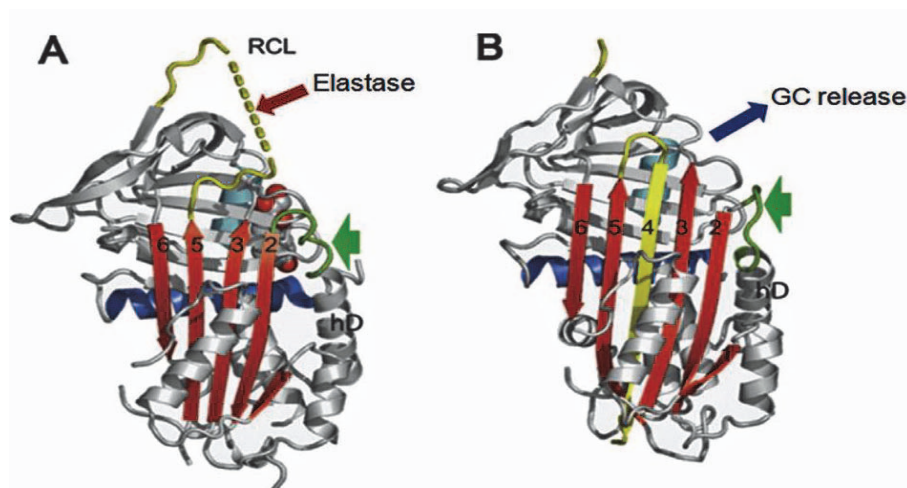


Fig. 14. Estructura de la CBG: (A) CBG en su estado “S” exponiendo el RCL, con un bucle de conexión en la parte superior de la hélice D (verde). En este estado la CBG posee alta afinidad por el cortisol. (B) CBG en su estado “R” mostrando el RCL separado el cual se muestra totalmente insertado en la hoja β seguido por un relajamiento parcial de la hélice D. En este estado tiene baja capacidad de unión a la hormona. Adaptado de [190].

La CBG plasmática es una proteína altamente glicosilada, con 30% de su masa representada por cadenas de oligosacáridos N-ligados [168]. En los vertebrados la CBG contiene entre un 20% y 30% de carbohidratos y esta composición puede variar según las especies pero también durante el desarrollo fetal [183]. La presencia de hidratos de

carbono influye en la vida media de las proteínas del plasma, así la eliminación de residuos de ácido siálico por neuramidasa aumenta claramente la eliminación de la CBG por el receptor de asialo-glicoproteínas del hígado. Además, las variaciones en la composición de hidratos de carbono pueden modificar la interacción entre la CBG y sus dianas en las membranas celulares, y de ese modo pueden influir en cualquier respuesta biológica [182].

Una de las características distintivas de las serpinas es que se someten a reordenamientos conformacionales como parte de su función biológica. Las conformaciones adoptadas son altamente dependientes de si hay una zona de bucle expuesta, conocido como *reactive centre loop* (RCL) o si el dominio diana de la proteinasa está intacto. La disociación del segmento del RCL por proteasas generalmente causa una típica conformación de un estado de transición “estresado” a uno “relajado” (S→R) en la estructura de la proteína [161], [184]. Este cambio S→R en la CBG resulta en una disminución de nueve a diez veces su capacidad de unión para los corticosteroides, y como consecuencia un aumento de cuatro veces de cortisol libre. La CBG en estado S también se la denomina haCBG (CBG con alta afinidad al glucocorticoide) y en estado R se la denomina laCBG (CBG con baja afinidad para el glucocorticoide). Este mecanismo para la CBG ha sido demostrado *in vitro* e *in vivo* [185]–[188]. La transición S→R se encuentra asociada con un aumento en la termoestabilidad y es crucial para el mecanismo inhibitor que produce el complejo serpinaproteasa. [187], [189], [190] Fig. 14.

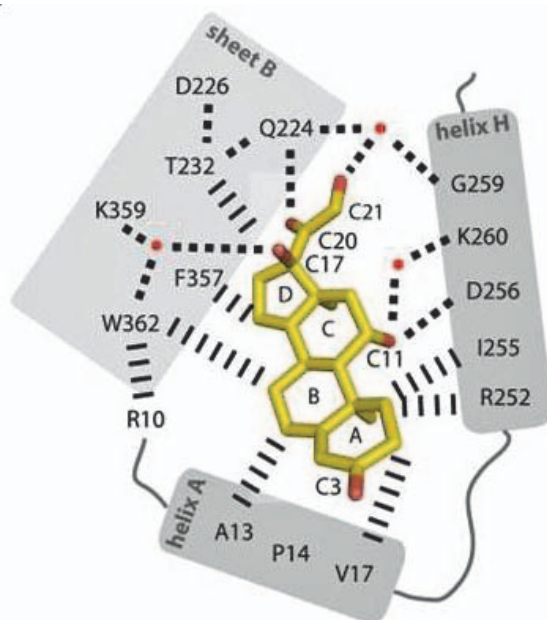


Fig. 15. Interacción de la CBG con el cortisol. Adaptado de [184]

Un mayor conocimiento de sobre las propiedades bioquímicas y moleculares de la CBG y su interacción con el cortisol ha sido posible hace apenas una década gracias a la expresión de la CBG de rata en bacterias, permitiendo su cristalización, definiendo la estructura y la topografía del sitio de unión a esteroides, así como un mecanismo plausible para explicar la unión y liberación del esteroide en condiciones homeostáticas normales o después de la proteólisis del RCL [168], [184]. Klieber et al [184], dilucidaron en la CBG de rata unas características remarcables del sitio de unión de los glucocorticoides a la CBG. Así, de los cinco átomos polares de la corticosterona, sólo los átomos de oxígeno unidos a los átomos de carbono C-11 y C-20 del esteroide interactúan directamente con los residuos de CBG, Fig.15. El oxígeno del carbonilo C-20 se une mediante puente de hidrogeno con la Gln 224 de la cadena S2b y esto parece ser fundamental para que pueda existir una interacción de alta afinidad con el C-21 de los esteroides (los glucocorticoides y progesterona), ya que la sustitución de Gln 224 por una alanina en la CBG de rata, da como resultado la pérdida completa de la unión a los esteroides [191].

Por otra parte, el hidroxilo en C-11 de cortisol es reconocido por Asp256 de la hélice H y esto probablemente tenga relevancia biológica ya que este grupo hidroxilo es la diferencia entre el glucocorticoide biológicamente activo (cortisol y corticosterona) y el glucocorticoide inactivo (cortisona y desoxicorticosterona) los cuales no se unen a la CBG. Cuando se comparan las secuencias de CBG de diferentes especies, la lisina en la posición 359 en humanos, cambia a una histidina en la rata CBG pudiendo estar relacionado con las afinidades relativas de la CBG para el cortisol o la corticosterona en ambas especies[184].

4.2.3 FISIOLÓGÍA DE LA CBG

En el plasma la CBG tiene la capacidad de unir a los glucocorticoides y la progesterona con alta afinidad. Aunque otros esteroides pueden unirse a CBG pudiendo desplazar el cortisol ya unido a la CBG, normalmente están presentes en concentraciones mucho más bajas y/o tienen afinidades de unión mucho menores que el cortisol. La única excepción a ello es la progesterona que tiene una mayor tasa de asociación con la CBG que el cortisol con una constante de equilibrio del complejo progesterona-CBG similar a la del cortisol-CBG. A pesar de ello, sólo al final del embarazo es probable que haya suficiente progesterona circulante para causar una perturbación significativa en el equilibrio CBG-cortisol [191], [192].

En los mamíferos, la expresión de CBG en el hígado fetal va aumentando desde mediados hasta finales de la gestación y con una disminución poco antes del nacimiento o inmediatamente después del nacimiento. Esto es seguido por un aumento en la producción

de CBG por el hígado durante las primeras semanas o meses de vida postnatal, dependiendo de la especie [183]. La consecuencia fisiológica de este patrón bifásico de biosíntesis hepática de la CBG queda por determinar, pero se interpreta que su función sería controlar las cantidades de glucocorticoides que están disponibles para ciertos tejidos durante el desarrollo fetal, como el pulmón cuya maduración es dependiente de glucocorticoides, siendo crítica para la supervivencia de los recién nacidos [161]. En ratones el GR es esencial para mantener un nivel basal de la expresión de CBG en el hígado, predominantemente alrededor del nacimiento, y es requerido para inhibición del gen de la CBG inducida por la dexametasona en ratones adultos [193].

La fluctuación diaria de la CBG sigue un ritmo circadiano presentando los niveles más altos al comienzo de la tarde y menores a las primeras horas de la mañana. Este es un patrón opuesto a la variación circadiana de los niveles de los glucocorticoides en plasma, acentuando así el perfil de cortisol libre. La CBG también actúa como una proteína de fase aguda que puede ser liberada desde el hígado en respuesta a un estrés agudo [194].

La unión de los glucocorticoides a la CBG es altamente sensible a la temperatura, pero no a los cambios fisiológicos de pH. En un rango de temperatura de 35-42°C la CBG libera el glucocorticoide. Por otro lado, la afinidad del glucocorticoide por la albumina decrece con la disminución del pH que es inherente a cambios de temperatura. Este mecanismo se entiende como una respuesta fisiológica a la fiebre que daría como resultado una mayor cantidad de glucocorticoide libre [163], [186].

Los niveles plasmáticos de CBG disminuyen durante la exposición prolongada a los glucocorticoides endógenos, como se observa en el síndrome de Cushing [191]. Los valores circulantes de CBG también son sensibles a algunos cambios hormonales; así, las concentraciones de CBG son incrementadas por los estrógenos y disminuidos por los glucocorticoides [191]. En humanos, Fernández et al [195] hallaron que la insulina ejerce una acción inhibitoria en la secreción hepática de CBG. Así, una dieta alta en carbohidratos que induce un aumento de la respuesta insulinémica disminuiría los niveles de CBG circulantes [195].

Los niveles basales de CBG son sexo dependientes tanto en roedores como en humanos con unos niveles más elevados en hembras [196]–[199]. De hecho el gen *SERPINA6* es considerado sexualmente dimórfico, y este dimorfismo sexual es dependiente de las secreciones pulsátiles de la GH en un complejo mecanismo que involucra el eje HHA, regulado por la somatostatina (GHIH) y la producción hepática de la CBG [200].

4.2.4. POLIMORFISMOS DE LA CBG Y CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS

La CBG humana está codificado por un solo gen, que consta de cinco exones (exones I-V) distribuidas en aproximadamente 19 kb de ADN genómico [201] como se muestra en la Fig.16. La secuencia codificante está contenida en los exones II-V. Se han identificado varios mutantes de la CBG que afectan diferencialmente a la proteína. En unos casos la mutación se traduce en una disminución de la síntesis y secreción de CBG, en otros casos resulta en una disminución de la capacidad y afinidad de unión y por último también se ha visto que la proteína mutada puede presentar una resistencia al clivaje proteolítico [202]. *In*

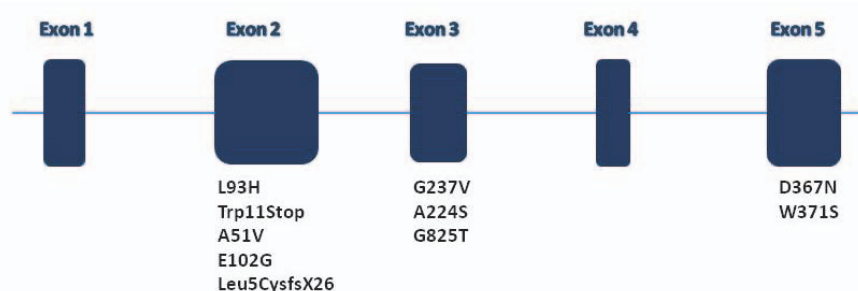


Fig. 16. Representación grafica del gen de la CBG señalando los exones donde se han descrito mutaciones y su ubicación.

in vitro mediante técnicas de inmunoensayo también se ha observado un reconocimiento anormal del epítipo [203]. Si bien la deficiencia de la CBG no es letal, si que se asocia a ciertos síntomas como la fatiga, el dolor crónico y la hipotensión [164], [204]–[206]. En general los individuos que presentan estas mutaciones presentan unos niveles de cortisol total circulante disminuido con una respuesta alterada del eje HHA [202]. Un resumen de las diferentes mutaciones de la CBG en humanos y sus alteraciones fisiológicas se muestra en la Tabla 1.

En ratas BioBreeding (BB) que desarrollan diabetes de tipo 1 autoinmunitaria de forma espontánea, se ha descrito una variante de la CBG con una disminución del 50% en su afinidad por la corticosterona y que presentan una respuesta a los glucocorticoides alterada. Sin embargo, el tratamiento con glucocorticoides a ratas BB retarda la aparición de la diabetes [207], a pesar de estas observaciones en humanos hasta la fecha no se ha encontrado ninguna relación entre la diabetes tipo 1 y la baja afinidad de la CBG por el corticoide como en las ratas BB.

Tabla 1. Anormalidades en la fisiología de la CBG debido a las mutaciones genéticas.

Afectación de la CBG	Mutación de CBG	Síntomas clínicos	Referencia
Pérdida total de síntesis	Trp11stop (CBG Adelaide)	fatiga y dolor crónico, hipotensión y obesidad	[208],[209]
Pérdida parcial de síntesis	A51V Leu5CysfsX26 (CBG Santiago) I48N,P246Q	no conocidos fatiga y dolor crónico no conocidos	[210] [211] [206]
Disminución de la capacidad y/o afinidad de unión al cortisol	E102G L93H (CBG Leuven)	--- ---	[210] [216],[217],[214]
	D367N (CBG Lyon) H14Q,H14R, H89Y,I279F,I179V,R260L	fatiga, dolor crónico, hipotensión, depression y obesidad --- ---	[215],[216] [206] [206]
Pérdida total de la capacidad y/o afinidad de unión al cortisol	G237V W371S (CBG Athens)	hipotensión y fatiga obesidad	[217] [218]
Resistencia al clivaje proteolítico	T342P I179V,I279F	no conocidos no conocidos	[219] [206]
Pérdida de reconocimiento del epítopo por inmunoensayo	A256T	no conocidos	[206]
Aumento de reconocimiento del epítopo por inmunoensayo	T349A	no conocidos	[206]

--- datos no disponibles

En el 2006 Petersen et al [220] generaron el primer ratón *ko* para el gen de la CBG (*cbg*^{-/-}). En sus experimentos observaron que había una mayor eliminación de corticosterona en los ratones deficientes en CBG resultando unos niveles de corticosterona total disminuidos. Sin embargo, los niveles de corticosterona libre estaban incrementados en los ratones *cbg*^{-/-} hasta diez veces en comparación con los ratones *cbg*^{+/+} mientras que los de ACTH solo lo estaban unas tres veces. Además los ratones *cbg*^{-/-} no mostraban incrementada la expresión de genes diana de los glucocorticoides, como es el caso de la PEPCK en el ayuno. En general, las alteraciones que presenta este modelo sacan a la luz que la falta de CBG se traduce con una baja sensibilidad al incremento de glucocorticoides libres que están presentes en los ratones *cbg*^{-/-} [220]. Con posterioridad Richard et al [221] crearon otro modelo *cbg*^{-/-} con el objetivo de estudiar la respuesta de los ratones *cbg*^{-/-} frente al estrés. En este modelo se observó principalmente que había una diferencia frente al modelo de Petersen et al [220] en cuanto a los niveles de glucocorticoides libres. En este modelo solo se hicieron estudios a nivel de estrés psicológico encontrándose una respuesta del eje HHA alterada en los ratones *cbg*^{-/-} [221].

Desde que se descubrió que la CBG podía ser sintetizada en múltiples tejidos [171]–[175] y la existencia de un posible receptor, aun no clonado, [180], [222], se ha desarrollado un interés cada vez más acentuado en un posible papel de la CBG en la modulación de la respuesta a los glucocorticoides. En 1980 se realizaron los primeros trabajos sobre la

implicación de la CBG en la respuesta de los glucocorticoides en procesos inflamatorios. En ratas se observó que los niveles de la CBG disminuían cuando se sometían a un agente inflamatorio, catalogando la CBG como una proteína negativa de fase aguda [223]. Posteriormente, Hammond y colaboradores en el año 1987 [166] demostraron *in vitro* e *in vivo*, que una serina proteasa escindía la CBG por el sitio de unión al glucocorticoide. Así, en el sitio de inflamación la elastasa de leucocitos activados interactuaría con la CBG liberando el glucocorticoide en el lugar preciso durante la respuesta inflamatoria. Esta misma respuesta la observaron en células obtenidas de pacientes con sepsis concluyendo que la CBG funciona como sustrato de la elastasa secretada por los neutrófilos siendo esto un proceso fundamental en la liberación de los glucocorticoides por parte de la CBG en los sitios precisos de inflamación [161], [166]. La interleucina 6 (IL-6) es una citocina que posee una función pleiotropica: tiene efectos pro y antiinflamatorios. Se ha demostrado que la IL-6 inhibe la síntesis hepática de CBG *in vitro* en células de hepatoma humano (HepG2), e *in vivo* en pacientes con shock séptico y politraumatismo así como en voluntarios sanos [224], [225].

En la inflamación aguda el efecto combinado del cambio conformacional de la CBG (haCBG-laCBG), la disminución de la síntesis de CBG y el incremento de la secreción de cortisol, contribuye a aumentar el cortisol libre. No obstante, aunque existan niveles de cortisol libre solo una pequeña parte es la que alcanza a los sitios de inflamación, teniendo aquí una gran relevancia los estados haCBG \rightarrow laCBG de la CBG como proteína transportadora siendo capaz de distribuir el cortisol en los sitios de inflamación. De forma que, la disminución de la haCBG y consecuentemente la pérdida de su función como reservorio de glucocorticoides, podría resultar en un fallo en el suministro de los glucocorticoides en los sitios de inflamación, perpetuando de esta manera el proceso inflamatorio transformándose en una fase inflamatoria crónica [225]. Esto se ha observado recientemente en pacientes con shock séptico donde se encuentra una mayor mortalidad cuando existe una mayor disminución de haCBG [188].

Estudios realizados en individuos que padecían pancreatitis, una enfermedad inflamatoria, se observaron niveles de CBG disminuidos que se relacionaban con la severidad de la enfermedad indicando la que la CBG podría ser un buen marcador en el diagnóstico de la inflamación durante la pancreatitis aguda necrotizante [226], [227].

En su modelo *cbg*^{-/-} Petersen et al y con el objetivo de estudiar la regulación de la CBG en el proceso inflamatorio, administraron intraperitonealmente LPS y observaron que los animales *cbg*^{-/-} presentaban una alta susceptibilidad a padecer shock séptico con una tasa de mortalidad más elevada a las 48 horas respecto de los animales *cbg*^{+/+}. Esta mortalidad se correlacionaba con el incremento de varios marcadores inflamatorios analizados en plasma y pulmón [220].

En cuanto a la regulación del metabolismo energético por parte de los glucocorticoides existen estudios en animales que sugieren que los niveles de CBG en plasma son mejor predictor de la composición corporal que los de corticosterona [169]. Así, se ha descrito que la capacidad de unión de la CBG al glucocorticoide correlaciona negativamente con la masa muscular y positivamente con la masa de tejido adiposo, a diferencia de los niveles de corticosterona que no muestran ninguna correlación significativa [169]. Estudios realizados en humanos muestran que los niveles circulantes de CBG son un marcador de la secreción de insulina [195], [228], [229]. Además, los niveles plasmáticos de CBG en humanos correlacionan positivamente con la adiponectina en ambos sexos [199], así como, negativamente con el índice de masa corporal (IMC) [229].

Algunos de los polimorfismos de la CBG descritos en humanos se caracterizan por presentar obesidad o sobrepeso (tabla 1) [208], [209], [218], sobretudo cuanto más afectada está su síntesis o su afinidad por el cortisol. Existe pues una relación entre la funcionalidad de la CBG y el correcto control del metabolismo energético por parte de los glucocorticoides. Por otro lado, Petersen et al [220] alimentaron *ad libitum* ratones *cbg*^{-/-} y *cbg*^{+/+} con dieta control o con dieta hiperlipídica (26% de la energía en forma de lípidos) durante seis semanas encontrando solo una tendencia a aumentar el peso corporal en el grupo *cbg*^{-/-} respecto a los *cbg*^{+/+} [220]. Recientemente se ha descrito en pacientes con obesidad abdominal un menor clivaje de la CBG de forma que esta resistencia a la escisión de CBG puede obstaculizar la entrega de cortisol a tejidos inflamados y perpetuar la inflamación característica del estado obeso y del síndrome metabólico en general [230]

4.3. LA ENZIMA 11 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (11 β -HSD)

Desde el descubrimiento de la cortisona en la década de 1940 y su éxito temprano en el tratamiento de la artritis reumatoide, los glucocorticoides se han mantenido como el pilar de las terapias anti-inflamatorias. Sin embargo, la cortisona es intrínsecamente inerte y para ser eficaz requiere la conversión a su forma activa el cortisol a través de la enzima 11 β -HSD1 [231]. En algunos tejidos también se encuentra la isoforma 11 β HSD2 que se encarga en ese caso de la inactivación del glucocorticoide. [232] Fig.17.

Las dos isoformas de la 11 β -HSD están codificadas por genes distintos [232], [233] y tienen características cinéticas diferentes. Así, 11 β -HSD1 presenta baja afinidad por el substrato, es dependiente de NADPH y está principalmente expresada en el hígado y con niveles más modestos en los tejidos diana de los glucocorticoides, como el tejido adiposo y las células del sistema inmune. En contraste, la 11 β -HSD2 posee una alta afinidad por el

substrato, es dependiente de la NAD deshidrogenasa y se expresa principalmente en los tejidos diana de mineralocorticoides (riñón, colon, glándulas salivales) [234].

Los glucocorticoides endógenos difieren de la dexametasona (glucocorticoide sintético usado farmacológicamente) en un aspecto importante; la dexametasona no es inactivada por la enzima 11 β -HSD1 [235], mientras que los glucocorticoides naturales son sustratos para las 11 β -HSD siendo fundamentales para las acciones fisiológicas de los glucocorticoides [236].

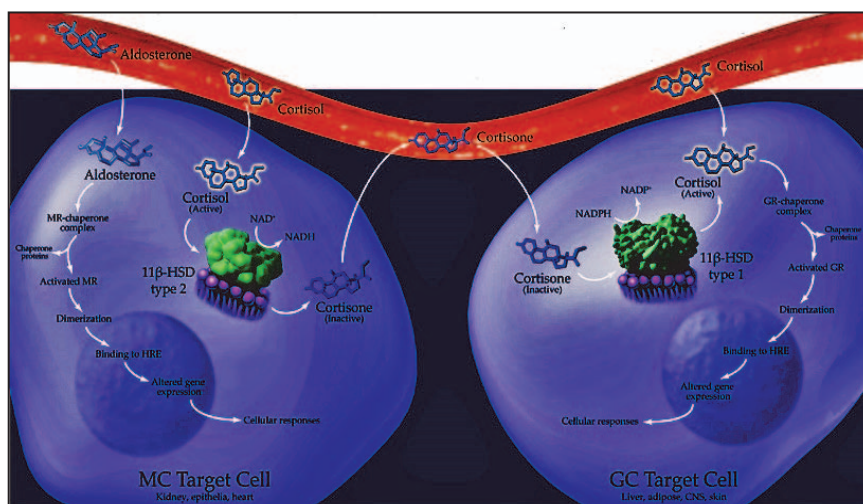


Fig. 17. Las dos isoformas de la enzima 11 β -HSD se localizan en lumen de la membrana del retículo endoplasmático. La isoforma 11 β -HSD-1 se expresa principalmente en los tejidos con acción glucocorticoide (hígado, tejido adiposo blanco, células sistema inmune) donde cataliza la conversión de la forma inactiva (cortisona) a activa (cortisol) favoreciendo la acción glucocorticoide. La 11 β -HSD-2 se expresa principalmente en tejidos diana de los mineralocorticosteroides, convirtiendo el el glucocorticoide activo (cortisol) a inactivo (cortisona), facilitando la acción mialcorticoide. Adaptada de <http://kailinlindsay.pairserver.com/the-11-%CE%B2-hsd-system/>

4.3.1. 11 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE TIPO 1 (11 β -HSD1)

La acción de las 11 β -HSDs se centra en el sitio C11 del glucocorticoide [237]. Un grupo hidroxilo en esta posición indica una hormona activa, mientras que cuando hay un grupo ceto la hormona es inactiva [238]. La enzima 11 β -HSD1 posee actividad bidireccional *in vitro* [239], lo cual quiere decir que tiene capacidad oxoreductasa; activando los glucocorticoides y actividad deshidrogenasa desactivandolos. Sin embargo, en la mayoría de las células predomina la actividad oxoreductasa, debido a que presenta una alta afinidad para la cortisona ($K_m = 0.3\mu M$), comparado con la que presenta para el cortisol ($K_m = 2.1\mu M$). La 11 β -HSD1 está anclada a la membrana del retículo endoplasmático (ER) con el dominio catalítico situado dentro del lumen del ER. Una alta concentración de NADPH dentro del lumen del ER, generada por la enzima hexosa-6-fosfato deshidrogenasa

(H6PDH), se piensa que es la responsable de mantener la actividad de 11β -HSD1 en la dirección oxo-reductasa [240]. Fig. 18.

En trabajos realizados recientemente se ha demostrado que un incremento en la actividad de la 11β -HSD1 en el tejido adiposo de personas y ratones obesos, amplifica respuesta de los glucocorticoides en ese tejido diana [241]. Así, se ha observado que en ratones transgénicos en los que se ha incrementado la expresión de la enzima 11β -HSD1 en el tejido adiposo presentan un incremento en los niveles de corticosterona tisular con unos niveles inalterados de corticosterona en plasma. Este incremento de corticosterona específicamente a nivel de tejido, consecuencia de una elevada actividad de la 11β -HSD1, se traduce en un incremento de tejido adiposo visceral lo cual podría estar relacionado con la mayor densidad de receptores de glucocorticoides presentes en este tejido [242]. Ratones transgénicos que sobre-expresan la 11β -HSD1 sólo en hígado presentan una cierta resistencia a la insulina sin alteración de los depósitos de grasa en tejido adiposo, pero con hígado graso y dislipidemia. La síntesis incrementada de lípidos hepáticos se asoció a un aumento en los niveles de RNA del receptor hepático X alfa ($LXR\alpha$) y receptor de peroxisoma activado gamma ($PPAR\gamma$). Los autores concluyen que los niveles elevados de la 11β -HSD1 pueden estar relacionados con patologías específicas de hígado graso, resistencia a la insulina y síndrome hipertensivo sin obesidad como ocurre en humanos que padecen distrofia miotónica y posiblemente el síndrome de individuos normopeso metabólicamente obesos [243].

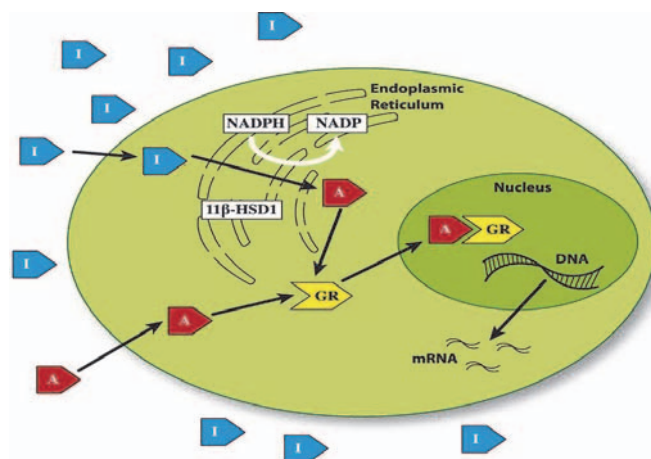


Fig. 18. Representación gráfica de la actividad de la 11β -HSD1. La forma inactiva de los glucocorticoides circula con poca capacidad de unión (azul) y es más elevada que la forma activa (rojo). La 11β -HSD1 actúa predominantemente como una reductasa dependiente de NADPH *in vivo* y se encuentra en el retículo endoplasmático (ER). La 11β -HSD1 convierte el glucocorticoide inactivo a la forma activa regulando la disponibilidad celular de glucocorticoide que va a unirse al receptor. Adaptado de [233].

En uno de los trabajos más recientes, Morgan et al [244] en experimentos realizados con ratones *KO* para 11 β -HSD1 genéricos o tejido específico (hígado y tejido adiposo) tratados con corticosterona y 11-dehidrocorticosterona demuestran que los glucocorticoides reactivados por la 11 β -HSD1 son los principales determinantes del síndrome de Cushing exógeno. Cuando se silencia el gen, los efectos secundarios metabólicos cushingoides asociados con el exceso de glucocorticoides mejoran, a pesar que sus concentraciones circulantes sean elevadas. Además, demuestran que la regeneración de glucocorticoides a nivel local en el tejido adiposo es determinante para las manifestaciones hepáticas. En conjunto, esto plantea la intrigante posibilidad de utilizar inhibidores selectivos de las 11 β -HSD1 como terapia adyuvante para limitar los efectos secundarios asociados con el exceso de glucocorticoides en el síndrome de Cushing endógeno y exógeno [244].

4.3.2. 11 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE TIPO 2 (11 β -HSD2)

Mientras la 11 β -HSD1 es principalmente expresada en los tejidos metabólicos como el hígado, tejido adiposo y musculo, la expresión de la 11 β -HSD2 es mas tejido-restrictiva siendo sobretodo expresada en los tejidos diana de los mineralocorticoides principalmente el riñón, la placenta y colon, aunque también está presente en los ovarios, testículos, próstata, glándulas salivares y sudoríparas y páncreas exocrino [232], [245], [246]. La 11 β -HSD2 es una enzima con actividad deshidrogenasa, dependiente de NAD [247] con la consecuente inactivación de los glucocorticoides [248].

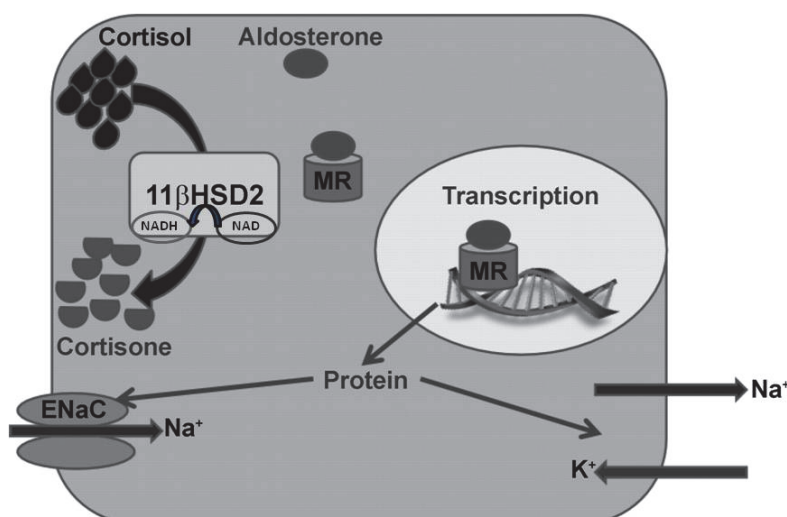


Fig. 19. Mecanismo por el cual la enzima 11 β -HSD2, previene la activación del receptor de mineralocorticoides (MR) por cortisol, permitiendo la unión de aldosterona y la posterior activación del mecanismo de transcripción. Adaptado de [252].

El hecho que la enzima 11 β -HSD2 inactive los glucocorticoides permite que la aldosterona, hormona que circula en concentraciones mucho más bajas que los glucocorticoides, pueda unirse al receptor de mineralocorticoides. En la ausencia de actividad la 11 β -HSD2, los glucocorticoides se unen al receptor de mineralocorticoides inadecuadamente ocasionando un exceso de actividad mineralocorticoide en los tejidos, principammente en el riñón [249]. Fig. 19.

La importancia fisiológica de la 11 β -HSD2 se pone en evidencia en patologías donde está ausente la actividad de la enzima, como es el caso de los pacientes con síndrome de exceso aparente de mineralocorticoides (Apparent Mineralocorticoid Excess, AME) [250], [251]. Estos pacientes presentan una mutación del gen *HSD11B2* que codifica para la 11 β -HSD2 [252]. También se describen casos de AME por consumo de regaliz que contiene ácido glicirretínico que inhibe la actividad de la 11 β -HSD2 [253], [254]. Puesto que los niveles de cortisol son casi 1000 veces superiores a los de aldosterona, en estos pacientes el cortisol satura rápidamente los MR determinando una activación exagerada de los mismos. En consecuencia los pacientes presentan hipertensión, hipocalcemia, retención de sodio, expansión de volumen extracelular y, con ello, ausencia de renina y aldosterona plasmáticas [255]. Recientemente, se ha observado que la inhibición de la 11 β -HSD2 en ratones provoca hipertensión, hipopotasemia, poliuria hipotónica, y profunda supresión de la actividad de la renina y de los niveles de aldosterona en plasma [256], síntomas típicos de los pacientes con AME. La 11 β -HSD2 también tiene un papel importante durante el desarrollo actuando como barrera para evitar al feto una sobreexposición a glucocorticoides maternos. Así, los glucocorticoides son catabolizados a nivel placentario y fetal por la 11 β -HSD2 siendo inactivados [232], [257], [258].

OBJETIVOS

Objetivos

Esta tesis se ha realizado en el grupo de investigación dirigido por la Dra. Montserrat Esteve y la Dra. María del Mar Grasa de la Universidad de Barcelona. Esta tesis se sitúa en los inicios de una nueva línea de investigación por parte del grupo que con un objetivo general de intentar esclarecer cuál es el papel de la *Corticosteroid Binding Globulin* (CBG) en la acción de los glucocorticoides. Al coincidir con una nueva línea de investigación, hubo todo un trabajo previo de puesta a punto de protocolos, así como de la colonia de ratones *Knockout*.

La CBG es la proteína transportadora de glucocorticoides sintetizada mayoritariamente por el hígado y secretada a la sangre donde actúa como reguladora del *pool* de glucocorticoide libre según la teoría de la “hormona libre”. Esta fracción de hormona libre es la que se considera activa dado que el bajo peso molecular y la naturaleza lipídica de las hormonas esteroideas, a cuyo grupo pertenecen los glucocorticoides, permitirían la entrada a los tejidos y al interior celular a través de difusión simple sin mayores dificultades.

Sin embargo, diferentes indicios permiten especular sobre posibles nuevas funciones de la CBG en tejidos distintos a la sangre. Por una parte, se ha hallado expresión minoritaria de CBG en tejidos extrahepáticos y receptores para CBG, este último caso en estudios antiguos no confirmados. Por otra parte, la CBG pertenece a la familia de *serin-proteases inhibitors*. Así, la enzima elastasa secretada por neutrófilos activados es capaz de hidrolizar la CBG y provocar la pérdida de afinidad por el glucocorticoide que transporta, interpretándose como una forma de liberar el glucocorticoide en el lugar preciso de la inflamación. Se ha postulado como función *in vivo* que la CBG puede actuar como sustrato “suicida” de elastases o proteasas implicadas en la inflamación, cuya regulación es de las funciones de los glucocorticoides, en el propio tejido.

Objetivos

Por todo ello, **el objetivo principal** de esta tesis ha sido el estudio de la expresión de CBG en tejidos extrahepáticos y cómo su deficiencia afecta a los diferentes procesos fisiológicos en los cuales los glucocorticoides presentan un papel relevante. Para consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- 1) Evaluar en tejido adiposo, donde los glucocorticoides ejercen funciones clave en el metabolismo energético y lipídico, la expresión de la CBG, su modulación y las consecuencias de su déficit.
- 2) Estudiar la posible expresión y modulación de la CBG en pulmón, dado que estudios previos en el ratón deficiente en CBG sometido a *shock* séptico identificaban el pulmón como uno de los tejidos más afectados. Por ello, para la consecución de este objetivo se utiliza una patología donde la inflamación pulmonar resulta ser la complicación más grave, como es la pancreatitis aguda.
- 3) Analizar la afectación de la síntesis endógena de glucocorticoides por el déficit de CBG, en el principal órgano responsable de su síntesis, la glándula adrenal, e investigar la posible expresión de CBG.
- 4) Caracterizar las consecuencias del déficit de CBG en hipocampo, la estructura cerebral donde se desencadena la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y donde los glucocorticoides regulan funciones fundamentales como la memoria y el aprendizaje. En este caso, la presencia de CBG ya ha sido previamente descrita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y metodos

1. MODELO ANIMAL Y CONDICIONES ESPERIMENTALES

El modelo de ratón C57BL/6 es la cepa endogámica más ampliamente usada como fondo genético para la obtención de ratones mutantes. Además, existen diversas subcepas que se han sido seleccionadas según sus características y el tipo de estudio desarrollar. Así, la subcepa C57BL/6J es la más usada en investigaciones metabólicas [259], [260]. En 1951 surgió la sub-cepa C57BL/6N la cual presenta diferencias genéticas con la sub-sepa C57BL/6J[261], [262]. Estas diferencias han sido reportadas tanto en estudios metabólicos como en experimentos conductuales [260], [263], [264]. En esta tesis doctoral se ha utilizado un modelo de ratón *Knockout* (KO) para la CBG que fue obtenido en la sub-cepa C57BL/6N en el laboratorio de Thomas Willnow y colaboradores [220]. En el estabulario de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona establecimos la colonia a partir de tres hembras y dos machos heterocigotos $cbg^{+/-}$ cedidos amablemente por el Dr Thomas Willnow del Max-Delbrueck Center for Molecular Medicine de Berlín. Estos animales fueron cruzados con animales *Wild Type* (WT) y por genética mendeliana se estableció la colonia. Los ratones fueron mantenidos en el estabulario de la Facultad de Biología en condiciones ambientales constantes: temperatura entre 21 a 22°C, humedad relativa del 70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar (Teklad Global 2018, Harlan-Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) y tenían libre acceso tanto a la comida como al agua de bebida. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las normas reguladoras de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 86/609/ECC) y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Barcelona.

1.1. GENOTIPADO DE LOS RATONES DE LA COLONIA DE KO PARA LA CBG

Para poder seleccionar los animales WT, heterocigotos o KO para la CBG fue necesario poner a punto una técnica de genotipado que consistía en el protocolo siguiente.

Obtención de la muestra y Extracción de ADN

A los 21 días después del nacimiento las crías son destetadas y separadas por sexo, en este momento se recoge la muestra de oreja y/o cola para el genotipado según se muestra en la Fig. 1.

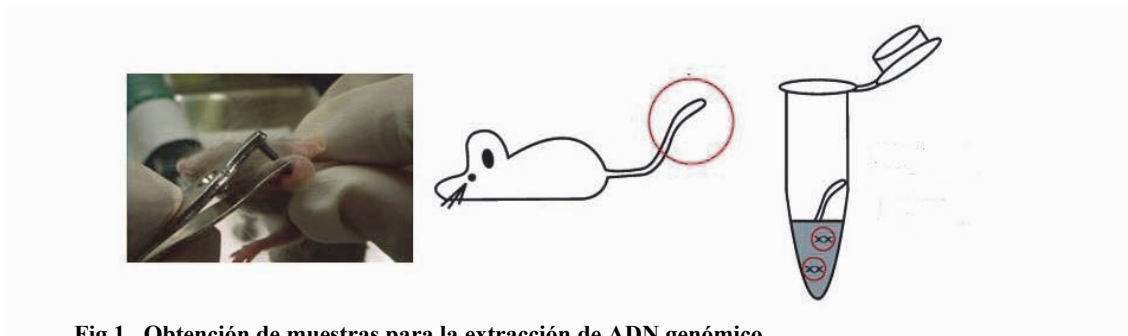


Fig.1. Obtención de muestras para la extracción de ADN genómico

Los ratones se identifican por marcas realizadas en la oreja (el trocito de oreja que resulta del marcaje se aprovecha como muestra para el genotipado) siguiendo un protocolo establecido por nuestro grupo.

En la extracción de ADN genómico se utilizó el kit DirectPCR Lysis Reagent (Viagen Biotech, Inc) y se procedió según protocolo de la casa comercial www.viagen.com/. Finalizado el procedimiento de extracción las muestras se conservaran en una temperatura de -20°C hasta su utilización.

PCR de genotipado.

A través de la amplificación por PCR con primers específicos de la zona del ADN donde se realizó la inserción de ADN exógeno (gen de la neomicina) para interrumpir la expresión de del gen de la *Cbg* podremos identificar el genotipo de los ratones (*cbg*^{+/+}, *cbg*^{+/-} y *cbg*^{-/-}). Así, para genotipar a un ratón se realiza una PCR, con tres tipos de primers que permiten identificar la copia funcional del gen *Cbg* y la copia con el del gen de neomicina insertado que lo hace no funcional. De forma que en los ratones *cbg*^{+/+} sólo se amplificará la copia funcional, en los ratones *cbg*^{-/-} solo la copia no funcional y en los ratones *cbg*^{+/-} se amplificaran ambas. La PCR se realiza en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystem), utilizando para la reacción de PCR la Go Taq Polymerase Green Master Mix (<https://www.promega.es/>) que incluye ADN taq polimerasa, tampón de reacción, cloruro de magnesio, dNTPs, y un colorante que nos permite monitorear el progreso durante la electroforesis. La mezcla de reacción, los parámetros fijados para la amplificación del ADN así como la secuencia de los primers utilizados se detallan en la Fig. 2.

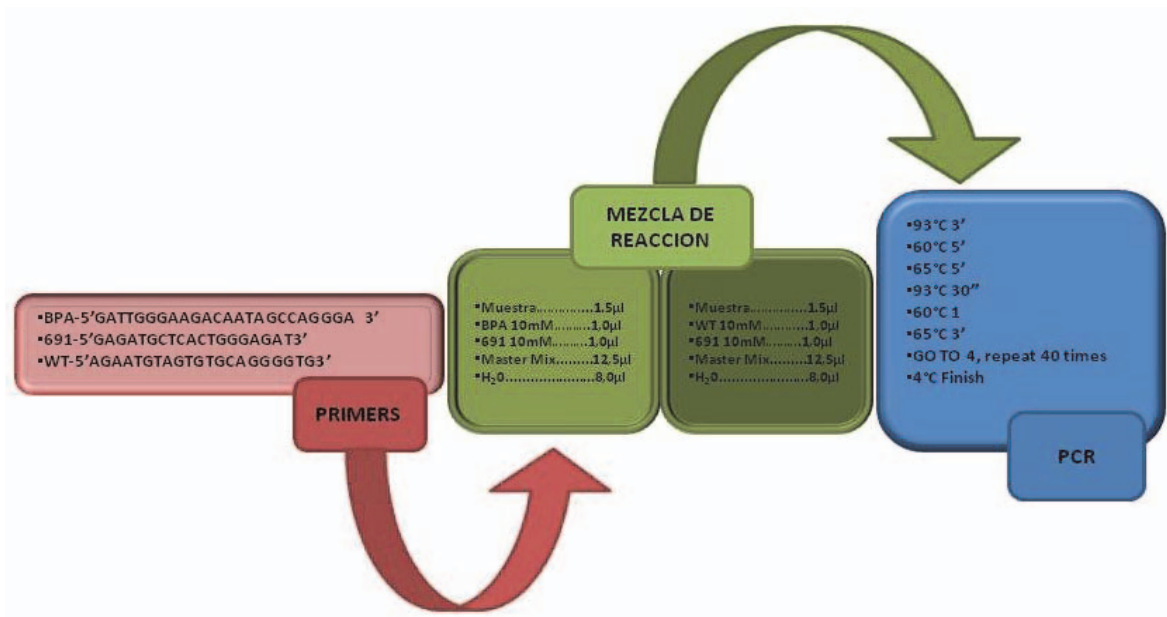


Fig. 2. Diagrama donde se resume el proceso de genotipado una vez extraído el DNA.

Electroforesis en gel de agarosa

La visualización de las bandas amplificadas por PCR se visualiza en un gel de agarosa. La electroforesis en gel de agarosa es un método estándar para separar fracciones de ácidos nucleicos. El factor más importante en la separación es la medida del poro del gel es decir la concentración de agarosa; en nuestro caso utilizamos gel de agarosa al 0,8%.

Para la preparación del gel de agarosa se utilizaran los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad para 1L	Concentración final
Tris base	121.1 g	1 M
Ácido bórico	61.8 g	1 M
EDTA (sal di-sódica)	7.4 g	0.02 M
Preparar en 1L de H ₂ O miliQ. Luego diluir 100 mL de TBE10X en 1 L de H ₂ O miliQ para llevarlo a la solución de uso 1X. Almacenar a temperatura ambiente.		

En un erlenmeyer se añaden 1,2g de agarosa se mezclan con 150mL de TBE1X y se calientan en un horno microondas hasta disolver la agarosa evitando que llegue a ebullición. Cuando se ha enfriado un poco y bajo campana se le agregan 7.0μL de bromuro de etidio como marcador del ADN. Finalmente se vierte la agarosa en el molde de la cubeta de electroforesis y se deja solidificar. Se cargan 25 μL de muestra se conecta a la fuente de alimentación a unos 120V durante unos 45minutos.

Tras la electroforesis se visualizan las bandas de ADN bajo luz ultravioletada. De forma, que un ratón WT para el gen *cbg*, es decir *cbg*^{+/+}, no observaremos ninguna banda en el tubo que contenía el primer BPA y si una banda en el tubo que contenía el primer WT. En el caso del ratón KO para, *cbg*^{-/-}, se observa una banda en el tubo donde estaba el primer BPA y ninguna en el tubo con el primer WT. Finalmente en el caso de un ratón con heterocigoto, es decir *cbg*^{+/-}, observaremos banda en ambos tubos. La Fig.3 ilustra un gel de genotipado.

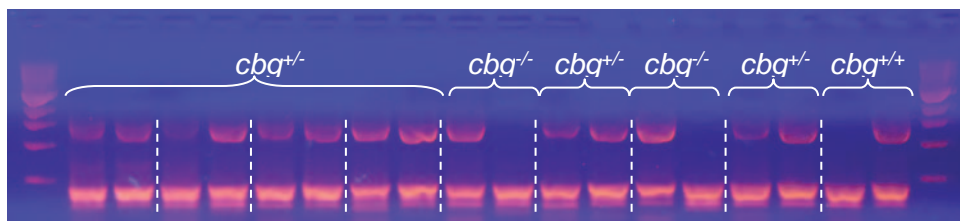


Fig. 3. Gel de agarosa donde se muestran las diferentes bandas que indican los diferentes genotipos de los ratones analizados.

1.2. INDUCCIÓN DE PANCREATITIS AGUDA EN RATONES

El modelo de inducción de pancreatitis aguda más utilizado en ratones es el inducido a través de la administración de ceruleina. La ceruleina es un análogo de la colecistoquinina que en dosis elevadas produce la hiperestimulación de las células acinares pancreáticas [265] provocando un incremento la secreción de enzimas proteolíticas que causan autolisis en las células acinares del páncreas. La pancreatitis aguda por ceruleina puede ser inducida tanto por inyección intravenosa, subcutánea como intraperitoneal. Con este modelo se observa que aparece edema intersticial ya a una hora después de la administración del fármaco incrementando hasta alcanzar su pico a las 12 horas aproximadamente. Además, este modelo ha demostrado ser particularmente útil para la investigación en la patogénesis de la patología pulmonar relacionada.

Se estudiaron machos y hembras diseñándose finalmente 8 grupos experimentales de 6 animales por grupo. De forma que 4 grupos se realizaron con animales *cbg^{+/+}* y cuatro con animales *cbg^{-/-}*. Así para cada genotipo teníamos: machos controles, machos con pancreatitis, hembras controles y hembras con pancreatitis. Todos los animales fueron alimentados con dieta estándar (Teklad Global 2018, Harlan-Interfauna Ibérica) y se mantuvieron en las condiciones de estabulación ya indicadas. El peso corporal de los animales fue de 25-30 g.

Una vez diseñados los grupos la forma de proceder fue la siguiente:

- Los ratones con pancreatitis: recibieron 10 inyecciones vía intraperitoneal de 50µg ceruleina en PBS/kg peso corporal (sigma) durante 10 horas a intervalos de 1h [266].
- Los ratones control: recibieron 10 inyecciones vía intraperitoneal del vehiculo, PBS.

El procedimiento se inició a las 8h de la mañana y los animales se sacrificaron una hora después de recibir la última administración, es decir a las 7h de la tarde.

Sacrificio de los animales y obtención de muestras

Con animales anestesiados con isoflurano (Abbott) se procedía a la obtención de muestras de sangre de la vena cava inferior. Las muestras de sangre se centrifugaban a 16000g para obtener serum que se almacenó a -80°C para su posterior utilización.

Tras la obtención de la sangre se sacrificaba el animal por dislocación cervical y se pasaba a la obtención de muestras de tejidos: hígado, páncreas, pulmón que fueron inmediatamente crio-conservadas en nitrógeno líquido y luego almacenadas a -80°C hasta realizar las determinaciones correspondientes. Además, se tomaron muestras de pulmón y páncreas para realizar estudios histológicos por lo que inmediatamente fueron fijados en paraformaldehído 4% (Panreac, Barcelona, España) tamponado en PBS y conservadas a 4°C durante 24 horas y luego transferidas a tampón PBS hasta su procesamiento.

1.3. INDUCCIÓN DE OBESIDAD DIETÉTICA EN RATONES

Para este estudio se utilizaron ratones machos de 6 semanas de edad WT (*cbg^{+/+}*) y KO (*cbg^{-/-}*) para la CBG y se distribuyeron en cuatro grupos experimentales de 6 a 10 animales por grupo (2-4 animales por jaula): WT con dieta control, KO con dieta control, WT con dieta hiperlipídica y KO con dieta hiperlipídica. Durante 12 semanas los ratones fueron alimentados con dieta control (C) o con dieta hiperlipídica (HL). En la dieta control un 18 % de la energía procedía de los lípidos (Teklad Global 2018, Harlan-Interfauna Ibérica, Spain) mientras que la dieta HL el 60% de energía la proporcionaban los lípidos con un predominio de ácidos grasos saturados (TD.06414, Harlan-Interfauna Ibérica, Spain). Los ratones tenían libre acceso a la comida y al agua. Durante las seis semanas de estudio se

controlaba la ingesta y el peso de los animales periódicamente. Al final del experimento los ratones se anestesiaron con isoflurano (Abbott) y sacrificados. En un segundo experimento se procedió de la misma forma pero se sacrificaron los animales a 1 semana, 6 semanas y 12 semanas.

Sacrificio de los animales y obtención de muestras

Al igual que en el estudio de la pancreatitis, los animales se anestesiaron con isoflurano y se procedió a la obtención de muestras de sangre de la vena cava inferior. La sangre se centrifugó a 16000g para obtener el serum que fue almacenado a -80°C para su posterior utilización.

Obtenida la sangre se sacrificó el animal por dislocación cervical, se recolectaron muestras de hígado, tejido adiposo (perigonadal, subcutáneo, mesentérico y retroperitoneal), timo, páncreas y adrenal que fueron pesadas e inmediatamente crio-conservadas en nitrógeno líquido para luego ser almacenadas a -80°C hasta realizar las determinaciones correspondientes. También se tomaron muestras de hígado y tejido adiposo (perigonadal, subcutáneo) para la realización de estudios histológicos, que fueron fijadas en paraformaldehído 4% (Panreac) tamponado en PBS a 4°C durante 24 horas y luego transferidas a tampón PBS hasta su procesamiento.

2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS

2.1. METABOLITOS EN SUERO

2.1.1 Glucosa

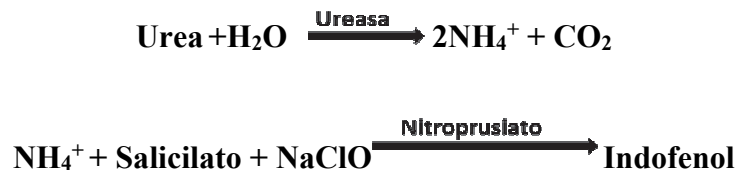
El método de valoración está basado en el descrito por Trinder en 1969 en cual se proponía el uso de la glucosa oxidasa y la peroxidasa acoplada a un aceptor de oxígeno cromogénico. En nuestro caso, el reactivo utilizado genera un producto de color que presenta una absorbancia máxima a 505nm, directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. Por lo tanto es un método colorimétrico que permite la determinación cuantitativa de la glucosa en suero o plasma. Las reacciones se ilustran a continuación:



Basado en este método, se utilizó un kit de BioSystem S.A (n°cat. 11504) procediendo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.1.2. Urea

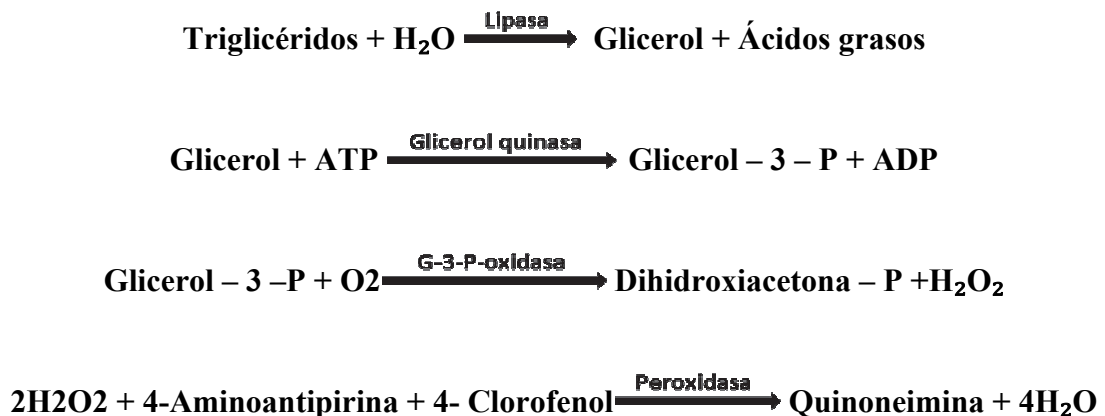
La determinación de la urea se basa en la utilización de la enzima ureasa que hidroliza la urea en amonio, este a la vez reacciona con un salicilato en presencia de nitroprusiato formándose un indofenol coloreado (en nuestro caso de color verde) que se cuantifica espectrofotométricamente a 600nm.



Para la determinación de Urea se utilizó un kit de BioSystem S.A (n°cat. 11537) y se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.1.3. Triacilgliceroles

Los triacilgliceroles (TAG) presentes en la muestra se determinaron con el kit de BioSystem S.A (n°cat. 11828). Se basa en la hidrolisis de los TAG a ácidos grasos y glicerol por acción de la lipasa. El glicerol mediante la enzima glicerol quinasa pasa glicerol-3P y que por acción de la glicerol-3P oxidasa se obtiene peróxido de oxígeno y a partir de este por acción de la peroxidasa y en presencia de 4-aminoantipirina y 4-clorofenol rinde una quinoneína coloreada en cantidad proporcional a los TAG de la muestra. El color se cuantifica espectrofotométricamente a 500nm.



El procedimiento para la reacción se hizo según las instrucciones del fabricante.

2.1.4. Colesterol total

El colesterol en serum se determinó mediante el Kit de Biosystems (n°cat. 11505). Mediante un detergente apropiado se solubiliza el colesterol y ester es de colesterol de las lipoproteínas. Es un método colorimétrico que se basa en varias reacciones acopladas para finalmente obtener peróxido de oxígeno el cual por acción de la peroxidasa y en presencia de 4-aminoantipirina y 4-clorofenol rinde una quinoneína coloreada en cantidad proporcional al colesterol total (libre y esterificado) de la muestra.



El procedimiento para la reacción se hizo según las instrucciones del fabricante.

2.1.5. Ácidos grasos no esterificados (NEFA)

Para la determinación de ácidos grasos no esterificados en suero se ha utilizado el kit de Wako Chemicals NEFA-HR(2) (n°cat. 434-91795 y n°cat. 436-91995). Se trata de un método enzimático y colorimétrico. Se basa en que los NEFA de la muestra, por la acción de la Acil-CoA sintetasa (ASC), se transforman en acil-CoA, AMP y ácido fosfórico (PPi) bajo la modulación de la coenzima A (CoA) y ATP. El acil-CoA producido es oxidado por la acil-CoA oxidasa (ACOD), generándose peróxido de hidrógeno, que en presencia de peroxidasa (POD) permite la condensación oxidativa del 3-metil-N-etil-N-(β-hidroxi)etil-anilina (MEHA) con 4-aminoantipirina. El producto, de color púrpura, se mide espectrofotométricamente a 550nm.



Para la determinación se siguió el protocolo de la casa comercial (Wako Chemicals GmbH).

2.1.6. Proteínas

La determinación de proteínas en suero se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford. Este método se basa en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. El colorante interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos. La unión del colorante a la proteína provoca un cambio de color de rojo-marrón a azul, esto se traduce en un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595nm. La concentración de proteínas en la muestra es directamente proporcional a la intensidad del color azul, es decir a la absorbancia a 595nm. Se realizó una curva patrón a partir de una solución de albúmina de 2mg/ml, a partir de la cual se realizan diluciones seriadas para tener un rango de concentraciones de 0 a 1000µg/mL. Para la determinación las muestras de suero se diluyeron 1:10 en una solución de NaCl al 0.9%. Para el ensayo se utilizó el reactivo Dye Reagent Concentrate (nº cat. 5000006, Bio-Rad Laboratories) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.2. HORMONAS EN SUERO

2.2.1. Insulina

Para determinar la concentración de insulina en suero se ha utilizado el Kit de Cristal Chem, Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA (nºcat. 90080).

El kit utilizado para la determinación de insulina es un ensayo inmunoenzimático en el cual un anticuerpo policlonal específico para la insulina de ratón está inmovilizado en los pocillos de una inmunoplaaca. Las muestras se colocaron en los pocillos y de esta manera cualquier molécula de insulina presente en las muestras es fijada de forma específica por el anticuerpo anti-insulina. Posteriormente, después de lavar la inmunoplaaca, se añade un anticuerpo anti-insulina conjugado con peroxidasa, que se unirá también a la insulina unida ya al primer anticuerpo inmovilizado en el pocillo. Se lava de nuevo para retirar el exceso de anticuerpo y se añade el sustrato de la peroxidasa. Se espera el tiempo suficiente para que se desarrolle el color que será directamente proporcional a la cantidad de insulina. Finalmente se añade una solución para detener la actividad enzimática y por tanto el desarrollo del color. Se mide la intensidad de color espectrofotométricamente a 450 nm y a 630 nm. Para el cálculo se debe hacer el cálculo: $A_{450nm} - A_{630nm}$ para todas las muestras y el patrón. Evidentemente todo el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.2.2 Leptina

La determinación de la leptina en suero se realizó con el Kit de Cristal Chem, Mouse Leptin ELISA (nºcat. 90030). La técnica se basa en el mismo principio descrito en el

procedimiento para la insulina y la determinación se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.2.3. Determinación de corticosterona libre y total

Para determinar la corticosterona libre y total se debe efectuar previamente una separación de estas dos fracciones, para tal fin se utilizaron filtros Centrifree UF device w/ YM-T membrane 30/Pk, Millipore (n°cat. 4104). A 160 μ L de muestra se agregan 5 μ L de 3 H-corticosterona (n° cat. NET399001MC Perkin Elmer). Se incubó 1h a 37°C. Terminada la incubación, 5 μ L se añaden a 4mL de líquido de centelleo (Ecolite, MP Biomedicals) para el conteo de radioactividad total (Packard Tri Carb 1500 Packard). Los 160 μ L restantes de cada muestra se añaden a los filtros Centrifree, se colocan con una inclinación de 45° y pipeteando suavemente en la pared del tubo para prevenir el bloqueo por aire del filtro, se tapa el tubo y se centrifuga a 10°C a 2000g durante 30 minutos. Tras el centrifugado se pipetea 50 μ L de la parte inferior del tubo (filtrado) y se añaden a 4 mL líquido de centelleo para el conteo de radioactividad (hormona libre). Posteriormente se realiza un spin del tubo Centifree colocado en posición invertida para recuperar la parte retenida en la parte superior del tubo, es decir la hormona unida. De esta fracción se cuenta la radioactividad de 10 μ L en 4mL de líquido de centelleo. Así el marcaje con 3 H-corticosterona nos permite conocer el porcentaje de hormona que está libre y el que está unida, pero no la concentración.

Para determinar la concentración de corticosterona, ya sea total o libre, se utilizaron dos métodos según el experimento. En unos casos se utilizó un kit de ELISA y en otros un radioinmunoensayo (RIA) puesto a punto en nuestro laboratorio.

ELISA de corticosterona

Se utilizó el kit de Arbor Assays DetectXR Kit (n° cat. K014-H1) y se procedió según instrucciones de la casa comercial. Para la hormona total se realizó una dilución 1/50 del suero y para la hormona libre se realizó una dilución 1/5 de la fracción obtenida por filtración con el tubo Centrifree.

RIA de corticosterona

Previamente a la determinación se desproteinizan las muestras de suero con acetona. Para ello a 20 μ L de suero se le añaden 80 μ L de acetona, se agita y se centrifuga durante 15 minutos a 10000g a 4 °C. El sobrenadante se transfiere a otro tubo eppendorf y se evapora bajo corriente de N₂. Finalmente se resuspende en 600 μ L de PBS con gelatina (PBSG). Para el RIA se toman 100 μ L de la muestra desproteinizada a la que se añaden 200 μ L de anticuerpo anti-corticosterona (n° cat. AB1297, Millipore) diluido 1/1000. Se agita y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añade 100 μ L de 3 H-corticosterone (n° cat. NET399001MC Perkin Elmer) preparada a una concentración que

nos permita tener 60pg de ³H-corticosterone en 100μL. Incubar a 4°C durante 15 minutos. Añadir 200μL de carbón activo-dextrano (0.5-0.05%) manteniéndolo en agitación para precipitar la corticosterona no unida al anticuerpo. Agitar e incubar 10 minutos en hielo (0°C). Centrifugar a 2000g 15 minutos a 4°C. El sobrenadante contiene la corticosterona unida. Se pipetea 200μL del sobrenadante al que se añaden a 3mL de líquido de centelleo para contar la radioactividad presente. Para hacer el cálculo preciso de la concentración de corticosterona se requiere de una patrón y de un tubo con tampón pero sin anticuerpo para determinar la unión inespecífica.

2.3. CAPACIDAD DE UNIÓN DE LA CBG EN SUERO

La capacidad de unión de la CBG a la corticosterona se determinó según protocolo descrito en [267], [268]. Así, el procedimiento para determinar la capacidad de unión de la CBG empieza con la eliminación la corticosterona de las muestras de suero. Para ello se incuban 10 μL de suero con 0,5 mL de una suspensión de carbón activo-dextrano (0,5%-0,05% en PBS con 0,1% de gelatina (PBSG) a pH 7,4) a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación esporádica. Se centrifuga 15 minutos a 3000g a 4°C y el sobrenadante se diluye 1/5 en tampón PBSG, de esta dilución se usan 150μL para el estudio de unión. La concentración final de ³H-corticosterona utilizada fue de 15nM en 200 μL de volumen final. Para cada muestra se determina también la unión inespecífica, es decir que para cada muestra se preparan dos tubos: 1) unión total (UT) con 150 μL de muestra + 25μL ³H-corticosterona 15nM en PBSG + 25μL de PBSG y 2) unión inespecífica con 150 μL de muestra + 25μL ³H-corticosterona 15nM + 25μL de corticosterona 7.5μM PBSG. Se realiza una incubación overnight a 4°C y se añade 200 μL de carbón activo-dextrano (0,5%-0,05% en PBS con 0,1% de gelatina (PBSG) a pH 7,4) en agitación a cada tubo. Se deja en hielo durante 10 minutos exactos y finalmente se centrifuga a 2000g a 4°C durante 10 minutos. Del sobrenadante se toman 200 μL y se añaden a 4 mL de líquido de centelleo para el conteo de la radioactividad presente, es decir de la ³H-corticosterona unida a la CBG. La calcular la capacidad de unión de la CBG se resta a la unión total la unión inespecífica.

2.4. LIPASA PANCREÁTICA EN SUERO

La lipasa pancreática es una enzima producida por el páncreas y se secreta a nivel de intestino delgado donde hidroliza los triacilglicerolos de la dieta para que sea posible su absorción. Los niveles de lipasa pancreática en serum en el caso de la pancreatitis aguda suelen estar muy incrementados por lo que suele utilizarse como uno de los parámetros para el diagnóstico de la enfermedad[269]–[272].

La determinación de esta enzima se realizó utilizando el kit Lipasa (LPS) de Randox (Cat LI 188). Se trata de un método turbidimétrico basado en la siguiente reacción:



Se mide la disminución de la turbidez en la muestra a una longitud de onda de 340nm comparando con la del patrón. La determinación se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial.

3. VALORACIONES EN MUESTRAS DE TEJIDOS

3.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

En el caso de el tejido adiposo y el pulmón se obtuvo un extracto de proteína utilizando el kit TRI Reagent® Solution (Ambion, Inc.) y mientras que en el caso del hipocampo y glándulas adenales se obtuvo un homogenado. En ambos casos la concentración de proteína se cuantificó mediante el método colorimétrico del BCA.

3.1.1 Obtención del extracto de proteína en pulmón y tejido adiposo

A 50-100mg de tejido congelado se añaden 1mL de TRI Reagent® Solution (nº cat. AM9738, Ambion, Inc.) y se homogeniza con un politrón Ultra Turrax T25 basic IKA Labortechnik a 16000rpm bajo campana. Se deja incubando 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) y se añaden 200 µL de cloroformo se agita vigorosamente (vortex) durante 15 segundos. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación obtenemos tres fases: la superior que es transparente contiene el RNA, la fase intermedia blanca el ADN y la fase inferior de color rosa las proteínas. Retiramos la fase superior incolora (servirá para aislar el RNA) y nos quedamos con la fase intermedia e inferior. Se precipita el ADN con etanol al 100% (0.3mL), se agita por inversión varias veces, se incuba 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 2000g a 4°C 5 minutos. El sobrenadante contiene las proteínas. Se procede a precipitar las proteínas con isopropanol (1,5mL) se agita por inversión varias veces, se incuba un mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000g durante 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se procede lavar y solubilizar el precipitado de proteínas. El lavado se realiza con 0,3M de hidrocloreuro de guanidina 95% etanol (2mL), mezclar bien, incubar a temperatura ambiente 20 minutos, centrifugar a 7500g 5 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante. Este lavado se realiza 3 veces y se realiza un último lavado con etanol al 100%. Finalmente se solubilizan las proteínas con SDS 1%. Se procede en todo momento según las instrucciones del fabricante.

3.1.2 Homogenado de hipocampo

Unos 10mg de hipocampo se homogenizaron en tampón HBS pH 7.2 a 4°C (100mM HEPES, 200mM NaCl, 2mM Na₄P₂O₇, 10% glicerol, 5mM EDTA), 1% Nonidet P-40 (Roche,) con 1/100 de cocktail inhibidor proteases y fosfatasa (Complete™ Protease

Inhibitor Cocktail; Roche). Las muestras se sonicaron 5 segundos a 200W (Branson Sonifier 250® Analog Ultrasonic, Branson Ultrasonics) y se centrifugaron a 10000g durante 20 minutos a 4°C, el pellet se descartó y el sobrenadante se guardó a -80°C.

3.1.3. Homogenado de glándulas adrenales

A partir de una glándula adrenal (aproximadamente 3mg) se homogenizó 300µL tampón fosfato (PBS) que contenía 1/100 Complete™ protease inhibitor cocktail (Sigma) con un Ultra-Turrax®, IKA® T10. Después de centrifugar a 1000g durante 10 minutos a 4°C se descartó el pellet y el sobrenadante se guardó a -80°C.

3.1.4. Determinación de la concentración de proteína:

La determinación de proteína se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA). El método del BCA se basa (de forma similar al método de Lowry) en que las proteínas a pH alcalino reducen el ion C^{2+} a Cu^+ . El BCA quelata el Cu^+ formando un complejo de color púrpura con absorbancia máxima a 562nm. La cantidad de proteínas en la muestra es proporcional al color púrpura desarrollado. Se utilizó este método porque es compatible con la presencia de SDS y otros detergentes. La cuantificación se realizó utilizando una patrón de Albumina y el kit QuantiPro™ BCA Assay (n° Cat. QPBCA, Sigma), siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial.

3.2. ACTIVIDAD DE LA MIELOPEROXIDASA EN PÁNCREAS Y PULMÓN

La mieloperoxidasa (MPO) es un enzima que se encuentra en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos polimorfonucleares; y su actividad en el páncreas y pulmón es un indicador de la infiltración de estas células en el tejido inflamado [273], [274].

El neutrófilo genera grandes cantidades del radical superóxido que es convertido rápidamente en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (SOD). Este peróxido de hidrógeno reacciona con cloruro y forma ácido hipocloroso que es un potente oxidante con gran capacidad citotóxica. La reacción catalizada por la MPO in vivo es la siguiente:



El método utilizado para su valoración se basa en utilizar la tetrametilbencidina (TMB) como sustrato para la MPO. Es importante conseguir una buena extracción de la enzima, y para ello las muestras se homogenizan en tampón fosfato (KH_2PO_4 0,05 M, pH 6) con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTBA) 0.5%, posteriormente se sonicaron durante 30 segundos al 20% de potencia usando un sonicador Braun Biotech, Inc., Allentown, PA,

USA . Tras tres ciclos de congelación/descongelación en nieve carbónica, las muestras se incuban durante 2 horas a 60°C para eliminar la actividad de las peroxidadas inespecíficas y los inhibidores de la MPO que pudieran afectar a la determinación. Tras la incubación, se centrifugan las muestras durante 12 minutos entre 3000-4000g a 4°C y se recupera el sobrenadante.

A 5 µl del sobrenadante se le añaden 10 µL de reactivo de TMB (5 mg/mL disuelto en dimetilsulfóxido). A tiempo cero se añaden 70 µL de tampón fosfato (KH₂PO₄ 8 mM, pH 5.4) con H₂O₂ al 0.05% y se determina la cinética enzimática de la MPO, leyendo la absorbancia cada 15 segundos durante 3 minutos a una longitud de onda de 630 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto [275].

3.3. DETERMINACIÓN DE GLICÓGENO HEPÁTICO

Para determinación del glucógeno hepático primero se realiza una extracción del glucógeno y posteriormente mediante el método de la Antrona se hidroliza el glucogeno y se cuantifica la cantidad de glucosa presente. Para ello se pesan 100 mg de tejido y se introducen en un tubo de 10 mL con 1 mL de una solución de KOH 15%. Se calientan a 85°C durante 20 minutos y dejan enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se pipetea a cada tubo 1,5 mL de etanol absoluto (Panreac) a 4°C y se congelan a -20°C durante 24 horas. Al día siguiente se descongelan las muestras, se agitan (vortex) y se centrifugan a 2000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se aspira el sobrenadante con bomba de vacío y se resuspende el pellet con 1 mL de agua destilada a 65°C, se agitan (vortex) los tubos y nuevamente se centrifugan a 2000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se traspa a otro tubo donde se le añaden 3 mL de etanol absoluto 4°C, se agitan y se congelan nuevamente a -20°C. El tercer día se repite el procedimiento del día anterior resuspendiendo finalmente el pellet en 1,9 mL de agua caliente (el volumen de resuspensión varía según la cantidad de glucógeno que se espera que tenga la muestra). Para determinar la glucosa por el método de Antrona se realiza una dilución 1/20 de la solución glucógeno obtenida (20 µL glucógeno hidrolizado + 280 µL de H₂O). A partir de la dilución 1/20 se toman 5 µL y se añade 1 mL de reactivo de Antrona (100 ml H₂SO₄ al 84 % + 0.1 g antrona). Se mantiene a 100°C durante 10 minutos (hidrolisis del glucogeno), se deja enfriar, se cargan 300 µL de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se lee la absorbancia a 550 nm frente un patrón de glucosa procesado de la misma forma.

3.4. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS HEPÁTICOS

Los lípidos hepáticos se determinaron por el método de Folch. Para lo cual se pesan 100 mg de hígado y se colocan en tubo Folch con una solución clorofromo: metanol (2:1). Se dejan en agitación en un orbital overnight a temperatura ambiente. Al día siguiente se filtra el contenido del tubo a través de un algodón fino, y se le añade 2 mL de NaCl 0.9%, se

agitan los tubos y se colocan en un orbital durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugan los tubos a 1500 rpm durante 30 minutos. Se obtiene una fase acuosa inorgánica y una fase inferior orgánica donde están los lípidos. Se recoge la fase orgánica con una pipeta Pasteur y se coloca en un molde de aluminio previamente pesado. Se dejan secar bajo campana hasta el día siguiente y se vuelven a pesar. La diferencia de peso corresponde a los lípidos de la muestra:

$$\frac{\text{Peso final molde(mg)} - \text{Peso inicial molde(mg)}}{\text{peso de la muestra(mg)}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} = \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) \text{lipidos}$$

3.5. DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA TOTAL Y LIBRE EN HIPOCAMPO

Unos 10 mg de hipoacmpo se homgenizaron en el tampon que proporciona el kit de determinación de corticosterona (Correlate-EIATM, Assay Designs, Ann Arbor), se sonicaron durante 5 segundos a 200W (Branson Sonifier 250® Analog Ultrasonic, Branson Ultrasonics) y se centrifugaron a 10000g durante 20 min a 4°C, el pellet se descartó y del sobrenadante una parte se guardó para la determinación de la corticosterona libre y la otra se procesó para valorar la corticosterona total. Para ello se incubó con el reactivo aportado por el kit *Steroid displacement Reagent®* a la proporción de 1:40 durante 15 minutos. Luego se mezcló vigorosamente con acetato de etilo (1:1) y se se centrifugó a baja velocidad, finalmente se recoge la fase superior que contiene la corticosterona. Este proceso se repite tres veces y finalmente el extracto con corticosterona se deseca a -20°C con hielo seco durante una noche y se resuspende en tampon de ensayo aportado por el kit. Esta fracción se utiliza para determinar la corticosterona total. Para la dereminación de la corticosterona libre y total de las fracciones obtenidas se utiliza un kit de inmunoensayo enzimático (Correlate-EIATM, Assay Designs, Ann Arbor) y se procede como indica el fabricante.

4. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

4.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO

Para la extracción del ARN se utilizó el reactivo TRI Reagent® Solution (n° cat. AM9738, Ambion, Inc.). Como se ha explicado en el apartado 3.1.1. la primera parte es común a la obtención de las proteínas de tejido. Así, entre 50-100mg de tejido congelado, dependiendo del tejido, se añade 1mL de TRI Reagent® Solution y se homogeniza con un politrón Ultra Turrax T25 basic IKA Labortechnik a 16000rpm bajo campana. Se deja incubando 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) y se añaden 200 µL de cloroformo se agita

vigorosamente (vortex) durante 15 segundos. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación obtenemos tres fases: la superior que es transparente contiene el ARN, la fase intermedia blanca el ADN y la fase inferior de color rosa las proteínas. Tras pasamos la fase superior incolora a otro tubo y se añaden 500µL de isopropanol se mezcla por inversión unas 10 veces con la finalidad de precipitar el ARN. Se deja a temperatura ambiente 10 minutos agitando por inversión ocasionalmente. Se centrifuga a 12000g durante 8 minutos a 4°C se descarta el sobrenadante y se añade 1 mL de etanol 75% al pellet se agita (vortex) y se centrifuga a 7.700g durante 5 minutos a 4°C. Se repite este paso 1 o 2 veces para limpiar el pellet de ARN. Se aspira al máximo el etanol y se deja secar el pellet al aire bajo campana (aproximadamente 1h). Finalmente se resuspende con agua bidestilada estéril libre de ARNasas (volumen entre 50 y 200µL según tamaño del pellet y por tanto según el tejido de origen). Se guardan a -80°C.

La cuantificación de la concentración de ARN se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop® ND-100 (NanoDrop Technologies). Se ajusta la concentración de las muestras a 0.5µg de RNA/µL.

4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN: ARN a ADNc

Para la retrotranscripción se utilizó un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystem). En primer lugar se realiza una mezcla de 2µg de ARN + 2.5 µL de OligodT previamente diluidos 1/10 (Genecraft®) + 10.5µL de agua bidestilada estéril libre de ARNasas (volumen final de 15 µL). Se hace un spin y se incuba a 72°C durante 5 minutos en el termociclador. Se mantiene a 4°C y se añaden los componentes de la mezcla para la retrotranscripción según cuadro siguiente:

	Cantidad/tubo	[final en tubo]
Tampón 5x (nº cat. M531A19847219, Promega)	5µL	x1
dNTPs (Roche)	1.5 µL	10mM
ARNsin (nº cat N211B20325515, Promega)	0.625 µL	20-40 unidades/µL
Agua bidestilada estéril libre de ARNasas	1.875 µL	
Retrotranscriptasa Reversa (nº cat. M531A19847219, Promega)	1µL	200 unidades/µL
Volumen final	25µL	

Se hace un *spin* y se procede a la síntesis de ADNc incubando en el termociclador durante 1 h a 42°C. Enfriar a 4°C y congelar a -80°C.

4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL

Se utilizó la fluorescencia de SYBER green por su capacidad de unión a la doble cadena de ADN. Una vez unido este incrementa su fluorescencia en 1000 veces en relación a cuando está libre, de forma que cuantos más amplicones existan en la muestra se obtendrá un marcaje fluorescente mayor. Sin embargo, una amplificación inespecífica también generará fluorescencia, por ello debe realizarse una curva de melting en la que el producto amplificado se somete a un incremento de temperatura para comprobar el punto de fusión. Así para un solo producto de amplificación se ha de observar un solo pico, correspondiente al amplicón específico.

La PCR en tiempo real se realizó en un ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) ubicado en los Servicios Científico Tecnológicos de la Universidad de Barcelona. La mezcla de reacción en cada pocillo de la placa de PCR de 384 pocillos contenía:

	Cantidad/pocillo	[final en tubo]
ADNc	4 μ L	10ng
Master mix SYBER Green (nº cat 4309155, Applied Biosystems)	5 μ L	
Primer Forward (10 μ M)	0.3 μ L	300nM
Primer Reverse(10 μ M)	0.3 μ L	300nM
Agua bidestilada estéril libre de RNAasas	0.4 μ L	
Volum total	10 μ L	

Una vez preparada la placa se procede a la amplificación en el ABI PRISM 7900 HT.

En la siguiente tabla se detallan todos los primers utilizados:

Secuencia de primers 5'→3' utilizados para el análisis en RT-qPCR

GEN	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
CBG	CCACCAAAGACACTCCCTTG	GCACATTCCCTTCATCCAGT
11β-HSD1	CAAGGTCAACGTGTCCATCA	TCCCAGAGATTTTCCTTCATA
11β-HSD2	CTCCAAGGCAGCAATAGCAC	CGTTTCTCCCAGAGGTTTAC

RPL32	ACCAGTCAGACCGATATGTGAAA	TGTTGTCAATGCCTCTGGGTT
G6PT	GAGTGCACCTCCCAACTTGT'	AGGGTAAGCCAGCCAGAAAT'
H6PDH	TGTGGGGGAAATACCAAAGA	GTGCATGCCAGAGAACACAG
FAT/CD36	CTTGGGATTGGAGTGGTGAT	CGGCTTTACCAAAGATGTAGC
5αR	TTCACCCTGTGTGCACTGTT	GCACACTAAAGCAGGAATGGA
LPL	CTGGAATGTTAGCCCTTGCT	GGATGCCGGTGACAAATTAT
LEP	CTATGCCACCTTGGTCACCT	ACCAAACCAAGCATTTTTTGC
PEPCK	ATGGGGTGTTTGTAGGAGCA	CCGAAGTTGTAGCCGAAGAA
PPARγ	GGAAGCCCTTTGGTGACTTT	ACGTGCTCTGTGACGATCTG
Ppib	GAGACTTCACCAGGGGAGATG	GAGCCATTGGTGTCTTTGCC
Cyp11a1	GGTTCCACTCCTCAAAGCCA	GGATCTCGACCCATGGCAAA
Cyp11b1	GCCTGAACGCTATATGCCTC	CACGTGGAAGGATTCAGCAC
Cyp11b2	AGCATCGCTGCAAATCCTCA	GGTTTCGGCCCATGGAGTAG
Cyp21a1	CTGGGCACTGCATCACGATA	GATAAAGAGCTCCTGCCGGG
Hsd3b1	AAGCTGCAGACAAAGACCAAGG	GCTTGAACACAGGCCTCCAA
Mc2r	AGAACCAACATGAAGGGTGC	AAGGGGGCCCAACAGAAGAT
Star	TGCCAACACCCACTCATACT	CCTTCTTTGGGGTGTCTGCAT
SR-B1	AAAGGGCTCCCAGGATAAGGA	GAGTCCTCAAGAAGCGGGGT

La cuantificación de la expresión génica se realizó aplicando el método de $\Delta\Delta C_t$ usando RPL32 como gen de referencia o normalizador, y el grupo experimental.

5. WESTERN BLOT

Para la detección de las proteínas de interés se utilizó la técnica de Western blot. Para ello previamente se separan las proteínas de la muestra según su tamaño en un gel de policrilamida: posteriormente se transfieren las proteínas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) que sirve de soporte para la inmunodetección.

5.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Se utilizó un gel separador de 10% de acrilamida y un gel empaquetador de 4% preparados según las siguientes proporciones:

Para 4 geles del 10% acrilamida y de 1mm de grosor se mezclan: 6,6mL de 30% Acrylamide/Bis Solution; 5mL tampón 1,5M tris HCl pH 8,8; 0,2mL de 10% SDS; 8,2mL H₂O bidestilada, 100μL 10% amoniopersulfato (preparado al momento) y 10μL TEMED.

Para 4 geles del 4% acrilamida y de 1mm de grosor se mezclan: 1,3mL de 30% Acrylamide/Bis Solution; 2,5mL tampón 0,5M tris HCl pH 6,8; 0,1mL de 10% SDS; 6,1mL H₂O bidestilada, 50μL 10% amoniopersulfato (preparado al momento) y 5μL TEMED.

Es importante añadir el amonipersulfato y el TEMED al final para evitar la polimerización del gel antes de tiempo.

Para la preparación de las muestras se utilizó Sample Buffer 4x (10% β-mercaptoetanol). Se procede mezclando cuatro volúmenes de muestra con un volumen de Sample Buffer 4x (10% β-mercaptoetanol) en un tubo eppendorf. Se agita, se calienta a 95°C durante 5 minutos y se enfría rápidamente sumergiendo el tubo en hielo. Para las muestras de suero se cargaron 1 μL o 100μg de proteínas según el experimento. Para las muestras de tejidos se cargaron entre 10 y 25μg de proteínas según el tejido.

La electroforesis se lleva a cabo en una cubeta Mini-PROTEAN Tetra Cell (n° cat 1658000EDU, Bio-Rad) a 200V durante 45 minutos en Running Buffer1x (25 mM tris HCl, 192 mM glicina, 0,1%SDS). Junto con las muestras se carga un patrón de pesos moleculares Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (n° cat. 26634, Thermo Scientific) que nos ayuda a visualizar la electroforesis y a situar la proteína problema en la inmunodetección.

5.2. TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A LA MEMBRANA DE PVDF

Una vez finalizada la electroforesis se equilibra el gel separador (previamente se elimina el gel empaquetador) con el tampón de transferencia (100mL Running Buffer10x, 700mL H₂O bidestilada, 200mL etanol 100%) durante 15 minutos como mínimo. La membrana de PVDF debe activarse sumergiéndola 15 segundos en metanol 100%, seguido de 2 minutos en agua bidestilada y finalmente un mínimo de 5 minutos en tampón de transferencia. Una vez la membrana activada y el gel equilibrado con tampón de transferencia, se procede a montar el *sándwich* siguiendo las instrucciones de BioRad:

Colocar sobre la cara negra del casete un “estropajo” empapado con tampón de transferencia

Colocar encima papel de filtro (2-3 hojas)

Colocar encima el gel

Colocar la membrana (hacer un amarca para saber el lado donde están las proteínas)

Colocar encima papel de filtro (2-3 hojas)

Colocar un “estropajo” empapado con tampón de transferencia

Cerrar con la cara clara del casete el sándwich

En todos los pasos se debe ir con mucho cuidado de no dejar pequeñas burbujas entre los diferentes componentes del *sándwich* ya que ello comportaría una mala transferencia de las proteínas.

La transferencia se realiza con el Blotting Module (nº cat. 1660828EDU, Bio-Rad). Se coloca el sándwich, el bloque de hielo y un agitador magnético en la cubeta. Se llena con tampón de transferencia y se conecta la cubeta a la fuente de alimentación. La transferencia se realiza a 0,25Å durante 2 horas en la cámara fría en agitación constante.

5.3. INMUNODETECCIÓN

Previa a la inmunodetección se realiza una tinción de la membrana con rojo ponceau para controlar que las proteínas se han transferido correctamente. Para la inmunodetección, en primer lugar se realiza un bloqueo de las membranas incubándolas con tampón TBST0.05% (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) pH 7.4 y leche en desnatada al 5% durante 90 minutos a temperatura ambiente y en constante agitación. A continuación las membranas se incuban overnight a 4°C con el anticuerpo primario en TBST 0.05% y 5% de leche desnatada. En la siguiente tabla se relacionan la lista de anticuerpos primarios utilizados para detectar los diferentes antígenos y su dilución.

<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Compartimento</i>	<i>Dilución</i>
SERPINA6 Goat anti-Mouse Polyclonal (aa23-397) LS-C39044 - LSBio	Plasma	1:2000
	Tejido adiposo	1:400
	Pulmón	1:1000
	Adrenal	1:1000
	Hipocampo	1:200
NFκβ p65 Antibody (C-20): sc-372	Tejido adiposo	1:500
p-NFκB p65 Antibody (Ser 276): sc-101749	Tejido adiposo	1:500
Phospho-Akt (Ser473) Antibody #9271 Cell Signaling Technology	Hipocampo	1:1000

Akt Antibody #9272 Cell Signaling Technology	1:1000
Rabbit antibody to phospho T202 & Y204 Erk1, Erk2 # OSE00009W Osenses Pty Ltd	1:1000
Rabbit antibody to Erk1, Erk2 # OSE00012W Osenses Pty Ltd	1:1000
MCR (H-300): sc-11412	1:500
GR (H-300): sc-8992	1:1000
PAI1 Antibody PA5-27216 Thermo Fisher Scientific	1:1000
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody #9251 Cell Signaling Technology	1:1000
SAPK/JNK Antibody #9252 Cell Signaling Technology	1:1000
pGSK3 β	
Phospho-Insulin Receptor β (Tyr1361) (84B2) Rabbit mAb #3023 Cell Signaling Technology	1:1000
Insulin Receptor β (4B8) Rabbit mAb #3025 Cell Signaling Technology	1:10000
Phospho-IRS-1 (Ser307) Antibody #2381 Cell Signaling Technology	1:100
Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Antibody (AT8) MN1020 Thermo Fisher Scientific	1:1000
Anti-Tau Mouse mAb (TAU-5) 577801	1:100
Phospho-GSK-3-beta (Ser9) (D3A4) Rabbit mAb #9322 Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-GSK3 beta (phospho Y216) antibody (ab75745) Abcam	1:1000
GSK-3 β Antibody (H-76) (sc-9166) Santa Cruz Biotechnology	1:1000
p35 (C-19): sc-820 SANTA Cruz Biotechnology, Inc.	1:1000
Cdk5 Antibody (C-8): sc-173 Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:1000
Synaptophysin Antibody (SYP02) MA5-11575 Thermo Fisher Scientific	1:1000
Anti-NR1 Antibody #05-432 Merck Millipore	1:1000
Anti-NR2A Antibody, clone A12W, rabbit monoclonal # 04-901 Merck Millipore	1:1000
Anti-PSD95 (NT) Antibody, clone EP2652Y, rabbit monoclonal # 04-1066 Merck Millipore	1:1000
Anti BDNF Antibody #AHP1831 AbD Serotec	1:1000

Arc Antibody (H-300): sc-15325 Santa Cruz Biotechnology, Inc.		1:1000
Anti-Albumin sc46293 Santa Cruz Biotechnology	plasma	1:50000
Anti-tubulin DM1A Abcam	pulmón	1:1000
Anti- β -actin A-5316 Sigma	tejido adipose hipocampo adrenal	1:10000

Tras la incubación con el anticuerpo primario se lavan las membranas con TBST 0.05%, tres lavados de 5 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras la incubación con el anticuerpo secundario se realizan tres lavados de la membrana con TBST 0.05% 5 minutos y uno con TBS.

Para la detección de la luminiscencia se utilizó el kit ECL Luminata™ Forte Western HRP Substrate (nº cat WBLUF0100, Millipore). La visualización de las proteínas se hizo a través de la exposición de las membranas a un film UltraCruz® Autoradiography Film (nº cat. sc-201697, Santa Cruz Biotechnology).

La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó por densitometría, utilizando el programa de análisis de imagen Core Laboratory Image Quantification Software (TotalLab Ltd, Newcastle). Se expresa en unidades arbitrarias y corregidas en todos los casos por el control de carga.

6. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

6.1. FIJACIÓN DE LOS TEJIDOS

En la mayoría de los experimentos, se extraían los tejidos del animal y se sumergían rápidamente en paraformaldehído al 4% manteniéndolos durante 24h a 4°C. Posteriormente se transferían a un vial con PBS que se mantenía a 4°C hasta que se procesaban para la obtención de los bloques.

En el caso de la glándula adrenal las muestras se obtuvieron perfundiendo al animal previamente a la obtención de los tejidos. Para ello, con el animal anestesiado y en posición decúbito supino, se realizó una incisión subcutánea para bajo la caja torácica hasta la altura de los pulmones y el corazón. Se introdujo la aguja dentro del ventrículo izquierdo en dirección a la arteria aorta, se hizo una pequeña incisión con las tijeras en la aurícula derecha y se abrió el paso para el goteo de paraformaldehído 4% dejando pasar un volumen equivalente a 100ml. Una vez finalizada la perfusión se realizó la disección para la obtención de los tejidos y su posterior fijación sumergiéndolos en paraformaldehído 4%

durante 24 horas a 4°C y que posteriormente se transferían a un vial con PBS que se mantenía a 4°C hasta que se procesaban para la obtención de los bloques.

6.2. OBTENCIÓN DE LOS BLOQUES DE PARAFINA

Para proceder a la inclusión en bloques de parafina previamente se debe deshidratar el tejido a través de pases por alcohol 75%, 95%, 100% y finalmente con xilol. Este proceso de deshidratación se ha realizado en un procesador automático de tejidos Citadel 2000 (Thermo Scientific™) durante 8 horas aproximadamente. Seguidamente se procedió a la inclusión de la muestras en bloques de parafina (overnight a 45°C con parafina líquida y dos pases más de parafina a 60°C durante 60 minutos).

6.3. OBTENCIÓN DE LOS CORTES, DESPARFINACIÓN Y TINCIÓN HEMATOXILIN-EOSINA (H-E)

Se realizaron cortes de 3-5 µm en un micrótopo pfm rotary 3003 (Cologne). Los cortes se colocaron en láminas porta objetos Superfrost™ Plus (Thermo Scientific™) que garantizan la adherencia del tejido a la lámina. Posteriormente se realiza la tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) para lo cual primero se deben desparafinar los cortes. Para ello se procede de la siguiente forma:

Desparafinar con xileno 2 x 15 minutos (no menos de 10 minutos)

❖ Hidratar en períodos de 10 minutos (no menos de 5 minutos):

- Alcohol 100° 2 x 10 minutos
- Alcohol 95° 2 x 10 minutos
- Alcohol 75° 1 x 10 minutos
- Alcohol 50° 1 x 10 minutos
- H₂O bidestilada 1 x 10 minutos

❖ Tincion:

- sumergir en hematoxilina mayer's (Panreac) 2 minutos (tinción de núcleos)
- Lavar con agua del grifo 2 x 30 minutos
- Sumergir en eosina (Panreac) 2 minutos (tinción membranas)
- Lavar con agua del grifo 2 x 30 minutos

❖ Deshidratar: pasos sucesivos y rápidos de alcohol/agua destilada/alcohol 50°/ alcohol 75°/alcohol 95°/alcohol de 100° y al final del procedimiento se sumergen en xileno hasta ser montadas para su posterior análisis en microscopia óptica.

6.3 INMUNOHISTOQUIMICA (IHC)

Una vez terminada la hidratación de los tejidos las láminas se colocan en jarras tipo hellendahl de vidrio, sumergidas en tampón 10mM de citrato de sodio di-hidratado (Panreac) pH 6 en agitación durante 5 minutos. Seguidamente se cambian a una cubeta tipo coplin de plástico con tampón 10mM de citrato de sodio di-hidratado pH 6 y se coloca en el autoclave a 115 °C durante 10 minutos para la recuperación antigénica. Se procede a una aclimatación a temperatura ambiente para luego realizar tres lavados con buffer TBST0.05% (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) pH7.4. Posteriormente se hace el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de 0,3% de H₂O₂ en metanol absoluto durante 20 minutos a temperatura ambiente.

A continuación las muestras se incuban en una disolución de suero de caballo (n°cat. 11510516 Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc) 1:20 en TBST 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente, con el objetivo de evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos [276]. Pese a que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel esencial en el epítipo de unión al anticuerpo, estas fuerzas también pueden promover la unión inespecífica. La mayoría de las proteínas tienen un cierto grado de hidrofobicidad debido a las cadenas laterales neutras de varios aminoácidos. La incubación de los tejidos con suero bovino o albúmina de suero inactivado por calor (BSA) es un procedimiento común que se utiliza para reducir la unión inespecífica hidrófoba. La selección del tipo de suero es importante para evitar interacciones con los anticuerpos primarios o secundarios, o con los tejidos que se inmunodetectan [276].

Al finalizar el bloqueo se realizan tres lavados de 5 minutos nuevamente con TBST para posteriormente con un lápiz con características hidrofóbicas PapPen (n° cat. Z377821-1EA Sigma) se dibuja un círculo rodeando el tejido, esperar aproximadamente 1 minuto para que se seque. La realización de este círculo permite que el volumen de la solución con el anticuerpo primario se mantenga sobre el corte y cubra el tejido mientras dura el proceso de inmunodetección. Se coloca, dependiendo el tamaño del tejido, entre 50-100 µL del anticuerpo primario en una solución de Antibody Diluent with Background Reducing Components (n° cat. S302281, Dako), que contenía 0.05% de suero de caballo (Sigma). Para la inmunohistoquímica de CBG se ha utilizado el anticuerpo Anti-SERPINA6/CBG goat anti-mouse polyclonal (n° cat. LSC150251, LifeSpan BioSciences) diluido 1:100. Para la elastasa se ha utilizado el anticuerpo Anti-elastasa M18 goat anti-mouse policlonal (sc-9521) diluido 1:400, F4/80 Anti-Emr1 clone sp115 rabbit monoclonal (n° cat. MAB10058 Abnova Corporation.). Posteriormente se incuban las láminas en una cámara húmeda, durante toda la noche a 4°C.

Se continúa con tres lavados de 5 minutos con TBST 0.05% pH 7,4 y se hace la incubación con los respectivos anticuerpos secundarios según sea el caso: policlonal rabbit anti-goat

(n° cat. PK-6105 Vector Labs), Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (n° cat. K401011 Dako). Se utilizó el anticuerpo secundario rabbit anti-goat a una dilución 1:400 en y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizan tres lavados de 5 minutos TBST0.05% y se procede a la tinción con el kit ABC (n° cat. PK-6105 VECTASTAIN®, Vector Laboratories). Se incubó con el preparado según las indicaciones del fabricante (Vector Laboratories, Inc, USA), media hora antes de la incubación, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento se hace con el fin de formar un complejo (Avidin Biotin Complex) para bloquear la biotina endógena[277]. El revelado de la inmunodetección se hizo por medio de una incubación con diaminobenzidina HCL (Sigma, USA). Para el kit Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit se siguieron las instrucciones del fabricante (Dako).

Luego de montar las preparaciones estas fueron escaneadas usando un Panoramic Digital Slide Scanner (3DHISTECH Ltd.) y se analizó la presencia de CBG usando el programa Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd.).

6.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS ADIPOCITOS A PARTIR DE PREPARACIONES TENIDAS CON H-E

A partir de cortes de tejido adiposo blanco epididimal y subcutáneo teñidos con H-E se determinó el tamaño de los adipocitos utilizando el software de análisis de imagen Fiji [278]. Para evitar cualquier error artefactual del software posteriormente se realizó un análisis manual de cada imagen donde se evaluó individualmente cada adipocito, descartando aquellos que estuviesen rotos. Se evaluaron un un mínimo de 100 adipocitos por animal y cuatro ratones por grupo experimental.

El análisis de las preparaciones histológicas se realizó mediante hizo en un microscopio óptico Olympus BX51 (Olympus Corporation) y las imágenes fueron adquiridas con una cámara acoplada al microscopio (DP70 Digital Camera) a través del programa de análisis de imagen OLYMPUS Stream image analysis (Olympus Corporation).

6.5. EVALUACION EN EL TEJIDO ADIPOSO DE LA INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS POR MEDIO DE IHC DE ELASTASA.

Para evaluar la infiltración de células polimorfonucleadas se realizó una IHC con un anticuerpo anti-elastasa, sobre preparaciones histológicas de tejido adiposo epididimal obtenidos de ratones WT y KO para la CBG de seis semanas de edad los cuales se sometieron a tratamiento con dieta según lo descrito en el apartado “modelo experimental” durante una semana.

El análisis se llevo a cabo contando las células inmunopositivas para elastasa. Se analizaron un total de diez campos por tejido y se determinó el porcentaje de neutrófilos en relación al número de adipocitos por campo. Se contaron un mínimo de 100 adipocitos por ratón y un mínimo de tres ratones.

6.6. EVALUACION EN EL TEJIDO ADIPOSO DE LAS CROWN LIKE STRUCTURE (CLS) POR MEDIO DE IHC DE F4/80.

Las CLS se forman exclusivamente en los sitios de la muerte de los adipocitos y su función es fagocitar los lípidos oxidados provenientes de los adipocitos muertos o necróticos. Estas estructuras estan compuestas de agregaciones de macrófagos rodeando los adipocitos necróticos y son representativas del estado inflamatorio del tejido [279].

Para evaluar la presencia de CLS se realizó una IHC con un anticuerpo anti-F4/80 en tejido adiposo epididimal procedente de ratones de seis semanas de edad sometidos a tratamiento con dieta según lo descrito en el apartado “modelo experimental” durante doce semanas.

El análisis se llevo a cabo contando el número de CLS en relación al número de adipocitos y se expresó en porcentaje. Se analizaron un total de 10 campos por ratón, contando un mínimo de 100 adipocitos por ratón y analizando un mínimo de tres ratones

RESULTADOS

**ALTERED LIPID PARTITIONING AND GLUCOCORTICOID AVAILABILITY IN
CBG-DEFICIENT MALE MICE WITH DIET-INDUCED OBESITY**

Jose Gulfo, Angelo Ledda, Elisabet Serra, Cristina Cabot, Montserrat Esteve, Mar Grasa

Obesity (2016) 24: 1677-1686. doi:10.1002/oby.21543

Altered Lipid Partitioning and Glucocorticoid Availability in CBG-Deficient Male Mice with Diet-Induced Obesity

José Gulfo^{1,2,3}, Angelo Ledda^{1,2,3}, Elisabet Serra¹, Cristina Cabot¹, Montserrat Esteve^{1,2,3*}, and Mar Grasa^{1,2,3*}

Objective: To evaluate how deficiency in corticosteroid-binding globulin (CBG), the specific carrier of glucocorticoids, affects glucocorticoid availability and adipose tissue in obesity.

Methods: C57BL/6 (WT) and CBG-deficient (KO) male mice were fed during 12 weeks with standard or hyperlipidic diet (HL). Glucocorticoid availability and metabolic parameters were assessed.

Results: Body weight and food intake were increased in KO compared with WT mice fed a standard diet and were similar when fed a HL diet. Expression of CBG was found in white adipose tissue by immunohistochemistry, real-time PCR, and Western blot. In obesity, the subcutaneous depot developed less in KO mice compared with WT, which was associated with a minor adipocyte area and peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression. Conversely, the epididymal depot displayed higher weight and adipocyte area in KO than in WT mice. CBG deficiency caused a fall of hepatic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and an increase in epididymal adipose tissue, particularly in HL mice.

Conclusions: Deficiency in CBG drives lipid partitioning from subcutaneous to visceral adipose depot under a context of lipid excess and differentially modulates 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression.

Obesity (2016) **24**, 1677-1686. doi:10.1002/oby.21543

Introduction

Corticosteroid-binding globulin (CBG) is the specific carrier of glucocorticoids in the blood. Although glucocorticoids are bound unspecifically to albumin, 80% to 90% of glucocorticoids bind to CBG with high affinity. The free hormone hypothesis attributes to CBG the ability to control the free fraction of glucocorticoids, able to enter into the cells and act (1,2). This control is possible through the regulation of the binding capacity and hormone affinity of CBG (3). However, some evidence points to a more active role for CBG, modulating directly the hormone action (4). Among them and the first to be established, the cleavage of CBG by serine proteases is a way to release cortisol exactly where these proteases are released, as elastase from neutrophils, in inflamed tissues (5). For that, CBG must be inside the tissue where inflammation develops. Evidence of membrane receptors has also been reported (6), and CBG expression has been detected in glucocorticoid target and producer tissues, such as the central nervous system, lung, and white adipose tissue (WAT) (7-9).

Glucocorticoids promote obesity in rodents and humans. Cushing syndrome, which is characterized by the uncontrolled production of glucocorticoids, elicits central obesity and insulin resistance, among other pathologies (10).

Data from humans carrying CBG mutations decreasing its affinity for cortisol indicate the lack of strong effects but subtle abnormalities, the most frequent of which are fatigue, increased sensitivity to pain, and hypotension (11). In some cases of null mutations, overweight or obesity have been reported (12).

Mice deficient in CBG failed to show alterations in body weight when submitted to a hyperlipidic diet (HL) providing 30% of energy from lipids (13). However, KO mice exhibited higher mortality in response to septic shock that pointed out an impaired anti-inflammatory action of glucocorticoids. Other authors reported in CBG-deficient mice an impaired response of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis to emotional stress (14).

¹ Department of Nutrition and Food Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain. Correspondence: Mar Grasa (mgrasa@ub.edu)
² CIBER Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain ³ Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Funding agencies: This research has received funding from the Fondo de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Ministry for Health and Consumer Affairs PI09/00505 (to ME). JG was the recipient of a predoctoral scholarship from the University of Barcelona, and AL was the recipient of a European and Sardinian scholarship "Master and Back."

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Author contributions: ME and MG conceived and design the experiments. JG, AL, ES, and CC carried out the experiments. JG and AL calculated data. ME, MG, JG, and AL analyzed data. All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions.

*Montserrat Esteve and Mar Grasa contributed equally to this work.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Received: 16 November 2015; **Accepted:** 6 April 2016; **Published online 21 June 2016.** doi:10.1002/oby.21543

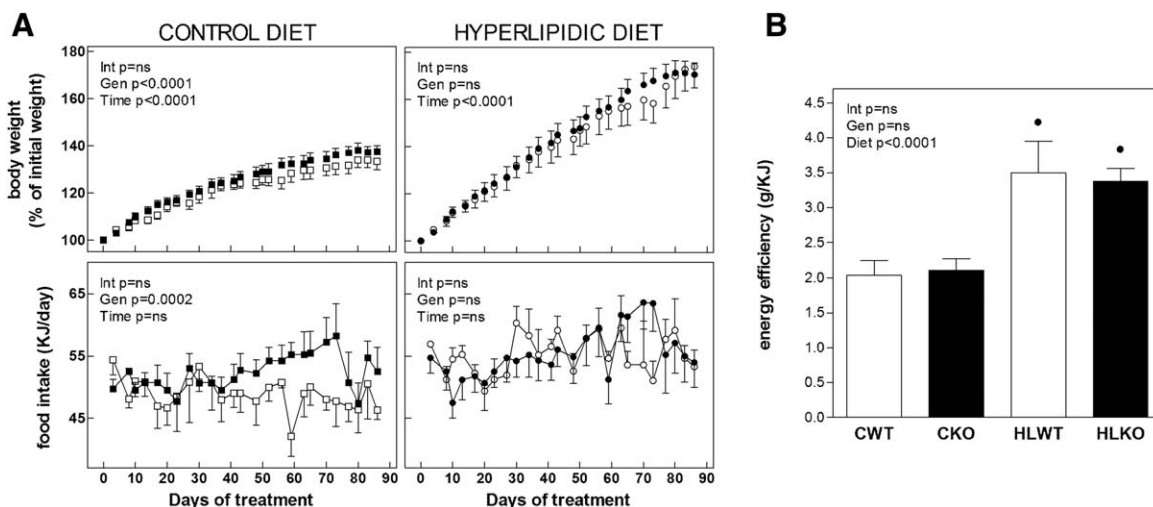


Figure 1 Changes in the (A) body weight and food intake and (B) energy efficiency of WT mice (open symbols) and KO mice (solid symbols) fed a control diet or a hyperlipidic diet. The numerical results of two-way ANOVA are specified only in cases in which $P < 0.050$. Genotype (Gen) and time (Time) were the two variables assessed. The interaction (Int) is also shown; ns = not significant. Significant Bonferroni post-test: *significant difference between control (C) and hyperlipidic (HL) -fed mice of the appointed genotype.

In this study, we aimed to address the consequences of CBG deficiency in the WAT features of mice submitted to diet-induced obesity. We subjected CBG-KO mice to a very high-fat diet (60%) and analyzed the changes in the metabolism and glucocorticoid signaling in WAT and also in liver, because of its importance in the overall glucocorticoid availability as the main source of plasma CBG and the high 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11HSD1) activity.

Methods

Animals and experimental protocol

Six-week-old wild-type (WT) and CBG-deficient (KO) male mice (C57BL/6) were used. The colony of WT and KO mice was established crossing heterozygous animals (generously provided by Dr. T.E. Willnow).

The WT and KO mice were distributed into two groups of 6 to 10 animals, 2 to 4 mice per cage. During 12 weeks, the mice were fed a control diet (C) or a HL that provided 18% and 60% of the energy from fat, respectively (Teklad Global 2018 and TD.06414, Harlan-Interfauna Ibérica). Mice were sacrificed under isoflurane anesthesia between 9.00 and 11.00 a.m. The procedures were conducted in accordance with the guidelines for the use of experimental animals established by the European Union, Spain, and Catalonia and were approved by the Animal Handling Ethics Committee of the University of Barcelona.

Determination of total and free corticosterone

Pools of serum from mice belonging to the same group were centrifuged in Centrifree micropartition devices (YM membranes, MW cutoff of 30,000; Merck Millipore). Ultrafiltrates and intact serum were assayed for free and total corticosterone using an enzyme immunoassay (DetectX® Kit K014-H1, Arbor Assays).

CBG binding capacity

CBG binding capacity was evaluated through ^3H -corticosterone binding as previously reported (15).

Western blot of CBG

Proteins from WAT were isolated using the TRI-Reagent (Life Technologies) and quantified with a QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma). Tissue protein (25 μg) and serum (1 μL) were separated by SDS/PAGE and electrotransferred onto a PVDF membrane (Millipore). Membranes were incubated overnight with anti-CBG antibody (LS-C39044, Life-Span) and as loading control, anti- β -actin antibody, (A-5316, Sigma), or anti-albumin (sc-46293, Santa Cruz Biotechnology).

Immunodetection was performed with Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific) and quantified using Total Lab v2003.3 (Non-Linear Dynamics).

Serum metabolites and hormones

Glucose, triacylglycerols, cholesterol, urea, (Biosystems), NEFAs (Wako), insulin, and leptin (Ultra-Sensitive ELISA, Crystal Chem Inc.) were measured in serum.

Liver glycogen and lipid content

Liver samples were used for the determination of glycogen as glycosyl residues (16). Lipids from liver were extracted with trichloromethane-methanol (2:1), dried and weighed (17).

Real-time PCR expression analysis

Total RNA from liver, subcutaneous, and epididymal WAT was extracted using TRI-Reagent, reverse-transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Promega) and oligo-dT primers (Attendbio). Real-time PCR was conducted with SYBRGreen Master Mix (Life Technologies) on an ABI PRISM 7900 HT system (Applied

TABLE 1 Tissue weights

Group	Liver	Thymus	Adrenal (mg, %)	Epididymal WAT	Inguinal sc WAT	Retroperitoneal WAT	Mesenteric WAT
CWT							
g	1.41 ± 0.06	0.085 ± 0.015	3.83 ± 0.21	0.232 ± 0.049	0.146 ± 0.028	0.076 ± 0.020	0.293 ± 0.036
%	4.65 ± 0.14	0.274 ± 0.041	0.127 ± 0.009	0.748 ± 0.134	0.468 ± 0.074	0.244 ± 0.057	0.949 ± 0.087
CKO							
g	1.37 ± 0.06	0.065 ± 0.007	5.4 ± 0.8	0.276 ± 0.055	0.157 ± 0.019	0.099 ± 0.015	0.308 ± 0.032
%	4.49 ± 0.21	0.215 ± 0.025	0.172 ± 0.028	0.864 ± 0.146	0.499 ± 0.049	0.315 ± 0.042	0.975 ± 0.083
HLWT							
g	1.72 ± 0.12	0.123 ± 0.018	4.31 ± 0.32	0.766 ± 0.092*	0.467 ± 0.080*	0.251 ± 0.027*	0.670 ± 0.097*
%	4.32 ± 0.20	0.310 ± 0.045	0.109 ± 0.005	1.89 ± 0.17*	1.13 ± 0.14*	0.620 ± 0.045*	1.64 ± 0.16*
HLKO							
g	1.56 ± 0.10	0.088 ± 0.013	5.23 ± 0.49	0.811 ± 0.069*	0.297 ± 0.055**	0.285 ± 0.017*	0.503 ± 0.063*
%	4.19 ± 0.14	0.232 ± 0.029	0.141 ± 0.012	2.176 ± 0.154*	0.764 ± 0.115**	0.779 ± 0.063*	1.33 ± 0.12*
ANOVA							
Int							
g	ns	ns	ns	ns	0.0895	ns	ns
%	ns	ns	ns	ns	0.0621	ns	ns
Gen							
g	ns	0.0487	0.0419	ns	ns	ns	ns
%	ns	0.0550	0.0482	ns	ns	0.0473	ns
Diet							
g	0.0108	0.0301	ns	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001
%	0.0979	ns	ns	0.0014	0.0001	<0.0001	0.0001

Tissue weights of WT mice or KO mice fed a control diet (C) or a high-fat diet (HL), expressed as grams and percentages respective to body weight (in the case of adrenal gland, in mg and per thousand respective to body weight). The numerical results of two-way ANOVA are specified only in cases in which $P < 0.100$. Genotype (Gen) and diet (Diet) were the two variables assessed. The interaction (Int) is also shown when $P < 0.100$. All values are mean ± SEM. Significant Bonferroni post-test: *significant difference between WT and KO under the appointed diet and **significant difference between C and HL-fed mice of the appointed genotype.

Biosystems). The primers used for glucose-6-phosphate transporter (G6PT), hexose-6-phosphate dehydrogenase (H6PDH), CBG, 11HSD1 or 11HSD2, fatty acid translocase (FAT/CD36), 5 α -reductase (5 α R), lipoprotein lipase (LPL), leptin (LEP), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ and ribosomal protein L32 as housekeeping are listed in the Supporting Information (Table S1). The $\Delta\Delta C_t$ method was used for relative quantifications. Data were calculated as percentage respective to CWT group, which was normalized to 100.

Histological and immunohistochemical analysis of WAT

Liver, epididymal, and subcutaneous WAT were dissected and fixed in 40 g/L paraformaldehyde. Then, samples were embedded in paraffin and sections of 5 μ m were stained with eosin-hematoxylin and visualized under optical microscope (Olympus BX-51). Image stacks were captured (Olympus DP-70) and adipocyte areas were analyzed using the Fiji ImageJ (18). A minimum of 100 adipocytes per mouse and four mice per group were measured. A manual revision was performed of the automatically detected adipocytes by the software in order to exclude broken or cut cells.

For immunohistochemical detection of CBG, sections were incubated with anti-CBG and the detection was performed with an

avidin-biotin peroxidase complex (Vecstatin ABC kit, Vector Labs) using diaminobenzidine. Slides were scanned and visualized using the Panoramic Viewer 1.15.2 software (3DHitech Ltd).

Statistics

The data were analyzed using GraphPad 5.0 and are expressed as mean ± SEM. Normality of the data was assessed by the Shapiro-Wilk normality test. Statistical comparisons were obtained by two-way ANOVA to evaluate the impact of time or diet and genotype (named Time, Diet, and Gen, respectively in the graphs). Interaction significance is also included (Int). A significant interaction would denote a different response in mice of each genotype depending on the diet. The Bonferroni post-test was used as a multiple comparisons method to evaluate significant differences between pairs of data. Student's t -test was used to compare CWT and HLWT mice when KO data was missing. Significance was considered with P values below 0.05.

Results

Body and tissue weights and food intake

The KO mice fed with the control diet (CKO) showed body weights slightly but consistently higher than WT (CWT) mice (Gen $P < 0.0001$). Accordingly, KO mice exhibited an increased energy intake (Figure 1A)

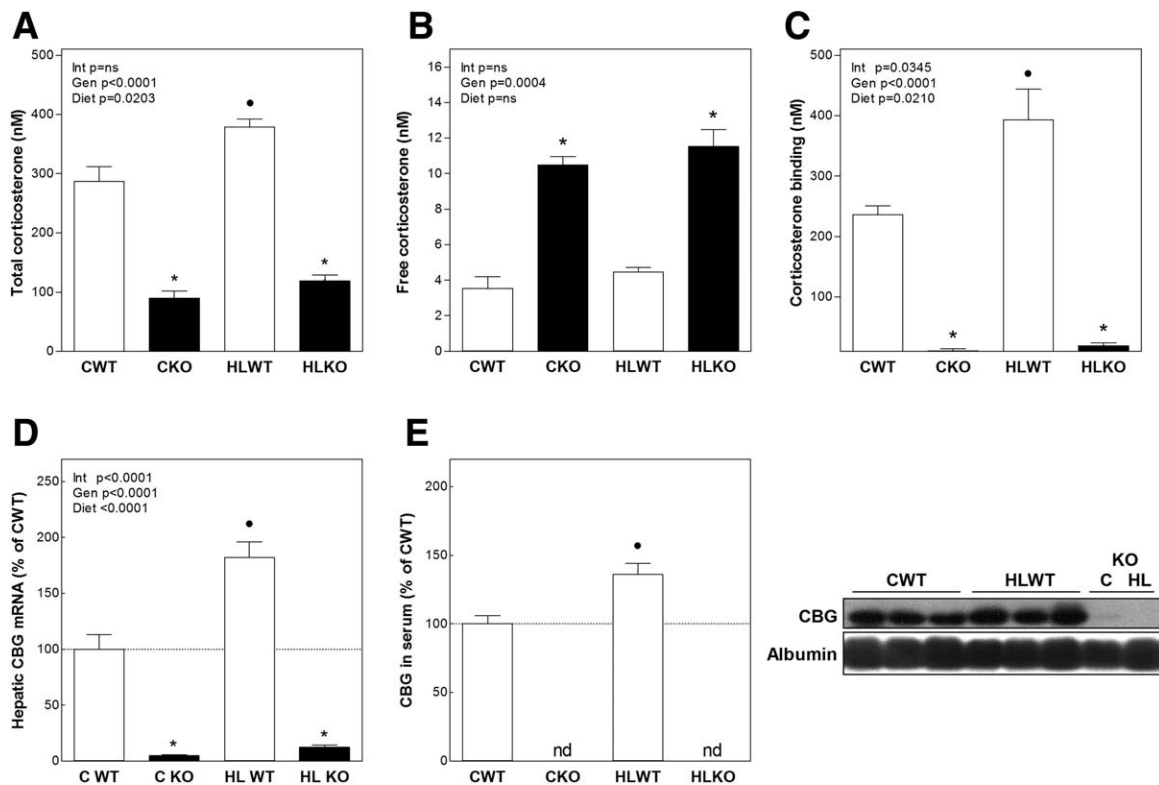


Figure 2 Levels of (A) total and (B) free serum corticosterone, (C) serum corticosterone binding, (D) corticosteroid-binding globulin (CBG) mRNA expression in the liver, which is the main source of blood CBG, and (E) serum CBG protein of WT and KO mice fed a control diet (CWT and CKO) or a hyperlipidic diet (HLWT and HLKO). The numerical results of two-way ANOVA are specified only in cases in which $P < 0.050$. Genotype (Gen) and diet (Diet) were the two variables assessed. The interaction (Int) is also shown; ns = not significant. Significant Bonferroni post-test: *Significant difference between WT and KO under the appointed diet and *significant difference between C and HL-fed mice of the appointed genotype.

and similar energy efficiency (Figure 1B). The HL diet induced the same increase in body weight and food intake in mice of both genotypes. WT and KO mice fed with HL diet (HLWT and HLKO) exhibited the same energy efficiency, which was 1.75-fold higher than in mice fed with control diet (Figure 1A, B).

The tissue weights of the different groups are shown in Table 1. Changes in thymus and adrenal weights were observed in the KO mice compared with WT. Thymus weight showed a significant reduction in KO (Gen $P = 0.0487$), whereas adrenals were larger (Gen $P = 0.0419$). HL diet caused an increase of the thymus in

TABLE 2 Serum parameters

	Glucose (mM)	Insulin (ng/mL)	Leptin (ng/mL)	Triacylglycerols (mM)	NEFA (mM)	Cholesterol (mM)	Urea (mM)
CWT	9.3 ± 0.7	0.525 ± 0.076	3.35 ± 0.31	1.34 ± 0.32	0.128 ± 0.022	3.37 ± 0.17	8.4 ± 0.3
CKO	9.3 ± 0.3	0.589 ± 0.093	5.82 ± 1.02	0.99 ± 0.08	0.145 ± 0.019	3.51 ± 0.26	8.1 ± 0.6
HLWT	12.0 ± 0.5*	0.956 ± 0.241	44.2 ± 8.0*	1.09 ± 0.12	0.134 ± 0.014	4.15 ± 0.21	9.3 ± 0.5
HLKO	11.8 ± 0.6*	0.996 ± 0.317	37.5 ± 5.4*	0.91 ± 0.07	0.162 ± 0.014	4.40 ± 0.40	7.7 ± 0.4
ANOVA							
Int	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gen	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Diet	<0.0001	0.0503	<0.0001	ns	ns	0.0172	ns

Serum parameters evaluated in WT mice and KO mice fed a standard diet (CWT and CKO) or a high-fat diet (HLWT and HLKO). The numerical results of two-way ANOVA are specified only in cases in which $P < 0.100$. Genotype (Gen) and diet (Diet) were the two variables assessed. The interaction (Int) is also shown; ns = not significant. All values are mean ± SEM. Significant Bonferroni post-test: *significant difference between C and HL-fed mice of the appointed genotype.

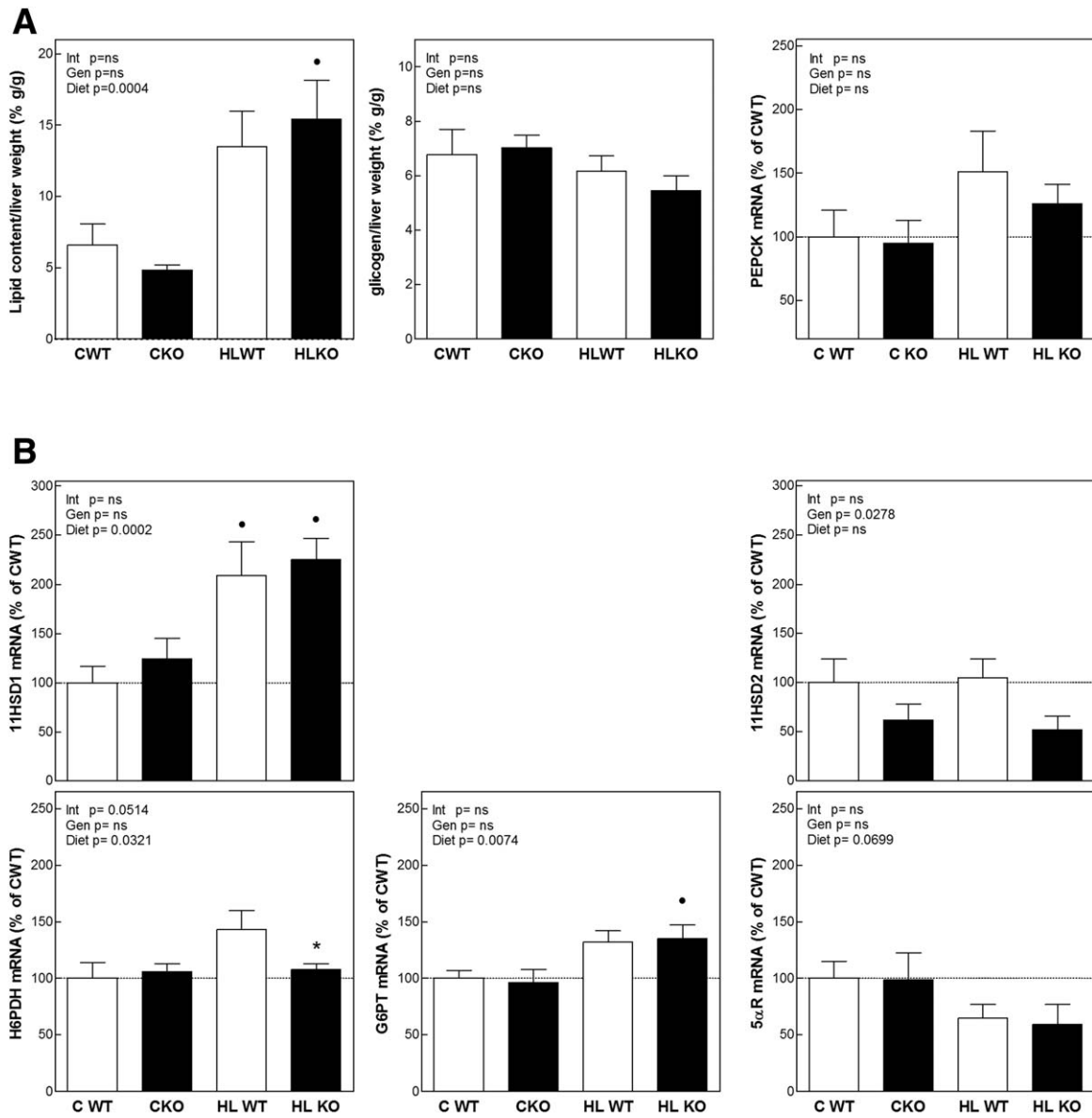


Figure 3 Lipid and glycogen liver content and hepatic gene mRNA expression in WT mice and KO mice fed a standard diet (CWT and CKO) or a hyperlipidic diet (HLWT and HLKO). (A) Lipid and glycogen in liver and hepatic PEPCK mRNA expression and (B) expression of genes involved in glucocorticoid pre-receptor metabolism in the liver (11HSD1, 11HSD2, H6PDH, and G6PT). The two-way ANOVA statistical *P* values are depicted in each graph only in cases in which *P* < 0.050. Genotype (Gen) and diet (Diet) were the two variables assessed. The interaction (Int) is also shown; ns = not significant. Significant Bonferroni post-test: *Significant difference between WT and KO under the appointed diet and •significant difference between C and HL-fed mice of the appointed genotype.

both genotypes (Diet *P* = 0.0301) but did not affect adrenal weight. The liver remained unchanged in KO mice respective to WT but increased in both groups of mice with HL diet (Diet *P* = 0.0108).

All WAT depots shared similar weights in WT and KO mice under control diet. However, when fed HL diet, KO mice exhibited a significantly lower subcutaneous WAT accumulation than WT mice (Bonferroni test between HLWT and HLKO *P* < 0.05), whereas among visceral depots, the retroperitoneal WAT was significantly higher in KO mice when expressed as % of total body weight (Gen *P* = 0.0473) and the epididymal showed a trend to increase.

Circulating corticosterone and CBG levels

Total serum corticosterone was markedly reduced in KO mice (Gen *P* < 0.0001, Figure 2A) whereas free corticosterone was increased (Gen *P* = 0.0004, Figure 2B) compared with WT irrespective of the diet consumed. HL diet consumption increased total corticosterone more intensively in WT mice (Diet *P* = 0.0203, Bonferroni between CWT and HLWT *P* < 0.05) but without altering free corticosterone. This could be due to the increased corticosterone binding (Diet *P* = 0.0210, Figure 2C), in agreement with the raise of serum CBG (Student's *t*-test *P* < 0.05, Figure 2E) and the hepatic CBG expression (Diet *P* < 0.0001, Figure 2D). In the KO mice, as expected, there

was no significant specific corticosterone binding in the serum, and CBG band was not observed by Western blot.

Serum metabolites and hormones

Values of serum metabolites and hormones are included in Table 2. CBG deficiency did not significantly alter any plasma parameter. The HL diet elicited similar increases in serum glucose, insulin, leptin, and cholesterol levels of WT and KO mice.

Liver metabolic parameters

Lipid and glycogen liver content did not change as a consequence of CBG deficiency, irrespective of the diet provided. As expected, HL diet spurred the hepatic lipid accumulation (Diet $P = 0.0004$, Figure 3A) more sharply in KO (Bonferroni between CKO and HLKO $P < 0.05$).

Expression of the glucocorticoid target gene PEPCK, the main regulator of gluconeogenic activity in the liver, did not change as a consequence of diet or CBG deficiency.

Expression of genes involved in glucocorticoid availability

We assessed the mRNA expression of the main enzymes involved in glucocorticoid reactivation (11HSD1, H6PDH, and G6PT) and inactivation (11HSD2 and 5 α R) in liver (Figure 3B). The only change caused by CBG deficiency was a fall of 11HSD2 mRNA in both mice fed control and HL diets (Gen $P = 0.0278$). HL diet boosted 11HSD1 (Diet $P = 0.0002$) and G6PT expression (Diet $P = 0.0074$) in both WT and KO mice. Expression of H6PDH was only increased in WT but not in KO mice (Diet $P = 0.0321$, Int = 0.0514). In contrast, the HL diet tended to reduce 5 α R expression (Diet $P = 0.0699$), whereas 11HSD2 remained unaltered.

With the exception of 5 α R, the same gene expressions were quantified in epididymal and subcutaneous WAT (Figure 4). CBG deficiency elicited two depot-specific changes: a sustained increase in 11HSD2 expression in KO compared with WT (Gen $P = 0.0035$ and Bonferroni test between HLWT and HLKO $P < 0.05$) in epididymal WAT, and in subcutaneous, 11HSD1 expression was markedly reduced in KO mice fed control diet respective to WT (Gen = 0.067 and Int = 0.0497, Bonferroni test between CWT and CKO $P < 0.05$). HL diet consumption triggered the reduction of 11HSD1 mRNA in epididymal tissue of WT and KO mice (Diet $P = 0.0242$) and in the WT subcutaneous depot (Diet $P = 0.0196$ and Int = 0.0497). Changes due to HL diet in 11HSD2 expression were depot-dependent: in the epididymal depot, 11HSD2 expression increased in WT and KO mice (Diet $P = 0.013$), but in subcutaneous, 11HSD2 expression decreased in a similar extent in both WT and KO mice (Diet $P = 0.0367$). H6PDH expression increased in the subcutaneous WAT of all HL-fed mice (Diet $P = 0.0031$) but remained unaltered in the epididymal WAT. G6PT expression did not change in any depot.

CBG in WAT

CBG was detected by immunohistochemistry in sections of liver and WAT from WT mice fed with control and HL diets (Figure 5A). Liver and WAT from KO mice and from WT mice where the primary antibody was omitted were used as negative controls

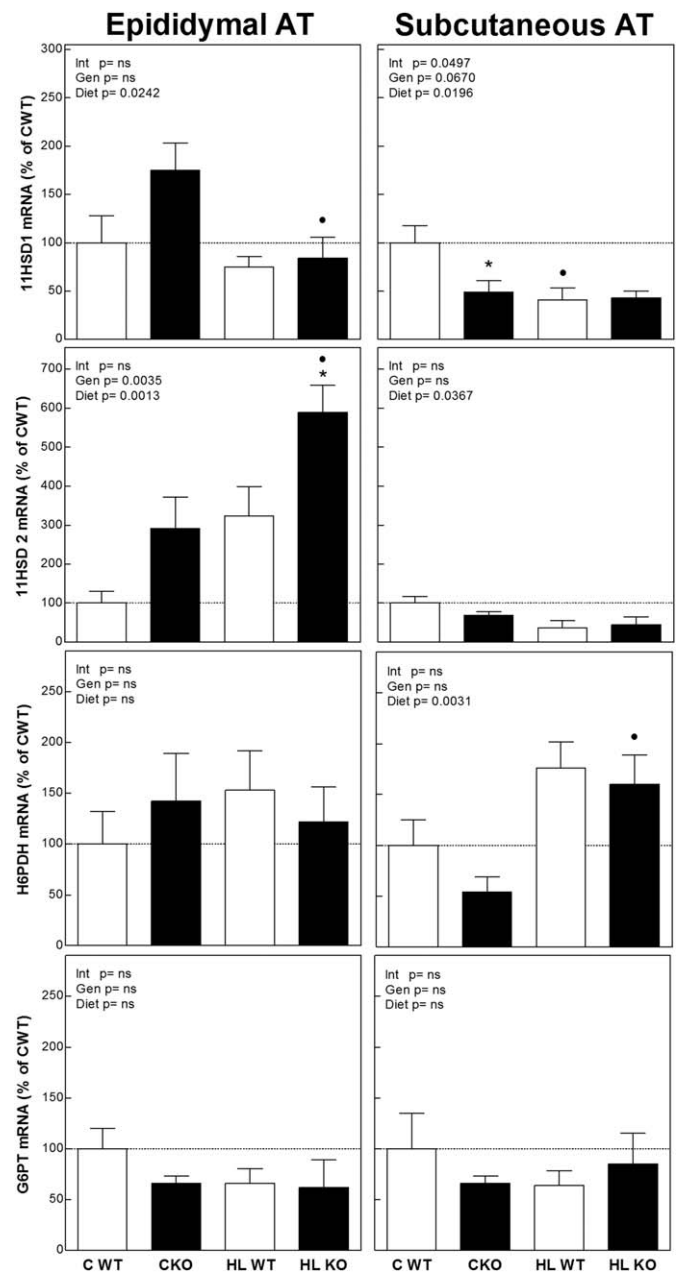


Figure 4 Expression of genes involved in glucocorticoid pre-receptor metabolism in epididymal and subcutaneous adipose tissue (AT) in WT mice and KO mice fed a standard diet (CWT and CKO) or a hyperlipidic diet (HLWT and HLKO). Expression of 11HSD1, 11HSD2, H6PDH, and G6PT in epididymal adipose tissue (left column) and subcutaneous adipose tissue (right column). The two-way ANOVA statistical P values are depicted in each graph only in cases in which $P < 0.050$. Genotype (Gen) and diet (Diet) were the two variables assessed. The interaction (Int) is also shown; ns = not significant. Significant Bonferroni post-test: *Significant difference between WT and KO under the appointed diet and *significant differences between C and HL-fed mice of the appointed genotype.

(in Figure 5A labeled as C-). CBG mRNA was found in both epididymal and subcutaneous WAT (Figure 5B). HL diet heightened CBG mRNA in both depots, significantly in the epididymal. Despite this, CBG protein showed a nonsignificant decrease either in epididymal and subcutaneous WAT.

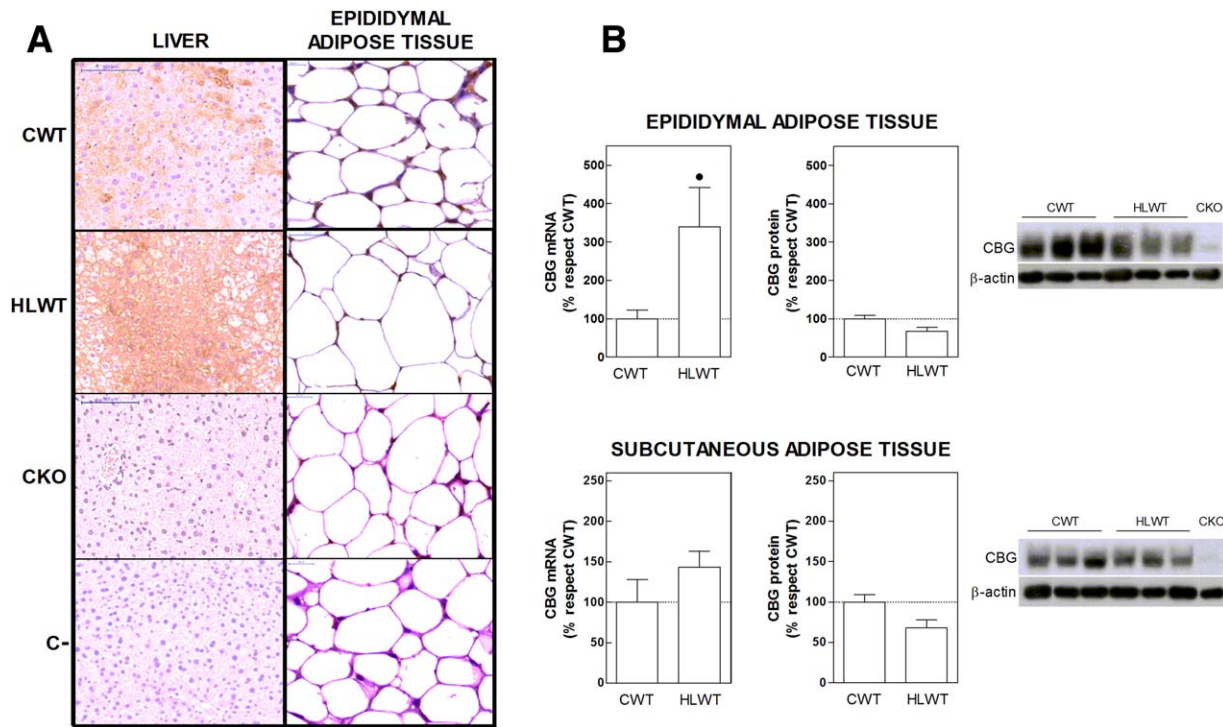


Figure 5 Corticosteroid-binding globulin (CBG) in white adipose tissue. (A) The immunohistochemistry results of CBG are shown in liver, which was used as a positive control, and epididymal adipose tissue. The subcutaneous adipose tissue was also analyzed, and similar results were obtained. Negative controls are adipose tissue of KO mice fed with the control diet (CKO) and adipose tissue of WT mice fed with the control diet (CWT) without primary antibody (C-). (B) CBG mRNA (left) and CBG protein (right) in epididymal and subcutaneous adipose tissue. Significant Student's *t*-test: *significant difference ($P < 0.050$) between CWT and WT mice fed hyperlipidic diet (HLWT).

Adipocyte area and expression of metabolic genes in WAT

Mean area and the frequency of distribution by area of epididymal and subcutaneous adipocytes are shown in Figure 6A. Adipocytes from epididymal WAT were larger than those from the subcutaneous, irrespective of the diet or mice genotype. Adipocytes from both depots of KO mice fed with control diet tended to be smaller than those of WT mice. However, with HL diet, epididymal adipocytes from KO mice exhibited a 2.5-fold increase in area, whereas adipocytes from WT presented only a 1.5-fold increase (Gen $P < 0.00001$ and diet $P < 0.0001$). In contrast, adipocytes from the subcutaneous depot of KO mice showed a minor increase—1.9-fold—than the 2.3-fold increase in those from WT (Gen $P < 0.00001$ and diet $P < 0.0001$).

The mRNA expression of LPL, FAT/CD36, leptin, and PPAR- γ in both depots was also assessed (Figure 6B). CBG deficiency failed to change LPL expression, whereas the HL diet increased LPL expression only in epididymal adipose tissue. In both depots of WT and KO mice, the HL diet increased the FAT/CD36 and LEP mRNA levels. PPAR- γ expression increased in epididymal WAT of WT mice fed with HL diet, whereas in KO there was a sustained higher expression level, regardless of the diet (Diet = 0.0645, Int = 0.02 and Bonferroni between CWT and CKO $P < 0.05$). Conversely, in the subcutaneous depot of KO mice, a sustained decrease in PPAR- γ expression was observed (Gen = 0.0443).

Discussion

Mutations that affect CBG binding affinity, capacity, or protease sensitivity are emerging targets for clinical assessment in diseases associated with abnormalities in cortisol levels or activity (19). Human carriers of these mutations usually present hypocortisolemia or low cortisol levels within the normal range (11). In most cases of human CBG null mutations, fatigue and hypotension have been reported suggesting adrenal insufficiency. In some cases, overweight or obesity (12) as well as redistribution of adipose tissue to the visceral depot are present (20), typical features of glucocorticoid excess, even subtle, like those observed in patients with adrenal incidentalomas (21).

Our model of CBG-deficient mice presented high free corticosterone (2.5-fold more than WT) but low total corticosterone levels (three to fourfold lower) as previously reported (13). According to the free hormone hypothesis, this would be a model of glucocorticoid excess. Thymus involution, observed in KO mice, is the expected response to sustained high glucocorticoid levels (16). Conversely, the adrenal increased in KO mice, a feature associated with adrenal hyperactivity in response to an active HPA axis. An increased adrenal gland has been associated with high circulating corticosterone levels (22,23). The reason of the fall in total corticosterone in CBG-deficient mice could be the accelerated blood corticosterone clearance previously described (13). Adrenal hypertrophy in KO mice could be an attempt to compensate the depleted corticosterone levels

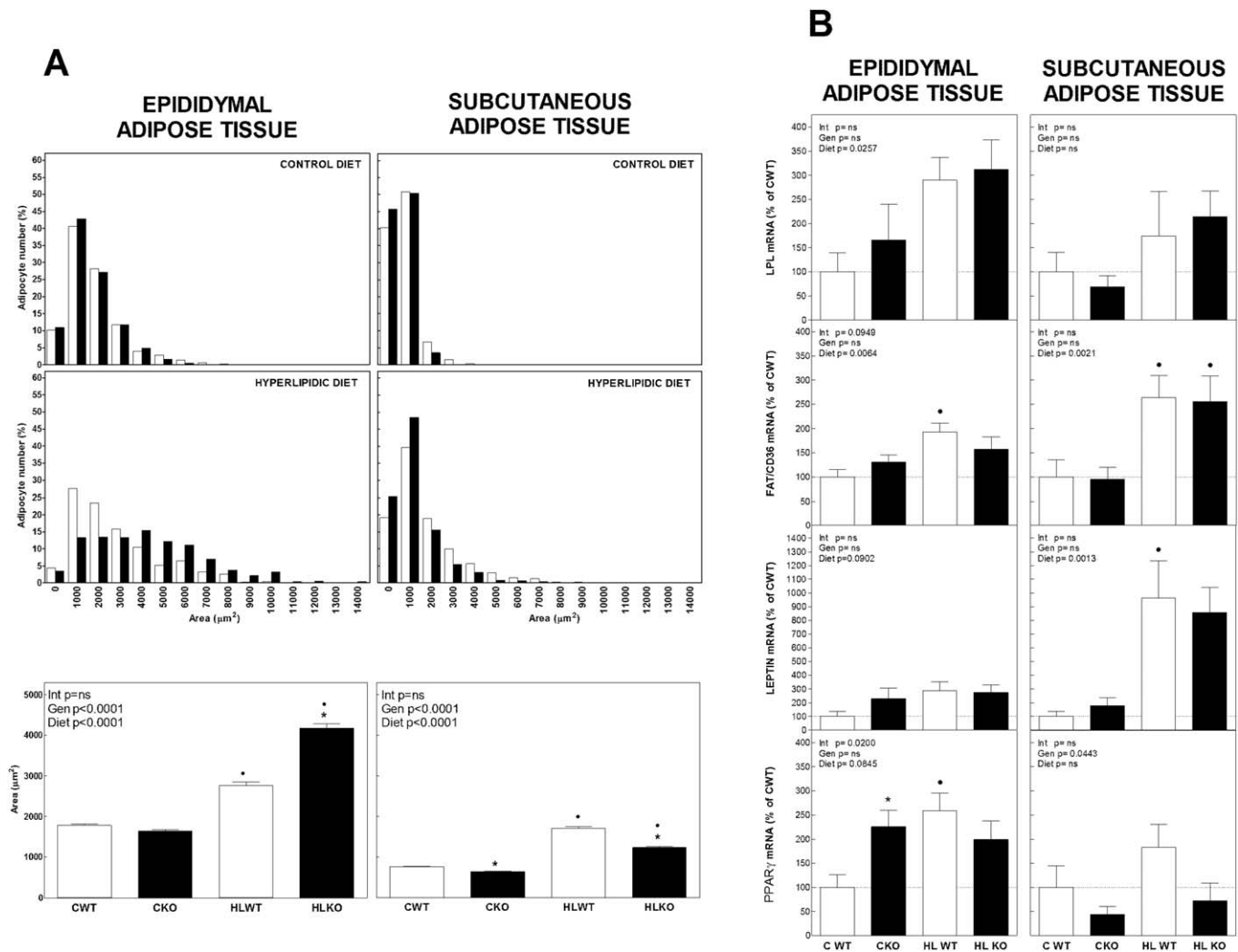


Figure 6 Adipocyte area and expression of metabolic genes in epididymal and subcutaneous adipose tissue in WT mice and KO mice fed a standard diet (CWT and CKO) or a hyperlipidic diet (HLWT and HLKO). **(A)** The adipocyte area measurements from epididymal and subcutaneous adipose tissue were evaluated. The frequency of area distribution (upper graph for control diet and intermediate graph for HL diet) and total mean area (bottom graph) are depicted. **(B)** The epididymal and subcutaneous mRNA expression levels of some metabolic genes are also shown. The two-way ANOVA statistical *P* values are depicted in each graph (ns = not significant). The significant differences determined by Bonferroni method are: *significant difference between WT and KO of the appointed diet and *significant difference between C and HL-fed mice of the appointed genotype. The open bars correspond to the WT data, and the black bars correspond to the data from the KO mice.

triggered by its high turnover. In any case, further research is needed to assess adrenal functioning in CBG-deficient mice.

It is known that the glucocorticoid action on rodent body weight follows a bell-shaped curve (24,25), in which sustained moderate levels of total corticosterone render an increase in body weight, whereas pharmacological chronic levels causes body weight reduction (26). Previously published data (13) show that CBG-deficient mice presented a body weight comparable to WT mice, even after an overnight fasting or after having been fed with HL diet (30% of the energy derived from fat) during a period of 6 weeks. In our study, body weight and food intake were recorded over a period of 12 weeks in mice under a standard diet or a more extreme HL diet containing 60% of the energy derived from fat. CBG-deficient mice subjected to the control diet showed a slightly larger body weight

than WT mice, beside a higher food intake. This is a corticosterone effect observed when normal insulin levels are present (27), i.e., under the control diet. It was reasonable to expect a further increase in the body weight of CBG-deficient mice fed with HL diet taking into account that corticosterone, in the presence of high insulin levels, boosts the drive to eat (27). However, no differences in body weight or food intake were observed. In WT mice, diet-induced obesity elicited serum corticosterone and binding increases at the same time that CBG increased in serum and liver. Although free corticosterone did not change, it is possible that the increase in total corticosterone levels observed in WT matched the corticosterone effect on HLKO mice. Glucocorticoids are known inhibitors of CBG expression (28). Therefore, the corticosterone increase observed in WT mice fed with HL diet could be secondary to the CBG up-regulation, a consequence of diet-induced obesity.

Immunohistochemistry revealed locally established CBG in WAT, as previously reported in rats (9). We detected limited CBG mRNA expression (around 30 cycles vs. 19 in liver) but significant CBG protein. Hence CBG entry from blood into adipose tissue cannot be ruled out. In addition, the fact that CBG protein in adipose tissue did not change in HLWT mice despite the expression increase in the epididymal depot and plasma, points to a post-translational regulation or a CBG secretion to the blood. The function of CBG in WAT remains uncertain, but taking into account its function in plasma, CBG may also regulate the free glucocorticoid fraction in the adipose tissue.

CBG deficiency promoted the storage of lipids in visceral instead of subcutaneous adipose tissue. This is in agreement with the known glucocorticoid regulation of lipid partitioning, i.e., in a model of glucocorticoid and insulin excess (29) such as the HL diet. Our results point out that reduced subcutaneous weight and adipocyte area in KO mice can be mediated at least in part by the blunted PPAR- γ expression found in this depot.

The glucocorticoid action is highly modulated by its local availability, consequence of circulating glucocorticoid levels, and the intracellular activation/inactivation balance. It is well established that the decay of 11HSD1 expression in WAT of mice with diet-induced obesity (30), is a way to protect the tissue against further metabolic derangements. Despite the fact that 11HSD2 is mainly found in mineralocorticoid target tissues, a minor but significant expression has been found in liver (31) and WAT (32-34). In male rats WAT, 11HSD2 expression correlated with body weight and fat content (33). However, the scarce literature available is inconclusive: after diet-induced obesity, authors have reported normal 11HSD2 expression in the subcutaneous depot but high in the retroperitoneal fat pad (33) and others, a reduced 11HSD2 expression in subcutaneous adipose tissue in mice submitted to HL diet (34). In our hands, WT mice with obesity showed an increased 11HSD2 expression in epididymal WAT and a decreased expression in subcutaneous WAT whereas hepatic 11HSD2 did not change. CBG deficiency reduced 11HSD2 expression in liver irrespective of the diet and in the epididymal depot, spurred a further increase in 11HSD2 expression in addition to the increase promoted by the HL diet previously described (33). The consequence of 11HSD2 reduction would be the increase in corticosterone availability due to its reduced inactivation. But recently, the analysis of a KO mice deficient in 11HSD2 has revealed reduced adipose tissue probably induced by the drop in glucocorticoid signaling (35). The authors propose that the absence of 11HSD2 would limit substrate availability for 11HSD1 and therefore local regeneration to active glucocorticoid. In the liver, the HL diet promoted corticosterone availability through increased 11HSD1, as previously reported (30), and decreased the 5 α -reductase, which is involved in its inactivation without changes in KO mice. In this context, and taking into account the lack of up-regulation of PEPCK expression and the normal accumulation of lipids and glycogen in CBG-deficient mice, suggesting normal glucocorticoid signaling, the decrease of 11HSD2 mRNA would reduce 11-dehydrocorticosterone availability. In the KO mice, the epididymal 11HSD2 mRNA increase in WAT would react by inactivating glucocorticoids and counteract the enlargement of adipocyte area. Petersen et al. also found normal hepatic PEPCK expression in CBG-deficient mice suggesting the need of CBG to mediate glucocorticoid action in liver (13). Regulation of 11HSD2 would be a mechanism of glucocorticoid availability control inside tissues other than mineralocorticoid

targets as recently observed in lung of pancreatitis-induced mice deficient in CBG (15).

In conclusion, CBG deficiency causes an environment high in free glucocorticoids although low in circulating total corticosterone which, under a context of lipid excess, drives lipid partitioning from subcutaneous to visceral adipose tissue without further alterations in food intake or in body weight. In addition, the fact that CBG localizes in WAT beyond blood suggests that WAT is a sensitive tissue to CBG alterations where it would act as a controller of glucocorticoid availability inside the tissue. Our data highlight the role of CBG in the fine control of optimal corticosterone availability and point to the need to evaluate CBG in tissues to completely understand glucocorticoid action. Thus, under some environmental disturbances where the HPA axis is activated, such as unbalanced diet, septic shock (13), or stress (14), alterations in binding and capacity properties of CBG would magnify glucocorticoid action inside target tissues and as a consequence have an impact on adipose tissue architecture. **O**

Acknowledgments

Thanks are given to Dr. Thomas E. Willnow for the CBG-deficient mice and Dr. Luc Marti and Dr. Antonio Armario for their valuable comments. We thank the technical help of Biobank core facility and Dr. Raquel Bermudo.

© 2016 The Obesity Society

References

- Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 1989;10:232-274.
- Lewis JG, Bagley CJ, Elder P. a, Bachmann AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta* 2005;359:189-194.
- Chan WL, Carrell RW, Zhou A, Read RJ. How changes in affinity of corticosteroid-binding globulin modulate free cortisol concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3315-3322.
- Cizza G, Rother KI. Cortisol binding globulin: more than just a carrier? *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:77-80.
- Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:34-39.
- Rosner W. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr Rev* 1990;11:80-91.
- Minni AM, Dorey R, Piérard C, et al. Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval. *Endocrinology* 2012;153:4766-4774.
- Hammond GL, Smith CL, Goping IS, et al. Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5153-5157.
- del Mar Grasa M, Cabot C, Adán C, et al. Corticosteroid-binding globulin synthesis and distribution in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem* 2001;228:25-31.
- Prague JK, May S, Whitelaw BC. Cushing's syndrome. *BMJ* 2013;346:f945.
- Gagliardi L, Ho JT, Torpy DJ. Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:24-34.
- Torpy DJ, Bachmann AW, Grice JE, et al. Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3692-3700.
- Hill LA, Vassiliadi DA, Simard M, et al. Two different corticosteroid-binding globulin variants that lack cortisol-binding activity in a greek woman. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:4260-4267.
- Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, et al. Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol* 2006;26:7236-7245.

15. Richard EM, Helbling J-C, Tridon C, et al. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 2010;151:649-659.
16. Gulfo J, Ledda A, Gea-sorlí S, Bonjoch L, Closa D. New roles for corticosteroid binding globulin and opposite expression profiles in lung and liver. *Plos One* 2016; 11(1):e0146497.
17. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676-682.
18. Simard M, Hill LA, Lewis JG, Hammond GL. Naturally occurring mutations of human corticosteroid-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E129-E139.
19. Muscogiuri G, Colao A, Orio F. Insulin-mediated diseases: adrenal mass and polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:512-514.
20. Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2013;380:89-98.
21. Gulvady AA, Ciolino HP, Cabrera RM, Jolly CA. Resveratrol inhibits the deleterious effects of diet-induced obesity on thymic function. *J Nutr Biochem* 2013;24:1625-1633.
22. Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Balasch J. Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sci* 1985;36:2085-2092.
23. Johnson EO, Kamilaris TC, Calogero AE, Gold PW, Chrousos GP. Experimentally-induced hyperthyroidism is associated with activation of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Endocrinol* 2005;153:177-185.
24. Grasa MM, Serrano M, Fernández-López JA, Alemany M. Corticosterone inhibits the lipid-mobilizing effects of oleoyl-estrone in adrenalectomized rats. *Endocrinology* 2007;148:4056-4063.
25. Devenport L, Knehans A, Sundstrom A, Thomas T. Corticosterone's dual metabolic actions. *Life Sci* 1989;45:1389-1396.
26. Beaudry JL, D'souza AM, Teich T, Tsushima R, Riddell MC. Exogenous glucocorticoids and a high-fat diet cause severe hyperglycemia and hyperinsulinemia and limit islet glucose responsiveness in young male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology* 2013;154:3197-3208.
27. la Fleur SE. The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiol Behav* 2006;89:110-114.
28. Verhoog N, Allie-Reid F, Vanden Berghe W, et al. Inhibition of corticosteroid-binding globulin gene expression by glucocorticoids involves C/EBP β . *PLoS One* 2014;9:e110702.
29. Spencer SJ, Tilbrook A. The glucocorticoid contribution to obesity. *Stress* 2011;14: 233-246.
30. Man TY, Michailidou Z, Gokcel A, et al. Dietary manipulation reveals an unexpected inverse relationship between fat mass and adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300(6): E1076-E1084.
31. Huang Y, Li X, Lin H, et al. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 by IGF-1 in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1752-1756.
32. Veyrat-Durebex C, Deblon N, Caillon A, et al. Central glucocorticoid administration promotes weight gain and increased 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in white adipose tissue. *PLoS One* 2012;7:e34002.
33. Milagro FI, Campión J, Martínez JA. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in white adipose tissue is strongly correlated with adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;104:81-84.
34. Kershaw EE, Morton NM, Dhillon H, Ramage L, Seckl JR, Flier JS. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes* 2005;54:1023-1031.
35. Mullins LJ, Kenyon CJ, Bailey MA, Conway BR, Diaz ME, Mullins JJ. Mineralocorticoid excess or glucocorticoid insufficiency: renal and metabolic phenotypes in a rat Hsd11b2 knockout model. *Hypertension* 2015;66:667-673.

**EXACERBATED PRO-INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY
ACTIVITIES IN EPIDIDYMAL ADIPOSE TISSUE OF CBG-DEFICIENT
MALE MICE WITH DIET-INDUCED OBESITY**

*Angelo Ledda¹, José Gulfo¹, Marina Cecilia González, Francesca Cigarini, Montserrat Esteve,
Mar Grasa*

Manuscrito en preparación

¹ ambos autores han contribuido por igual en este trabajo

MANUSTRITO EN PREPARACIÓN

Exacerbated pro-inflammatory and anti-inflammatory activities in epididymal adipose tissue of CBG-deficient male mice with diet-induced obesity

Angelo Ledda^{1,2,κ}, José Gulfo^{1,2,κ}, Marina Cecilia González³, Francesca Cigarini¹, Montserrat Esteve^{1,2,¶} and Mar Grasa^{1,2,¶},

¹ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Section of Nutrition and Metabolism, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² CIBER Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

³ INIBIOLP-CONICET, Facultad Cs. Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Corresponding author : Mar Grasa; mgrasa@ub.edu

κ These authors contributed equally to this work

¶ These authors contributed equally as seniors to this work

Introduction

Glucocorticoids are a group of steroid hormones that include corticosterone in rodents and cortisol in humans. They are secreted by the adrenal gland and transported in blood by binding to corticosteroid-binding globulin (CBG). Glucocorticoids control the mobilization and deposition equilibrium of body nutrient stores (triacylglycerol (TAG) in adipose tissue, glycogen in liver and muscle, and, in exceptional circumstances, protein in muscle), playing important roles in meeting the energy demands during responses to physical and psychological stress, as well as replenishing energy stores for future challenges (1). Chronic elevation in glucocorticoid levels is the primary cause of Cushing's syndrome, which presents central obesity and some features of metabolic syndrome.

Glucocorticoids are also efficient anti-inflammatory molecules that suppress the immune system at inflammation sites. CBG, a member of the serine protease inhibitor family (2), regulates glucocorticoid availability. At inflammation sites, elastase, a serine protease secreted by neutrophils, cleaves a small peptide from CBG, thereby reducing its ligand affinity and promoting the release of glucocorticoid (3). Although glucocorticoids are anti-inflammatory during inflammation, their role in the normal physiology of the immune system is unclear. Under basal conditions, glucocorticoids may play a protective role by ensuring the immune system is ready to respond to pathogens, which appears to be the case with the innate immune system where glucocorticoids are not strictly immunosuppressive (4).

In peripheral blood mononuclear cells from healthy human donors, glucocorticoids induce the expression of chemokines, cytokines, and complement family members, while repressing the expression of genes associated with adaptive immunity (5). In activated inflammatory T-helper subsets, glucocorticoids downregulate the expression of specific genes that upregulate in resting cells (5). In addition, some effects can appear/disappear in a dose-dependent manner. For example, corticosterone has been reported to exert immunostimulatory effects on macrophage function at low concentrations, but not at high concentrations (6).

CBG-deficient mice display a small chronic excess of free corticosterone and markedly low concentrations of total hormone (7). Lack of CBG does not affect the progression of inflammation 12 hours after the induction of acute pancreatitis (8), but LPS-injected CBG-deficient mice have been reported to show lower survival rates and more exacerbated inflammatory responses (9), suggesting a key role of CBG in the anti-inflammatory response. Previously, we observed that CBG

deficiency increased adipocyte volume in visceral epididymal adipose tissue and decreased subcutaneous stores without affecting body weight or food intake (7).

The aim of this study was to elucidate the effects of CBG deficiency on the progression and severity of chronic low-grade inflammation in epididymal white adipose tissue (EWAT) associated with diet-induced obesity.

Materials and Methods

Animals and experimental protocols

Six-weeks-old wild-type (WT) and CBG-knockout (KO) male mice were used. The CBG-KO colony was established through crossing heterozygous animals (kindly provided by Dr. Willnow). The WT mice used were also obtained from the colony. The procedure for disrupting the CBG gene to generate KO mice has been previously described (9).

WT and KO mice were divided into two groups containing 6 to 10 animals. Each cage housed 2 to 4 mice. Mice were fed either a control (C) diet (CWT and CKO groups), which provided 18% of the energy from fat (Teklad Global 2018), or a hyperlipidic (HL) diet (HLWT and HLKO groups), which gave 60% of the energy from fat (TD.06414) for 1 or 12 weeks. All the diets were supplied by Harlan-Interfauna Ibérica (Sant Feliu de Codines, Spain). The animals were provided food and water *ad libitum* until they were sacrificed, and maintained under a 12-hour light cycle (from 08.00 to 20.00) in a temperature-controlled environment (20–22°C). Their body weight and food intake were periodically measured. At the end of the dietary treatment, mice were fasted overnight and the animals were sacrificed under isoflurane anesthesia between 07:00 and 09:00. Blood from the cava vein was obtained during a 2-minute procedure and maintained on ice until centrifugation at 12,000 *g* for 20 minutes to obtain the serum fraction. EWAT was then excised, weighed and immediately submerged in 4% paraformaldehyde or collected for collagenase digestion and the rest frozen in liquid nitrogen.

Animal maintenance and the experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines for the use of experimental animals established by the European Union, Spain, and Catalonia, and were approved by the Animal Handling Ethics Committee of the University of Barcelona.

CBG binding assay

The binding capacity of CBG was evaluated using ³H-corticosterone, as previously reported (8). Briefly, 10 µl of serum samples were stripped by adding 0.5 ml of a charcoal-dextran suspension (0.05% dextran and 0.5% charcoal in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1% gelatin (PBSG) at pH 7.4) and incubated at room temperature for 30 minutes with occasional shaking. Samples were then centrifuged and the clear supernatants further diluted 1:5 in PBSG buffer before use in corticosterone binding assays. The final concentration of labeled corticosterone in the tubes was 15 nM. The tubes were left to incubate at 37°C for 30 minutes and then put on ice for 2 hours. The charcoal-dextran suspension was then added to each tube and the mixture centrifuged for 10 minutes. Clear supernatants were added to 4 ml of a water-miscible scintillation cocktail (EcoLite, MP Biomedicals, USA) and counted in a standard scintillation counter. In all the samples, individual non-specific binding (measured in a 500-fold excess of non-radioactive corticosterone) was measured and subtracted from the total amount of bound radioactive corticosterone.

Serum cytokine measurements

Serum samples from mice belonging to each group were pooled to obtain sufficient volume for the analysis of cytokine levels using a commercial enzyme immunoassay for IL-6 (KMC0061), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) (KMC1011), and IL-10 (KMC0101, Invitrogen).

Intraperitoneal glucose tolerance test

Intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT) was performed 11 weeks after starting the dietary treatments, as described previously (10). Briefly, after 4 hours of fasting, a bolus of glucose (2g/kg body weight) was injected into the intraperitoneal cavity and a few µl of blood were obtained through a small cut in the tail at 0 (just before the injection), 15, 30, 45, 60, and 90 minutes after the injection for blood glucose measurements (Glucocard G+Meter, Menarini Diagnostics).

Immunohistochemical analysis of EWAT

Small amounts of EWAT were dissected and fixed by immersion in 40 g/L paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, at 4°C overnight. The samples were maintained at 4°C in phosphate buffer and later dehydrated and embedded in paraffin blocks.

Serial 5- μ m sections were dewaxed in xylene and stained with eosin-hematoxylin. The immunohistochemical detection of elastase or F4/80 was performed with the avidin-biotin-peroxidase method. Endogenous peroxidases were blocked with a 3% solution of hydrogen peroxide and then diluted 1:19 in horse serum (HS) to reduce non-specific staining. Sections were incubated overnight at 4°C in a high-humidity environment with goat anti-mouse elastase antibody (sc-9521, Santa Cruz Biotechnology) or rabbit anti-mouse F4/80 antibody (MAB10058, Abnova) diluted 1:100 or 1:200 in HS with background-reducing components, respectively (Dako, Barcelona, Spain). Biotinylated horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-goat IgG was used as the secondary antibody (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Detection was performed with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain® ABC kit, Vector Labs) using diaminobenzidine (DAB) as the substrate (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Labs). The slides were visualized under an optical microscope (Olympus BX-51, Olympus Iberia, Barcelona, Spain), and image stacks were captured (Olympus DP-70). A minimum of 100 adipocytes per mouse distributed in 10 fields and 3 mice per group were evaluated.

Real-time PCR expression analysis

Total RNA was extracted from EWAT using the TRI Reagent Solution (Life Technologies, Waltham, MA, USA) and quantified with an ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA samples were reverse-transcribed using the MMLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and oligo-dT primers.

RNA from macrophages was extracted with RNeasy Micro Kit (cat. 74004, Qiagen) and the samples reverse-transcribed with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (cat. 205311, Qiagen).

Real-time PCR (RT-PCR) amplification was conducted using 10 μ l of the amplification mixtures containing SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) and 300 nM primers. The primers used for tumor necrosis factor α (TNF α), dual-specific phosphatase 1 (DUSP1), elastase, IL-10 receptor (reclL10), macrophage transcription factor PU1m (PU1m), angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), arginase, IL-6, and F4/80 are listed in Supplementary Table 1. The reactions were run on an ABI PRISM 7900 HT detection system (Applied Biosystems), using an annealing temperature of 60°C. To determine the sensitivity and efficiency of the amplification, PCR linear ranges were established for each gene with tissue cDNA. We measured the expression of the housekeeping gene ribosomal protein L32 (RPL32) as control. Ct values were obtained using an automatically calculated

Resultados

threshold, and the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method was used for relative quantifications. Final data were calculated as percentages with respect to the WT group following the control diet for 12 weeks (CWT group), which was normalized to 100%.

Isolation of adipocytes and cells from stromal vascular fractions

EWAT from 2-3 mice was collected to achieve 1 g of tissue, which was then minced and incubated for 45 minutes at 37°C with gentle agitation in Krebs-Ringer buffer (KRB, 3 mL/g adipose tissue), containing 10 mM glucose, 4% bovine serum albumin (BSA) and 1 mg/ml collagenase type IV (Worthington Chemicals, Lakewood, NJ, USA). The digested tissue was filtered through a chiffon mesh into a graduated cylinder. The lipid-laden adipocytes floated, and the infranatant fraction was removed and centrifuged at 200 *g* twice to pellet cells from the stromal vascular fraction (SVF). The adipocyte fraction was resuspended in DMEM containing 3.5% of defatted BSA and without phenol red, and allowed to stand to enable the isolation and removal of the infranatant. This wash step was repeated once again. The number of adipocytes was counted using a Neubauer chamber. SVF cells were quantified using a Gallios multi-color flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) set up with the 3-laser/10-color standard configuration.

Flow cytometry and sorting

Aliquots of SVF cells in 100 μL of PBS were incubated with 0.2 μg of FITC-labeled anti-F4/80, anti-CD206 (mannose receptor), anti-CD210 (IL-10 receptor) or isotype-matched control antibodies (Biolegend) for 15 minutes. Cells were then washed with 2% HS-PBS, incubated with fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution (BD Biosciences), and resuspended in 200 μL of 2% HS-PBS. Flow cytometric analysis was carried out using a FACSAria I SORP sorter (Beckton Dickinson). The gate for the total number of macrophages was defined by F4/80. The gate for M2-polarized macrophages was defined by F4/80, CD206 and/or CD210, whereas that for M1-polarized macrophages was obtained by subtracting the results for M2-polarized macrophages from those for the total number of macrophages. The data obtained were analyzed with Summit software version 4.3 (Dako Colorado, Inc.).

Adipocyte lipolysis assays

Adipocyte concentration was adjusted to 100,000 adipocytes per ml of DMEM containing 3.5% of defatted BSA and without phenol red. Aliquots of 1 ml were distributed into polypropylene tubes and incubated at 37°C for 90 minutes under constant shaking in the presence of buffer or 10 µM isoproterenol. The infranatant was collected and kept at -80°C for glycerol quantification (F6428, Sigma). Adipocytes were resuspended in lysis buffer containing DMEM (without phenol red) and phosphatase and protease inhibitor cocktails (Sigma), frozen in liquid N₂ and thawed on ice. Adipocytes were homogenized by passing through an insulin-needle syringe, aliquoted, and kept at -80°C until use.

Western blot analysis of NF-κB

Protein concentrations of lysed adipocytes were quantified with the QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma), and samples containing 25 µg of total protein were separated by SDS-PAGE in a 10% gel and electrotransferred onto a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). After blocking non-specific binding sites with 5% non-fat milk in 0.05% TBS-Tween for 90 minutes at room temperature, the membranes were incubated overnight with polyclonal goat anti-mouse nuclear factor kappa-light-chain-enhancer (NFκB) antibody (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology) or anti-mouse p65 NFκB antibody. An anti-lamin antibody (diluted 1:50,000; sc-46293, Santa Cruz Biotechnology) was used as a loading control. Immunoreactive proteins were detected with an anti-goat or anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (diluted 1:20,000; Santa Cruz Biotechnology). Immunodetection was performed with Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific), and protein levels were quantified using the TotalLab Quant software version 2003.3 (Non-Linear Dynamics, Newcastle, UK).

Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad software (version 5.0) and are expressed as means ± SEM. Statistical comparisons were made using two-way ANOVA to evaluate the effect of genotype (Gen) and diet (Diet), with Bonferroni post-hoc tests used to compare WT and KO pairs for each type of diet, and C- and HL-diet pairs for each type of genotype. The interaction significance was

Resultados

also determined (referred to as 'Int' in the figures and tables). P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Body weight and food intake

Body weight and food intake were recorded once a week. The effects of overnight fasting before sacrifice on body weight and food intake were also analyzed. A week after starting the HL diet, there was increased food energy intake in HL mice (two-way ANOVA, Diet, $p=0.0391$), but no changes in body weight (Table 1) in both WT and KO mice. Overnight fasting triggered the largest body weight loss in mice on the C diet (Diet, $p=0.0385$), which was more dramatic when expressed as a percentage of the body weight (Diet, $p=0.0040$). After 12 weeks of dietary treatment (Table 2), the mean energy intake continued to be higher in HL-fed than C-fed mice (Diet, $p=0.0312$), KO mice presenting lower values than WT animals (Gen, $p=0.0198$) that were not significant after Bonferroni analysis and also not observed in a former study (7). Body weight at 12 weeks increased to a similar extent in both WT and KO mice fed the HL diet (Diet, $p=0.0007$), as previously reported (7). The impact of fasting on body weight loss was significantly lower in HL-fed mice compared to C-fed mice when expressed as a percentage at 1 week (Diet, $p=0.0040$) and 12 weeks (Diet, $p=0.0346$). The effects of fasting on body weight were not affected by genotype. EWAT weight significantly increased as a consequence of the HL diet both at 1 week (Diet, $p=0.0094$) and 12 weeks (Diet, $p=0.0003$).

Table 1. Mean body weights and food intake in mice submitted to control or HL diet for 1 week.

	CWT	CKO	HLWT	HLKO
BW day 0 (g)	22.4±0.5	21.9±0.7	23.7±0.7	22.4±1.2
BW 1 week (g)	23.9±0.6	23.0±0.8	25.4±0.5	23.9±1.2
BW 1 week (%)	106±3	105±1	107±1	107±2
Loss BW after fasting (g)	4.01±0.1	3.3±0.2	1.8±0.2	2.5±0.9
Loss BW after fasting(%)	16.7±2.4	18.5±2.0	7.1±0.7	11.3±4.2
Food intake (kJ/day/mice)	50±6	56±7	61±3	69±1
EWAT weight (g)	0.157±0.016	0.130±0.021	0.229±0.027	0.259±0.072

Significativity of two-way ANOVA was obtained for loss of body weight (BW) after wasting (in g and %) due to diet ($p=0.0385$ and $p=0.0040$), for food intake due to diet ($p=0.0391$) and for EWAT weight due to diet ($p=0.0094$).

Table 2. Mean body weights and food intake in mice submitted to control or HL diet for 12 weeks.

	CWT	CKO	HLWT	HLKO
BW day 0 (g)	25±1	21±1	21±1	20±1
BW 12 week (g)	40±1	36±1	43±3	40±2
BW 12 week (%)	166±8	169±5	203±16	196±7
Loss BW after fasting (g)	3.0±0.3	2.2±0.2	2.0±0.6	1.6±0.8
Loss BW after fasting(%)	7.4±0.6	6.3±0.5	4.6±1.5	3.8±2.3
Food intake (kJ/day/mice)	56±1	52±2	62±1	55±1
EWAT weight (g)	0.98±0.11	0.98±0.09	1.34±0.07	1.50±0.12

Significativity of two-way ANOVA was obtained for body weight (BW) at 12 weeks (in %) due to diet ($p=0.0007$), for loss of BW after wasting (in %) due to diet ($p=0.0346$), for food intake due to genotype ($p=0.0198$) and diet ($p=0.0312$) and for EWAT weight due to diet ($p=0.0003$).

Blood cytokine levels and IGTT

Serum IL-6 concentration increased significantly in mice on the HL diet irrespective of genotype (Figure 1; Diet, $p<0.0001$). Serum IL-10 levels showed a different response to the HL diet depending on the genotype. HLWT mice showed a non-significant reduction in serum IL-10 concentrations, whereas HLKO mice displayed significantly elevated IL-10 levels (Gen, $p=0.0780$; Diet, $p=ns$; Int, $p=0.0048$). MCP1 concentrations remained unaltered in all the experimental groups.

IGTT was performed 11 weeks after starting the dietary treatments. Glucose levels in HLKO mice were significantly higher at 45 and 90 minutes after starting the IGTT (Figure 2) compared to the rest. The area under the curve was significantly higher due to the HL diet (Diet, $p=0.0008$) mainly in CBG-deficient mice (Int, $p=0.0385$) which showed significant higher values than HLWT by Bonferroni post-test analysis.

CBG binding in serum

CBG binding was measured in the serum of WT mice 1 and 12 weeks after starting the diets (Figure 1B). CBG binding increased with time (Time, $p=0.0067$) mainly in HL-fed mice (significant in Bonferroni post-hoc test).

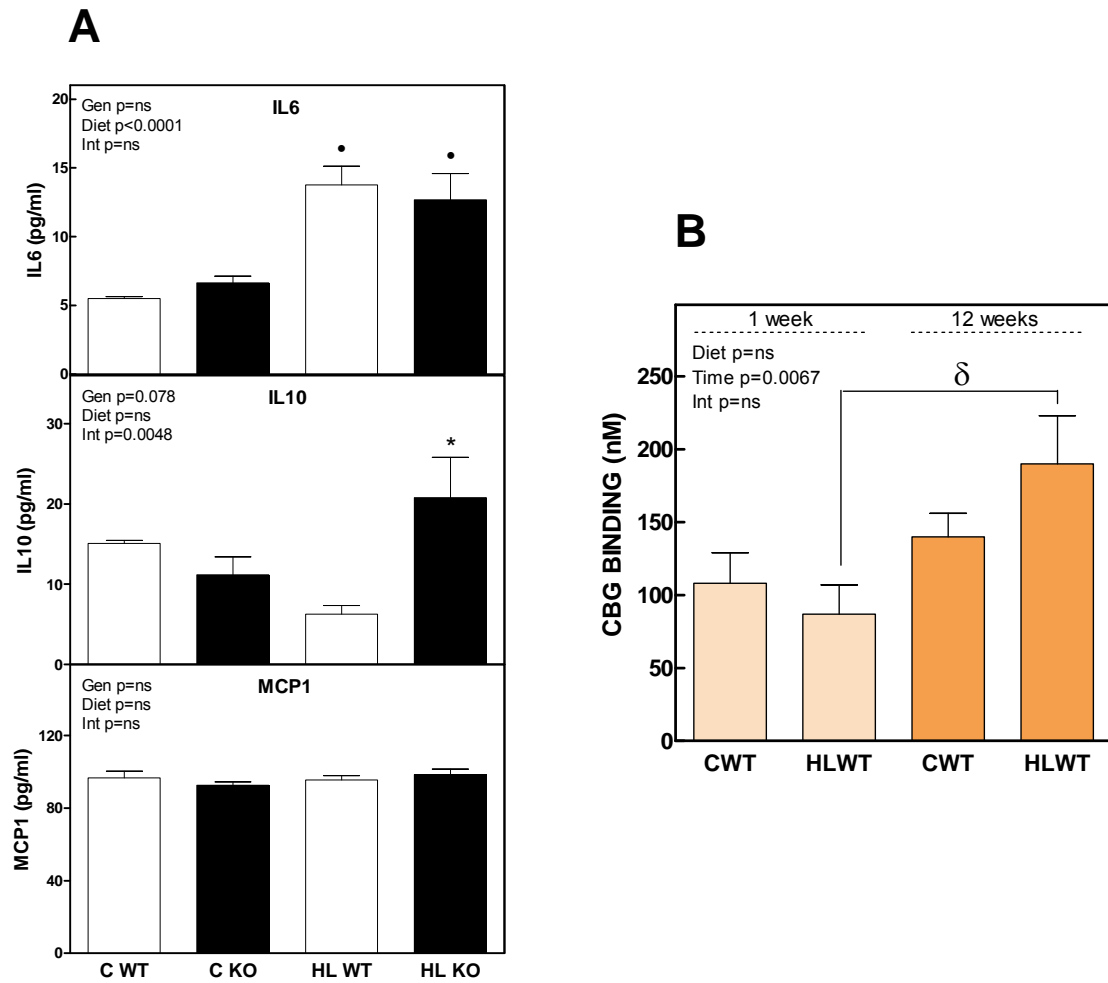


Figure 1. Serum measurement of cytokines in mice submitted for 12 weeks to control or HL diet (A) and CBG binding (B) in WT mice submitted for 1 and 12 weeks to a control or an HL diet. Significativity of two-way ANOVA is depicted in each graph. Symbols denote statistical significativity by Bonferroni post-test between WT and KO mice of the corresponding diet (*) or between C and HL of the corresponding genotype (•) in the case of cytokines graph. In B, (δ) denotes statistical significativity between mice submitted during 1 week and 12 weeks to hyperlipidic diet.

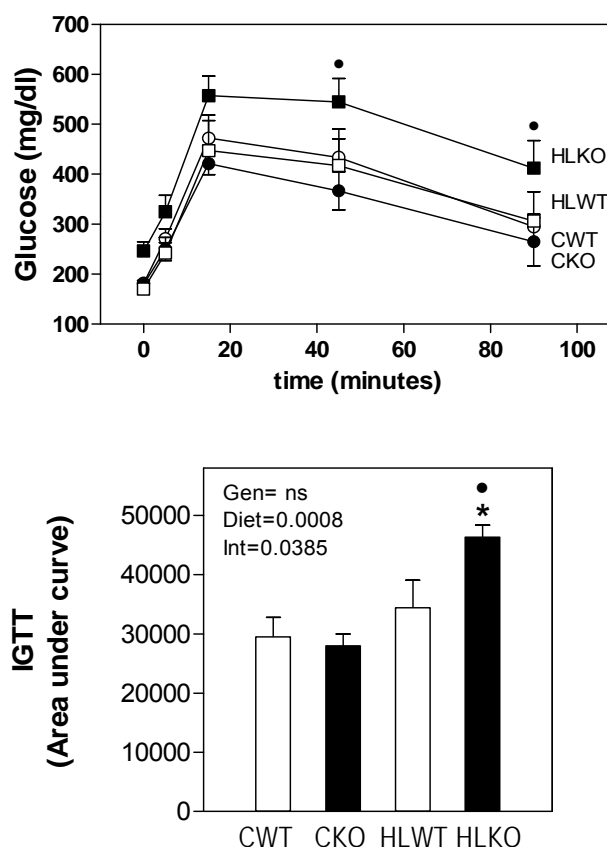


Figure 2. Intra-peritoneal glucose tolerance test (IGTT) performed in mice at 12 weeks of started the diet. In the upper graph, blood glucose values obtained during the 90 minutes of IGTT. In the graph below, the area under the curve calculated for each mice group. Significativity of two-way ANOVA is depicted in IGTT graph. Symbols denote statistical significativity by Bonferroni post-test between WT and KO mice of the corresponding diet (*) or between C and HL of the corresponding genotype (•).

Neutrophil infiltration and crown-like structures in EWAT

We assessed the presence of neutrophils in EWAT which are the first immune cells to respond to inflammation, by quantifying elastase expression in mice following the diets for 1 or 12 weeks (Figure 3A). We also recorded the number of immunoreactive neutrophils stained with the elastase antibody in EWAT slides from mice submitted to each diet for 1 week (Figure 3B). Elastase mRNA levels showed a non-significant increase above basal levels in KO and HL-fed mice, especially in HLKO mice 1 week after following the diet, but not after 12 weeks (Figure 3A and 3B). Neutrophil

Resultados

counting in the EWAT slides, expressed as elastase-positive cells per 100 adipocytes, revealed the same pattern, which resulted statistically significant (Figure 3C)

The HL diet increased the number of crown-like structures (CLS) in the adipose tissue of both WT and KO mice compared to the C diet (Figure 4A) quantified as CLS per 100 adipocytes (Figure 4B). The number of CLS in the adipose tissue was slightly higher in KO mice than in WT in both HL- and C-fed mice, without reaching statistical significance (Figure 4B).

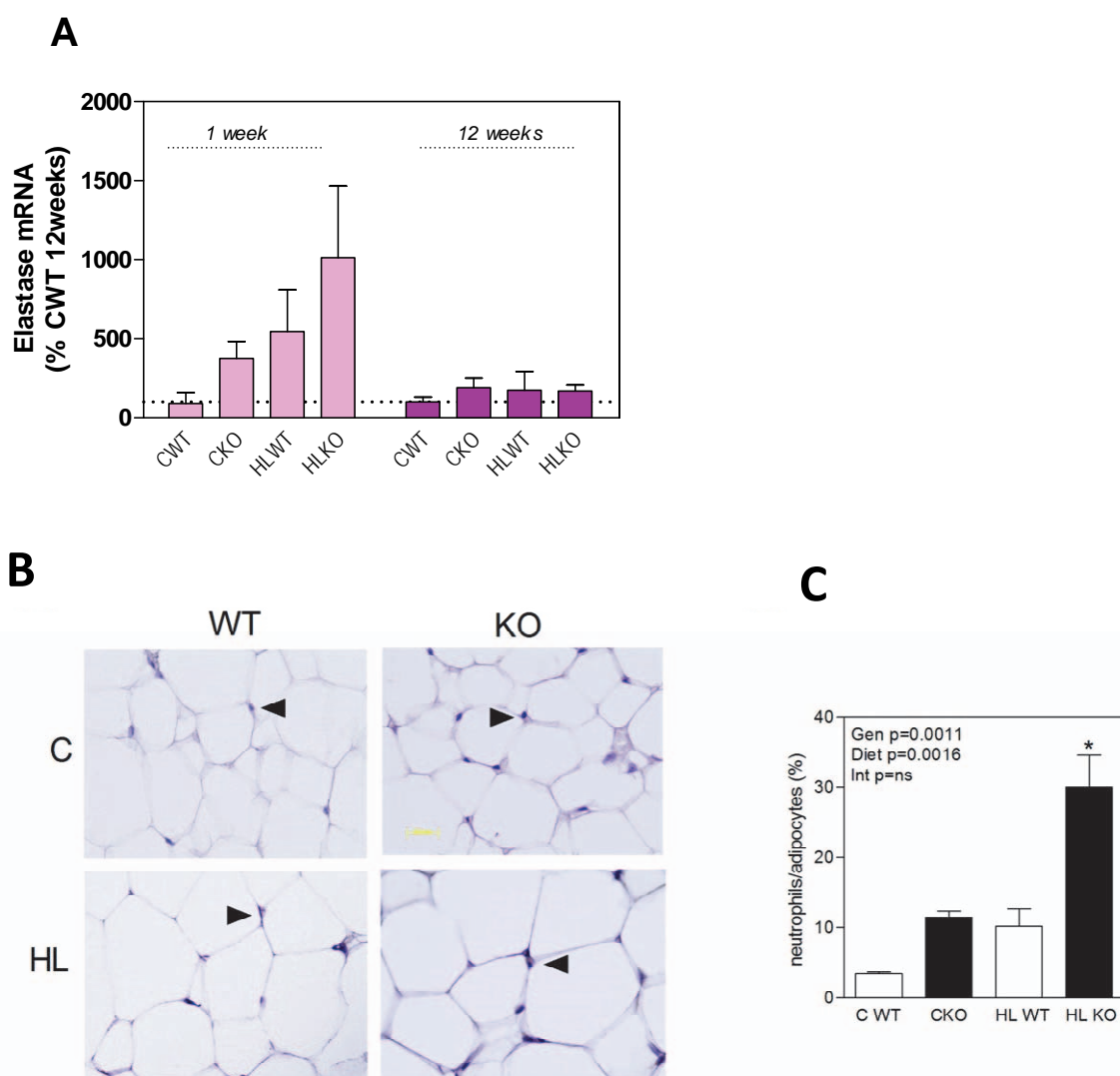


Figure 3. Neutrophil infiltration in EWAT after 1 and 12 weeks of started the consumption of the HL diet. A) Elastase mRNA in epididymal adipose tissue at 1 week or 12 weeks after starting the diet; B) immunohistochemistry of elastase in epididymal adipose tissue slides quantified as C) elastase positive cells found per 100 adipocytes. Significativity of two-way ANOVA is depicted in each graph. Symbols denote statistical significativity by Bonferroni post-test between WT and KO mice of the corresponding diet (*).

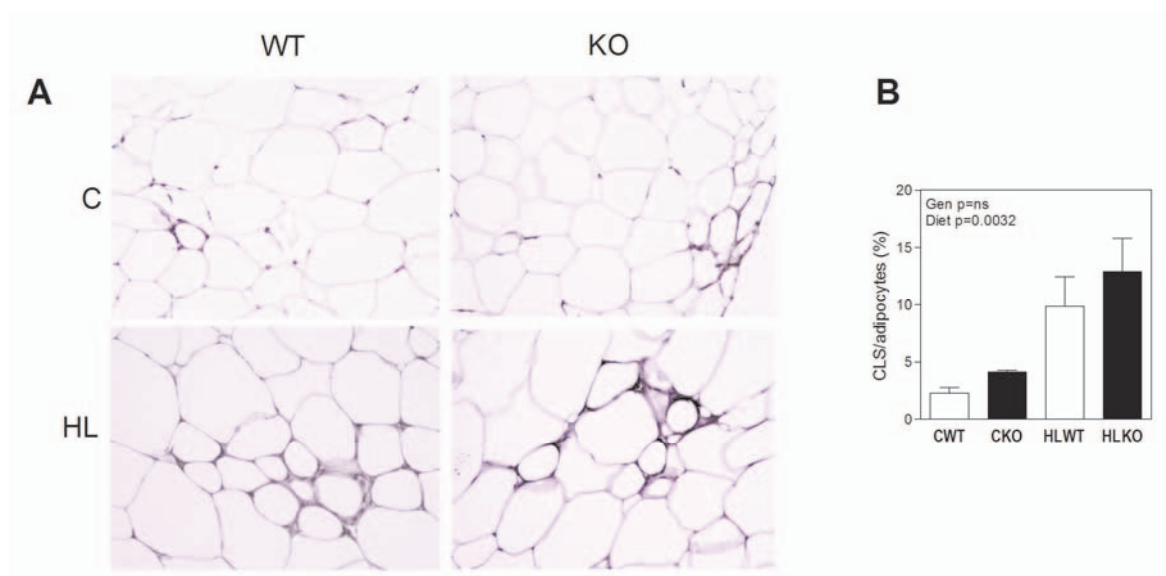


Figure 4. A) Immunohistochemistry of F4/80 in epididymal adipose tissue slides quantified as B) crown-like structures (CLS) surrounding adipocytes per each 100 adipocytes counted. Significativity of two-way ANOVA is depicted in the graph.

Expression of inflammatory markers in EWAT

Expression of some of the inflammatory markers in EWAT was also evaluated from the beginning (1 week of diet) to the end (12 weeks of diet) of the study period (Figure 5). One week of the HL diet had a larger effect on expression levels than 12 weeks of the diet. Using two-way ANOVA, we identified significant changes in the mRNA levels of TNF α ($p=0.035$), PU1m ($p=0.0143$), IL-6 ($p<0.0001$), arginase ($p=0.0053$) and F4/80 ($p=0.0404$) after 1 week on the diets. ANGPTL4 expression was also significantly affected ($p=0.0425$), increasing in WT mice and decreasing in KO animals. After 12 weeks, the only significant changes due to HL diet were the elevations in TNF α ($p=0.035$) and ANGPTL4 ($p=0.0026$) mRNA levels.

CBG-deficient mice showed significantly increased EWAT TNF α ($p=0.0014$), DUSP1 ($p=0.021$), arginase ($p=0.0304$) and IL-6 ($p=0.0011$) mRNA levels after 1 week on the C and HL diets, with expression being greater in the HL- than C-fed mice, except for DUSP1 mRNA, which was more increased in C- than HL-fed mice. At 12 weeks, only DUSP1 mRNA levels remained significantly higher in CBG-deficient mice than in WT (Gen, $p=0.0125$).

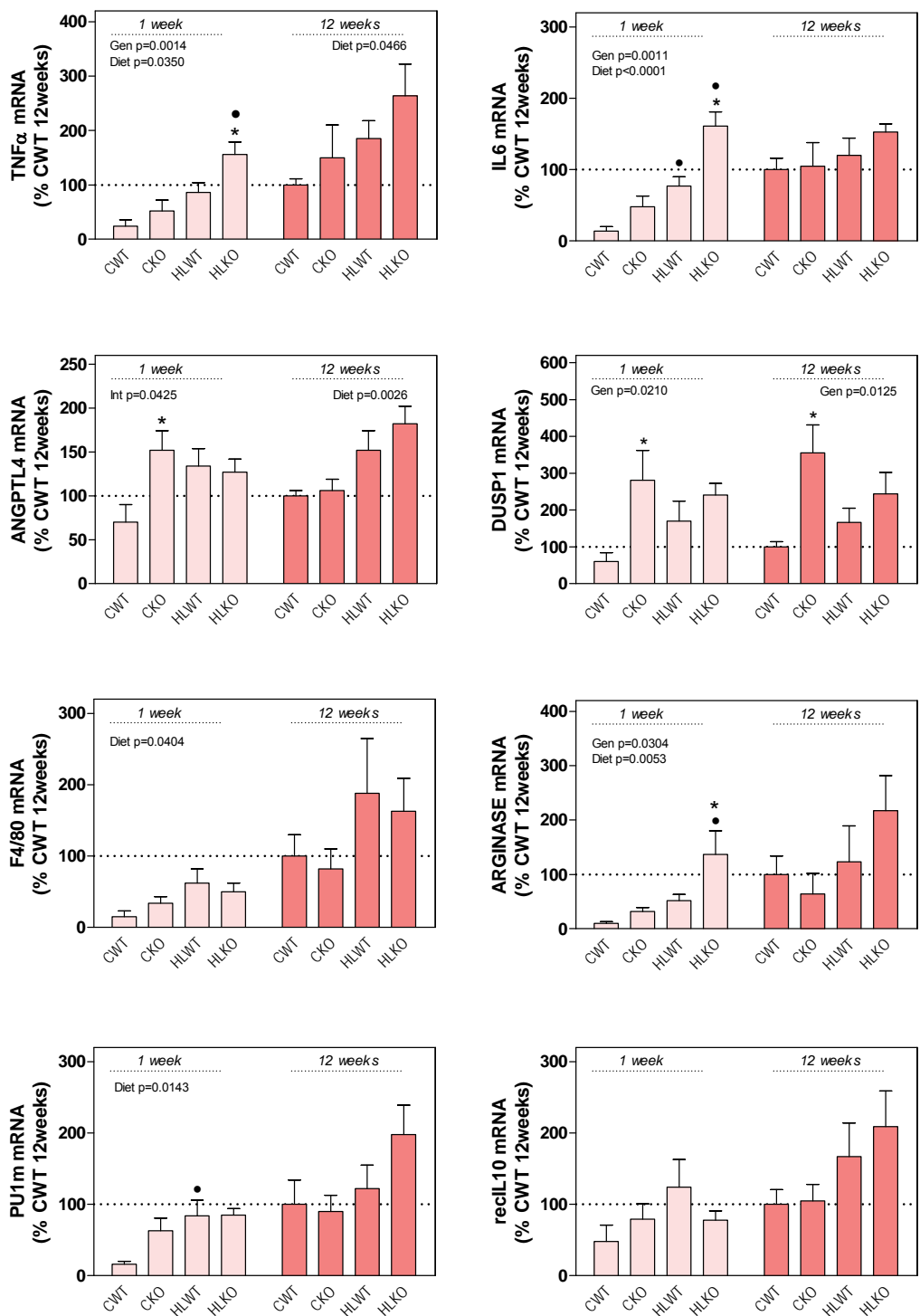


Figure 5. Expression of some inflammatory markers in whole EWAT from mice submitted to a standard (CWT and CKO) or HL diet (HLWT and HLKO) during 1 week or 12 weeks. The gene studied were, as proinflammatory markers, TNF α , PU1m, IL6 and F4/80 and as anti-inflammatory DUSP1, recL10, Arginase and ANGPTL4. Significativity of two-way ANOVA is depicted in each graph. Symbols denote statistical significativity by Bonferroni post-test between WT and KO mice of the corresponding diet (*) or between C and HL of the corresponding genotype (●) in each graph.

Characterization of macrophages in EWAT

Figure 6A shows the total macrophage content in EWAT for each group of mice. The only significant difference was increased macrophage infiltration in HL-fed WT and KO mice (two-way ANOVA, Diet, $p=0.0227$).

The type of macrophages present in EWAT after 12 weeks was assessed by FACS (Figure 6B). Macrophages were identified as F4/80-positive cells. The ratio of M1- to M2-polarized macrophages in the adipose tissue varied according to diet and genotype (two-way ANOVA, Int, $p=0.0026$) (Figure 6B). CWT mice showed a majority of M2-polarized macrophages (around double the number of M1-polarized macrophages), whereas HLWT mice displayed an increase in the number of M1-polarized macrophages. The opposite pattern was observed in CBG-deficient mice, with CKO mice showing similar numbers of M1- and M2-polarized macrophages and HLKO mice presenting more M2- than M1-polarized macrophages (Figure 6B).

Due to inconsistent data in the literature about the role of 11HSD1 in macrophages, we investigated 11HSD1 mRNA expression in M1- and M2-polarized macrophages from adipose tissue. The data obtained gave a Ct in the range of 31-36. Some samples from each group generated values out of the range of detection and were therefore unreliable. Thus, we were unable to determine whether 11HSD1 expression in resident macrophages was affected by inflammation in the adipose tissue of HL-fed mice, as has been observed *in vitro* in THP-1 macrophages (11). Furthermore, we could not detect 11HSD2 mRNA expression. TNF α mRNA levels were assessed as a marker of pro-inflammatory activity in M1-polarized macrophages (Figure 6C). TNF α expression increased in M1-polarized macrophages in CKO and HLKO mice compared to WT mice (two-way ANOVA, Gen $p=0.0308$), with the most significant difference observed between macrophages from CWT and CKO mice (significant difference according to the Bonferroni post-hoc test). ANGPTL4 is a multifunctional protein that is downregulated in activated macrophages through Toll-like receptors (TLR). In M2-polarized macrophages, ANGPTL4 expression was lower than in M1-polarized macrophages and was not affected by either the HL diet or CBG deficiency (Figure 6C). In M1-polarized macrophages, ANGPTL4 expression decreased sharply in response to the HL diet (two-way ANOVA, Diet $p=0.0004$) mainly in WT mice (Int $p=0.0071$). On the C diet, macrophages from KO mice showed a significant reduction in ANGPTL4 expression compared to WT mice.

Resultados

DUSP1 is a key mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoid in macrophages (12). DUSP1 mRNA levels were highly elevated in pro-inflammatory M1- and anti-inflammatory M2-polarized macrophages (Figure 6C) from KO mice compared to those from WT mice (two-way ANOVA, Gen, $p=0.0010$ for M1- and $p=0.0029$ for M2-polarized macrophages), particularly in animals on the C diet (significantly different according to the Bonferroni post-hoc test), which decreased in HL-fed animals, also in KO mice (Figure 6C). In macrophages from WT mice, the HL diet increased DUSP1 expression in M1- (two-way ANOVA, Diet, $p=ns$; Int, $p=0.0052$) and decreased DUSP1 mRNA levels in M2-polarized macrophages (two-way ANOVA, Diet, $p=0.0180$).

Inflammation in adipocytes

To assess the specific inflammatory status of EWAT adipocytes, we evaluated the amount of total and phosphorylated NF κ B (Figure 7A) and the lipolysis activity of adipocytes (Figure 7B) in mice 12 weeks after starting the diets. The HL diet enhanced total ($p=0.036$) and phosphorylated ($p=0.0601$) levels of NF κ B in adipocytes, with CBG deficiency further increasing the amount of total NF κ B irrespective of diet ($p=0.0022$). CBG deficiency promoted NF κ B phosphorylation in CKO mice, but did not trigger NF κ B phosphorylation in HLKO mice respect to HLWT. The ratio of phosphorylated NF κ B to total NF κ B showed an almost significant increase due to diet (Diet, $p=0.0539$), but not to genotype. Basal lipolysis was not affected by either diet or genotype, but isoproterenol-induced lipolysis was much higher in KO than WT mice on the HL diet (Diet, $p=0.0025$; Int, $p=0.0080$; Bonferroni post-hoc test between CKO and HLKO mice, $p<0.001$).

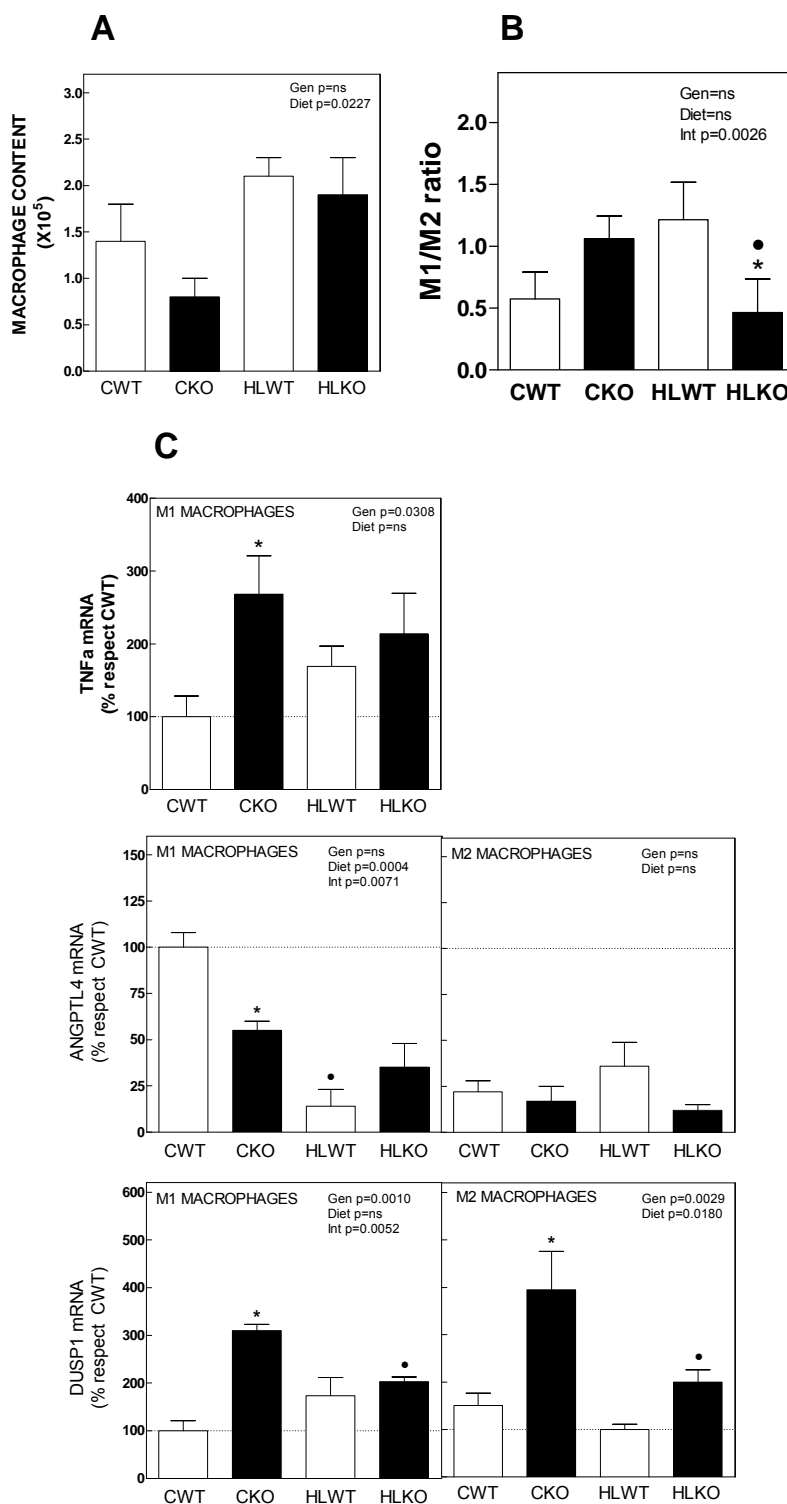
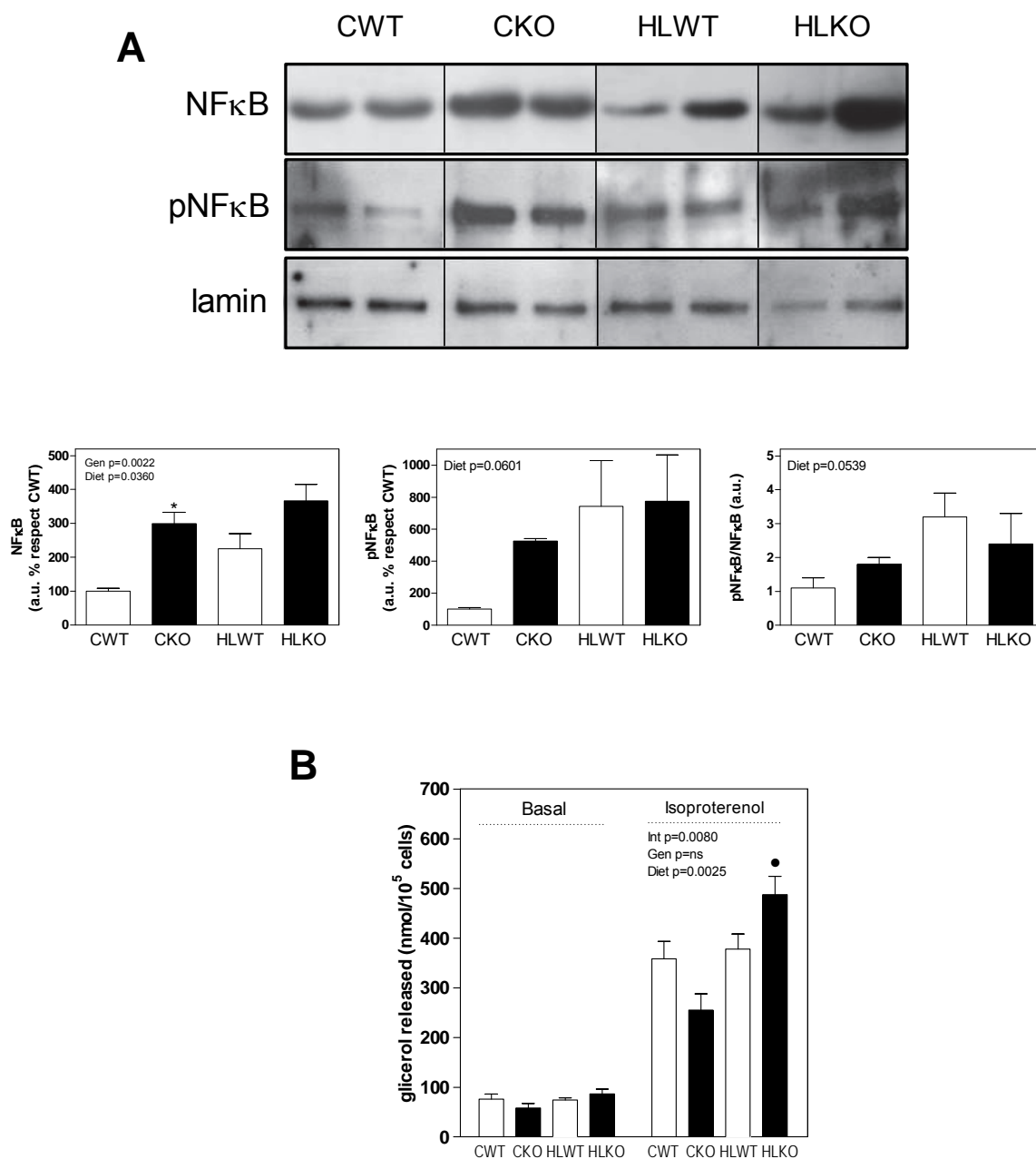


Figure 6. A) Total macrophage content, B) proportion of M1 and M2 macrophages and C) TNF α , ANGPTL4 and DUSP1 mRNA expressions in M1 (left column) and M2 (right column) macrophages obtained from EWAT by FACS-sorting in WT mice or KO fed standard (CWT and CKO) or HL diet (HLWT and HLKO). Significativity of two-way ANOVA is depicted in each graph. Symbols denote statistical significativity by Bonferroni post-test between WT and KO mice of the corresponding diet (*) or between C and HL of the corresponding genotype (•) in each graph.



Discussion

The CBG-knockout mice used in this work has been previously characterized (7, 9). Compared to WT, CBG-deficient mice showed reduced levels of total corticosterone, but small increases in free hormone levels that were sufficient to elicit a small but significant decrease in thymus weight (7), which is an immunosuppressive effect of sustained glucocorticoid levels (13). However, LPS-injected CBG-deficient mice exhibit greater mortality and pro-inflammatory cytokine secretion, explained as an absence of the anti-inflammatory properties of glucocorticoids after acute inflammation (9). Moreover, elastase-mediated cleavage of CBG leads to the release of glucocorticoids at the site of inflammation, where its anti-inflammatory effects are required to resolve inflammation and restore homeostasis. All these data suggest that CBG regulates the anti-inflammatory activities of glucocorticoids (9, 14).

The aim of this study was to elucidate the effects of CBG deficiency on the progression and severity of chronic low-grade inflammation associated with diet-induced obesity. The serum CBG increase previously found after 12 weeks of HL diet (7) have not been observed at 1 week of starting the HL diet and perhaps is a secondary consequence of the altered endocrine environment. After 12 weeks, the larger IGTT area under the curve (Figure 2) and the increased isoproterenol-induced lipolysis in the adipocytes (Figure 7) of HLKO compared to HLWT mice would be the consequences of glucocorticoid excess (15, 16), only manifested during the altered metabolism triggered by the hyperlipidic diet, as previously reported (7).

To assess the inflammation status, we first quantified neutrophil infiltration in EWAT from mice fed an HL diet for one week. Neutrophil infiltration is considered the first step of inflammation in obesity, which is then followed by macrophage infiltration and CLS formation (17). Despite similar numbers of macrophages (Figure 6A) and CLS (Figure 4) at 12 weeks, CBG-deficient mice showed increased numbers of neutrophils (Figure 3) compared to WT mice, suggesting an early exacerbated response to the unbalanced diet (in HLKO mice), but also a reinforced innate immune system that is able to act if necessary (in CKO mice).

A similar ratio of M1- to M2-polarized macrophages (Figure 6B) and the increased NF κ B phosphorylation in CKO and HLWT mice after twelve weeks (Figure 7A) indicate the occurrence of inflammation in the EWAT of both groups, which did not lead to elevated pro-inflammatory cytokine

Resultados

expression in CKO mice after 12 weeks of diet (Figure 5). By contrast, HLKO mice showed a decreased M1/M2 ratio, but similar levels of phosphorylated NF κ B to those in CKO mice despite higher amounts of total NF κ B. Like CKO mice, HLKO animals did not present increased expression of pro-inflammatory cytokines. It is well established that prolonged glucocorticoid exposure induces macrophages to become M2-polarized cells or anti-inflammatory, secreting IL-10, removing dead cells through phagocytosis, and promoting tissue healing (18). It is generally considered that obesity-associated adipose M1-polarized macrophages are pro-inflammatory and have detrimental effects, whereas normoweight-associated adipose M2-polarized macrophages are anti-inflammatory and linked to the development of healthy tissue (19). A recent study investigating macrophages from animals after 8 and 12 weeks on an HL diet demonstrated a mixed profile of macrophages that were initially pro-inflammatory, but became anti-inflammatory with time. In fact, CLS in long-term diet experiments have been observed to be formed by macrophages resembling M2- more than M1-polarized cells (20). Furthermore, recent findings indicate that inflammation in adipose tissue is an essential requirement for adipose tissue expansion in an HL diet, avoiding lipotoxicity and systemic inflammation (21).

Glucocorticoids are anti-inflammatory during sustained inflammation. However, they are not always immunosuppressive. Within the range of endogenous corticosterone levels released during the hypothalamic-pituitary-adrenal axis circadian rhythm, glucocorticoids prime the innate immunity for inflammatory responses (18). Three different levels of glucocorticoid activity on macrophages have been suggested: basal levels that maintain an inactive system in the absence of stimuli; medium levels that promote immune responses to injury; and high levels that are immunosuppressive in order to help restore homeostasis (22).

TLRs are the best characterized mediators that initiate and perpetuate the inflammatory response. Stimulation of TLRs activates intracellular signaling pathways, including the NF- κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, which lead to the expression of a large number of genes, including cytokines. The anti-inflammatory effects of glucocorticoids are achieved through suppressing NF κ B transcription, as well as through inhibiting or stimulating the expression of pro-inflammatory or anti-inflammatory factors, respectively (23). Glucocorticoids directly promote the expression of DUSP1, a pivotal mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids that

inhibit the MAPK pathway through its phosphatase activity (24, 25). DUSP1 overexpression blocks the production of the cytokines TNF α and IL-6 (24).

In CBG-deficient mice, irrespective of diet, DUSP1 expression remained elevated throughout the entire duration of the study, most likely due to the presence of high glucocorticoid levels. After 1 week on the diets, the increase in DUSP1 expression was similar to the increases seen with TNF and IL-6 expression in both CKO and HLKO mice (Figure 5). However, after 12 weeks, the only significant difference that remained was the increased DUSP1 expression. The main sources of DUSP1 in EWAT were the SVF cells (data not shown). The M1- and M2-polarized macrophages obtained from adipose tissue also expressed DUSP1 in a similar pattern (Figure 6C), with CBG-deficient mice showing higher expression, especially those fed the C diet. This trend was also observed with TNF α expression in M1-polarized macrophages. These findings are not consistent with DUSP1 being characteristic of anti-inflammatory M2-polarized macrophages and TNF α being characteristic of pro-inflammatory M1-polarized cells (26). Therefore, our findings demonstrate the versatility shown by macrophages in their ability to alter their phenotype depending on the microenvironment, even performing pro-inflammatory and anti-inflammatory roles simultaneously (27).

ANGPTL4 is a direct glucocorticoid target that inhibits lipoprotein lipase (LPL) activity and drives lipolysis (28). Although its expression is activated by inflammatory stimuli in most tissues, including white adipose tissue, ANGPTL4 expression is reduced in activated macrophages exposed to LPS (29). After 1 week, we observed a different pattern of EWAT ANGPTL4 expression between CBG-deficient and WT mice. The expected increase in ANGPTL4 expression was observed in HLWT mice, but CBG-deficient mice showed increased expression that was sustained regardless of diet, which again could be triggered by the higher levels of free corticosterone. After 12 weeks, this pattern disappeared and the increased ANGPTL4 expression was seen only in HL-fed mice. Since ANGPTL4 diminution is a sign of macrophages activation by inflammation, its pattern of expression in EWAT macrophages suggests that in M1-polarized macrophages ANGPTL4 response is more sensitive than in M2 and that macrophages from CKO mice are more activated than those from CWT mice. The HL diet was a strong activating stimulus in M1-polarized macrophages in both WT and KO mice.

NFκB transrepression through tethering or repressive interaction is another mechanism underlying glucocorticoid anti-inflammatory activity that enables glucocorticoids to repress the expression of the pro-inflammatory TNFα and IL-6, among others (18). In this study, CBG-deficient mice presented greater NFκB expression than WT. This difference disappeared between WT and KO mice fed the HL diet when taking into account the active phosphorylated NFκB, but remained for WT and KO mice fed the C diet. NFκB activation, however, only translated into higher TNFα expression in HL-fed mice, thus leading to both pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in CBG-deficient mice fed the control diet.

Recently, CBG has been detected in mouse adipose tissue, where it has limited mRNA expression compared to the liver (7). CBG protein levels increase in the EWAT of diet-induced obese mice, suggesting a role of CBG in either facilitating glucocorticoid delivery or acting as an *in-situ* controller of glucocorticoid availability in adipose tissue (7). Reduced CBG cleavage has been recently associated with human abdominal obesity and metabolic syndrome, where it is thought to contribute to the chronic inflammatory conditions seen in metabolic syndrome (30).

In this study, we observed that CBG deficiency elicited both pro-inflammatory and anti-inflammatory responses, depending on the time of exposure to the inflammatory stimuli and diet. According to the model of the 5 R's (ready, reinforce, repress, resolve, and restore) proposed to explain the complex effects of glucocorticoids on inflammation (18), we can conclude that CBG-deficiency, in absence of inflammatory stimuli, prime and ready the innate immunity into the EWAT in young mice. During early responses to inflammatory stimuli, such as a hyperlipidic diet, free glucocorticoids, in the absence of CBG, elicit a more inflammatory response that becomes attenuated with time through the presence of more resolving immune cells and the persistence of key anti-inflammatory proteins such as DUSP1.

Acknowledgments

The investigation was supported by the Fondo Investigación Sanitaria PI09/00505. José Gulfo was the recipient of a predoctoral scholarship from the University of Barcelona, Angelo Ledda was the recipient of a European and Sardinian scholarship "Master and Back". We thank to Dra. Laura Herrero her valuable help with the FACS protocol and Dr. Jaume Comas from the Centres

Científics i Tecnològics of the University of Barcelona for his technical guide with FACS experiments.

Bibliography

1. Sapolsky RM. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci* 2015;18:1344–1346.
2. Pemberton PA, Stein PE, Pepys MB, Potter JM, Carrell RW. Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature* 1988;336:257–8.
3. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:34–9.
4. Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:109–19.
5. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, *et al.* Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J* 2002;16:61–71.
6. Zhou J-Y, Zhong H-J, Yang C, Yan J, Wang H-Y, Jiang J-X. Corticosterone exerts immunostimulatory effects on macrophages via endoplasmic reticulum stress. *Br J Surg* 2010;97:281–93.
7. Gulfo J, Ledda A, Serra E, Cabot C, Esteve M, Grasa M. Altered lipid partitioning and glucocorticoid availability in CBG-deficient male mice with diet-induced obesity. *Obesity* 2016;24:1677–86.
8. Gulfo J, Ledda A, Gea-Sorlí S, *et al.* New Roles for Corticosteroid Binding Globulin and Opposite Expression Profiles in Lung and Liver. *PLoS One* 2016;11:e0146497.
9. Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, *et al.* Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol* 2006;26:7236–45.
10. García-Vicente S, Yraola F, Martí L, *et al.* Oral Insulin-Mimetic Compounds That Act Independently of Insulin. *Diabetes* 2007;56.
11. Ledda A, González M, Gulfo J, *et al.* Decreased OxLDL uptake and cholesterol efflux in THP1 cells elicited by cortisol and by cortisone through 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Atherosclerosis* 2016;250:84–94.
12. Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* 2011;335:2–13.
13. Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2013;380:89–98.
14. Cizza G, Rother KI. Cortisol binding globulin: more than just a carrier? *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:77–80.
15. Shpilberg Y, Beaudry JL, D'Souza A, Campbell JE, Peckett A, Riddell MC. A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis Model Mech* 2012;5.
16. Lacasa D, Agli B, Giudicelli Y. Permissive action of glucocorticoids on catecholamine-

- induced lipolysis: direct in vitro effects on the fat cell beta-adrenoreceptor-coupled-adenylate cyclase system. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:489–97.
17. Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 2008;49:1894–1903.
 18. Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:109–19.
 19. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56:16–23.
 20. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. Adipose Tissue Macrophages During High-Fat Diet – Induced Obesity in Mice. *Diabetes* 2010;59:1171–1181.
 21. Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, *et al.* Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab* 2014;20:103–118.
 22. Lim H-Y, Müller N, Herold MJ, van den Brandt J, Reichardt HM. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology* 2007;122:47–53.
 23. Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino D V, Riccardi C. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J* 2012;26:4805–20.
 24. Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: An emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 2013;154:993–1007.
 25. Bhattacharyya S, Brown DE, Brewer JA, Vogt SK, Muglia LJ. Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* 2007;109:4313–9.
 26. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:750–761.
 27. Tamayo E, Fernández A, Almansa R, *et al.* Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur Cytokine Netw* 2011;22:82–7.
 28. Koliwad SK, Kuo T, Shipp LE, *et al.* Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4, Fasting-induced Adipose Factor) Is a Direct Glucocorticoid Receptor Target and Participates in Glucocorticoid-regulated Triglyceride Metabolism. *J Biol Chem* 2009;284:25593–25601.
 29. Feingold KR, Shigenaga JK, Cross AS, Moser A, Grunfeld C. Angiopoietin like protein 4 expression is decreased in activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421:612–5.
 30. Nenke MA, Lewis JG, Rankin W, Torpy DJ. Evidence of Reduced CBG Cleavage in Abdominal Obesity: A Potential Factor in Development of the Metabolic Syndrome. *Horm Metab Res* 2016.

**NEW ROLES FOR CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN AND OPPOSITE
EXPRESSION PROFILES IN LUNG AND LIVER**

*José Gulfo¹, Angelo Ledda¹, Sabrina Gea-Sorlí, Laia Bonjoch, Daniel Closa, Mar Grasa,
Montserrat Esteve,*

Plos One (2016)11(1):1-15 doi:10.1371/journal.pone.0146497 January 7, 2016

¹ ambos autores han contribuidos por igual en este trabajo

RESEARCH ARTICLE

New Roles for Corticosteroid Binding Globulin and Opposite Expression Profiles in Lung and Liver

Jose Gulfo^{1,2}, Angelo Ledda^{1,2}, Sabrina Gea-Sorli³, Laia Bonjoch³, Daniel Closa³, Mar Grasa^{1,2}, Montserrat Esteve^{1,2}*

1 Department of Nutrition and Food Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** CIBER Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain, **3** Department of Experimental Pathology, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

☯ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* mesteve@ub.edu



OPEN ACCESS

Citation: Gulfo J, Ledda A, Gea-Sorli S, Bonjoch L, Closa D, Grasa M, et al. (2016) New Roles for Corticosteroid Binding Globulin and Opposite Expression Profiles in Lung and Liver. PLoS ONE 11(1): e0146497. doi:10.1371/journal.pone.0146497

Editor: Zoltán Rakonczay, Jr., University of Szeged, HUNGARY

Received: September 7, 2015

Accepted: December 17, 2015

Published: January 7, 2016

Copyright: © 2016 Gulfo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Support was provided by: Fondo Investigación Sanitaria PI09/00505 to ME MG; Fondo Investigación Sanitaria PI13/00019 to DC SG-S; Predoctoral scholarship from the University of Barcelona to JG; European and Sardinian scholarship "Master and Back" to AL; Grant from Generalitat de Catalunya (AGAUR, Grant FI DGR 2013) to LB.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Corticosteroid-binding globulin (CBG) is the specific plasma transport glycoprotein for glucocorticoids. Circulating CBG is mainly synthesized in liver but, its synthesis has been located also in other organs as placenta, kidney and adipose tissue with unknown role. Using an experimental model of acute pancreatitis in *cbg*^{-/-} mice we investigated whether changes in CBG affect the progression of the disease as well as the metabolism of glucocorticoids in the lung. Lack of CBG does not modify the progression of inflammation associated to pancreatitis but resulted in the loss of gender differences in corticosterone serum levels. In the lung, CBG expression and protein level were detected, and it is noteworthy that these showed a sexual dimorphism opposite to the liver, i.e. with higher levels in males. Reduced expression of 11β-HSD2, the enzyme involved in the deactivation of corticosterone, was also observed. Our results indicate that, in addition to glucocorticoids transporter, CBG is involved in the gender differences observed in corticosteroids circulating levels and plays a role in the local regulation of corticosteroids availability in organs like lung.

Introduction

Acute pancreatitis is a serious inflammatory process with significant morbidity and mortality. The most relevant complication during acute pancreatitis is the systemic inflammation that, in the severe forms of the disease, may lead to an acute respiratory distress syndrome [1]. This pulmonary dysfunction is characterized by an influx of inflammatory leukocytes and increases in pulmonary vascular permeability, being one of the most important factors contributing to death during the first week of the disease [2]. The mechanisms responsible for the involvement of distant organs are still unclear and different pathways have been suggested, including oxygen-derived free radicals and cytokines [3].

As occurs with other critical illnesses, such as sepsis, trauma and septic shock, the hypothalamic–pituitary–adrenal axis plays an important modulatory role in the control of the inflammatory process. Several reports suggested a link between an impaired adrenal secretion and the progression of systemic inflammation in acute pancreatitis [4]. In addition, corticosteroid insufficiency has been reported in patients with acute pancreatitis [5]. Nevertheless, the use of corticosteroid in the treatment of acute pancreatitis is still being debated and experimental studies suggest that although the prophylactic use of corticosteroids showed efficacy on some features of the disease, this effect was not observed with the therapeutic use [6].

In addition to glucocorticoids, changes in the levels of corticosteroid-binding globulin (CBG) have also been reported in patients with acute pancreatitis [7][8]. CBG is the specific high-affinity plasma transport glycoprotein for glucocorticoids. It is mainly synthesized in liver, although it could be also produced by the placenta, kidney and adipose tissue [9][10][11]. The main function of CBG seems to be glucocorticoids transport since under normal conditions 80–90% of circulating cortisol is bound with high affinity to CBG, while only 10–15% binds with low affinity to albumin and the remaining 5–10% is known as “free cortisol” [12].

It is accepted that CBG actively deliver glucocorticoid to inflamed tissue due to the action of elastase released by activated neutrophils. This protease cleaves CBG and disrupts the glucocorticoid-binding site, thus resulting in the release of the corresponding glucocorticoid in the areas of inflammation [13]. However, CBG has been located also in some intracellular compartments suggesting additional, and yet unknown, functions [14].

Herein, our study was designed to investigate, in an experimental model of acute pancreatitis in mice, whether changes in CBG could affect the progression of the disease as well as the metabolism of glucocorticoids in the lung. To do this, we compared the effects of pancreatitis in *cbg*^{+/+} and in *cbg*^{-/-} animals. Moreover, considering the remarkable differences in the metabolism of glucocorticoids between males and females, we did the experiments comparing the effects between the two genders.

Materials and Methods

Male and female C57BL/6 mice (25–30 g b.w.) *cbg*^{+/+} and *cbg*^{-/-} were used in all experiments. The colony of *cbg*^{-/-} was established through crossing heterozygous breeding kindly provided by Dr. Willnow. The procedure followed for disruption of the CBG gene was described by Petersen et al. [15]. Animals were housed in a controlled environment, fed with standard laboratory pelleted formula (Teklad Global 2018, Harlan-Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) and tap water ad libitum. This study conformed to European Community for the use of experimental animals and the institutional committee of animal care and research (C.E.E.A. Universitat de Barcelona) approved it.

Animal model of acute pancreatitis

Mice received 10 hourly intraperitoneal injections of 50 µg/kg cerulein (Sigma, USA) or PBS as control and were sacrificed one hour after the last injection [16]. Samples of pancreas, liver and lung were obtained, immediately frozen and maintained at -80°C until processed. Lung samples were also obtained for histological study. Samples of blood were centrifuged to obtain serum. Taking into account that some parameters evaluated show important circadian changes, the experiments were performed at the same hour, being the procedure started at 8 a. m. and animals sacrificed at 7 p.m.

Lipase

Plasma lipase was determined by using commercial turbidimetric assay kits from Randox (Antrim, U.K.), according to the supplier's specifications.

Myeloperoxidase

Neutrophilic infiltration was assessed by measuring myeloperoxidase (MPO) activity. MPO was measured photometrically with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate. Tissue samples were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM phosphate buffer at pH 6.0. Homogenates were disrupted for 30 seconds using a Labsonic sonicator (Braun Biotech, Inc., Allentown, PA, USA) at 20% power and submitted to three cycles of snap freezing in dry ice and thawing before a final 30 second sonication. Samples were incubated at 60°C for 2 hours and then spun down at 4000 xg for 12 minutes. The supernatants were collected for MPO assay. Enzyme activity was assessed photometrically at 630 nm.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA from tissue samples were extracted using the TRI Reagent[®] Solution (Ambion, Inc, USA). The RNA was quantified by measurement of the absorbance at 260 and 280 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA).

cDNA was synthesized using the an MMLV reverse transcriptase (Promega, USA) and oligo-dT primers, reverse transcription was then performed from 2 µg RNA sample. The reaction was incubated at 72°C for 5 min and 42°C 60 min, and then stored at -80°C.

Subsequent PCR amplification was performed in ABI PRISM 7900 HT detection system (Applied Biosystems), and was carried out using 10 µl of amplification mixtures containing SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), 8 ng of reverse-transcribed RNA and 300 nM of the correspondent mice primers: CBG forward: 5'-CCACCAAAGACACTCCCTTG-3' reverse: 5'-GCACATTCCCTTCATCCAGT-3'; 11β-HSD1 forward: 5'-CAAGGTCAA CGTGTCCATCA-3' reverse: 5'-TCCCAGAGATTTCCCTTCATAGC-3'; 11β-HSD2 forward: 5'-CTCCAAGGCAGCAATAGCAC-3' reverse: 5'-CGTTTCTCCCAGAGGTTTCAC-3'; and RPL32 forward: 5'-ACCAGTCAGACCGATATGTGAAAA-3' reverse: 5'-TGTTGTC AATGCCTCTGGGTTT-3'. Reactions were performed in duplicate and threshold cycle values were normalized to RPL32 gene expression. The specificity of the products was determined by melting curve analysis. The ratio of the relative expression of target genes to RPL32 was calculated by using the $\Delta C(t)$ formula.

Histological study

For histological studies, tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, paraplant-embedded, cut into 5 µm thick sections and stained with hematoxylin-eosin according to standard procedures. Sections were evaluated by light microscopy and the severity score was calculated based in a semiquantitative evaluation scale [17].

Immunohistochemistry

Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated and washed in PBS-Tween, and then they were treated with 0.3% hydrogen peroxide, blocked with 25% Rabbit serum and incubated overnight at 4°C with goat-antimouse CBG (LS-C39044, LifeSpan BioSciences, USA) diluted 1:100. After that, sections were sequentially incubated with biotinylated rabbit anti-goat (1:400, Vector Labs, USA) and avidin-biotin complex reaction (1:200, ABC Elite Kit, Vector

Laboratories) and developed with a diaminobenzidine hydrochloride chromogen (Sigma, USA). The slides were scanned and visualized using the Pannoramic Viewer 1.15.2 software.

Western blot of CBG

Serum samples (100 μ g per well) were separated by SDS/PAGE in a 10% gel and electrotransferred on to a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.). After blocking nonspecific binding sites with 5% nonfat milk and in TBSTween 0.05% for 90 minutes at room temperature, the membranes were incubated overnight with a CBG goat anti-mouse polyclonal antibody (1:1,000; LifeSpan) and albumin as control (1:50,000; sc-46293 Santa Cruz Biotechnology, USA)

Protein fraction from samples of lung was isolated using the TRI Reagent[®] Solution (Ambion, Inc, USA). Protein concentration was quantified by QuantiPro[™] BCA Assay Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 30 μ g of total protein per well were separated by SDS/PAGE proceeding similarly to serum samples for CBG detection. For lung the control was made using a primary antibody against tubulin (dil 1:1000, DM1A, Abcam, U.K.).

Immunoreactive proteins were further detected by an anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:20,000; sc-2922, Santa Cruz Biotechnology, USA) and using the Luminata[™] Forte Western HRP Substrate (Millipore, Billerica, USA).

Total Corticosterone

Corticosterone in serum was measured by radioimmunoanalysis using a sheep anti-corticosterone antibody (AB1297, Millipore, USA) and we proceeded as described previously [18].

CBG binding capacity

To remove corticosterone from serum samples, 10 μ l of serum samples were added to 0.5 ml of a charcoal-dextran suspension [0.05% dextran and 0.5% charcoal (Norit A, Sigma) in PBS with 0.1% of gelatin (PBSG) at pH 7.4] and incubated at room temperature for 30 minutes with occasional shaking. Samples were then centrifuged and the clear supernatants were further diluted 1/5 with PBSG buffer. These hormone-stripped samples were used for corticosterone binding assays. The final concentration of labelled corticosterone in the tubes was 15 nM in a total volume of 200 μ l. Then, 200 μ l of a constant stirring charcoal-dextran suspension were added to each tube. These were shaken, left to stand for 10 min in an ice bath, and centrifuged for 10 min. Aliquots of 200 μ l of the clear supernatants were added to 4 ml of a water-miscible scintillation cocktail (Ecolite, MP Biomedicals, USA) and counted in a standard scintillation counter. In all samples, individual unspecific binding (measured in a 500-fold excess of non-radioactive corticosterone) was measured and subtracted from the total radioactivity bound to diluted stripped serum.

Statistical analysis

The data were analyzed using the GraphPad software program version 5.0 and were expressed as the mean \pm SEM. Statistical comparisons were made by two-way ANOVA analysis, evaluating the variables "treatment" (control, cerulein) and "sex" (male, female). Bonferroni was used as a post-test. The P values < 0.05 were considered significant.

Results

Induction of acute pancreatitis

Administration of cerulein induced an acute pancreatitis evidenced by the increased levels of circulating lipase. In the *cbg*^{+/+} mice, this increase was higher in females than in males. By contrast, there no gender differences were observed in the *cbg*^{-/-} mice. In males the increase of lipase circulating levels promoted by pancreatitis was higher in *cbg*^{-/-} than *cbg*^{+/+} mice, but in female the inverse effect was observed. (Fig 1A).

Inflammation in the pancreas, measured as MPO activity, showed an increase between four to five times in all cerulein treated mice compared to controls without differences among males and females. (Fig 1B). Similar profile was observed in the lung (Fig 1C) but in this case the increase observed in pancreatitis induced mice was between two and three times higher than controls. Histological study (Fig 2) of pancreas showed interstitial edema and infiltration of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in all cerulein treated groups. Acinar necrosis was only promoted by cerulein in females. In lung cerulein induced alveolar thickening and polymorphonuclear leukocytes infiltration in all treated mice.

Corticosterone and CBG in serum and liver

Pancreatitis did not induce significant changes in *cbg*^{+/+} animals, although females showed higher levels of circulating corticosterone than males. Interestingly, the *cbg*^{-/-} mice showed lower levels of corticosterone in control animals and cerulein treatment induced recovery of the levels to the *cbg*^{+/+} in both males and females (Fig 3A).

Similar results were found when measuring the CBG binding capacity in serum of *cbg*^{+/+} animals; females showed higher levels than males and, in both genders, pancreatitis did not modify these levels. As expected, all *cbg*^{-/-} mice showed negligible binding activity (Fig 3B).

Circulating CBG levels in *cbg*^{+/+} animals revealed that females had higher levels than males. Pancreatitis did not induce changes in males but resulted in an increase in CBG in females. No detectable levels of CBG were found in *cbg*^{-/-} animals (Fig 4A).

Finally, liver is the main source of circulating CBG and, as occurred with the serum levels, significant differences were found when comparing males and females in *cbg*^{+/+} animals (Fig 4B). The higher levels of expression were observed in females and pancreatitis had no effect on this expression. A residual expression of CBG was detected in *cbg*^{-/-} mice.

CBG and corticosterone metabolism in the lung

In the lung tissue, CBG expression in males *cbg*^{+/+} was increased after induction of pancreatitis. By contrast, CBG expression in females *cbg*^{+/+} after induction of acute pancreatitis remained unmodified (Fig 5A) resulting in lower levels than males *cbg*^{+/+} with pancreatitis. As occurred in liver, residual expression of CBG was observed in the lung of *cbg*^{-/-} animals. Similar pattern was found when analyzing by western blot the levels of CBG in tissue (Fig 5B). Finally, immunohistochemical analysis confirmed the induction of CBG in lung from male mice and the lack of induction in female (Fig 6). CBG expression was observed in the alveolar epithelial cells and macrophages. Although there was a residual RNA expression of CBG in *cbg*^{-/-} mice, no staining was observed in the corresponding histological samples.

In order to evaluate the capability of corticosterone synthesis or degradation in lung, we determined the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) and type 2 (11 β -HSD2). No differences were observed in 11 β -HSD1 expression in any condition, nor due to genotype, cerulein treatment or gender (Fig 7A).

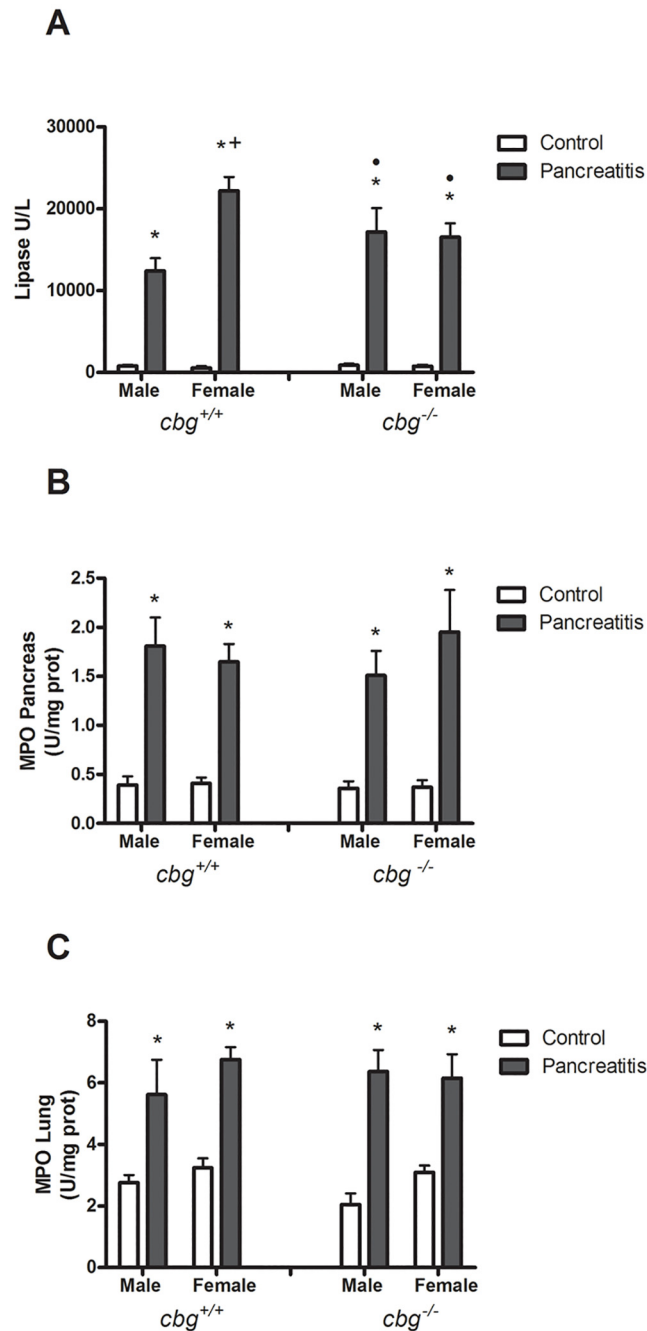
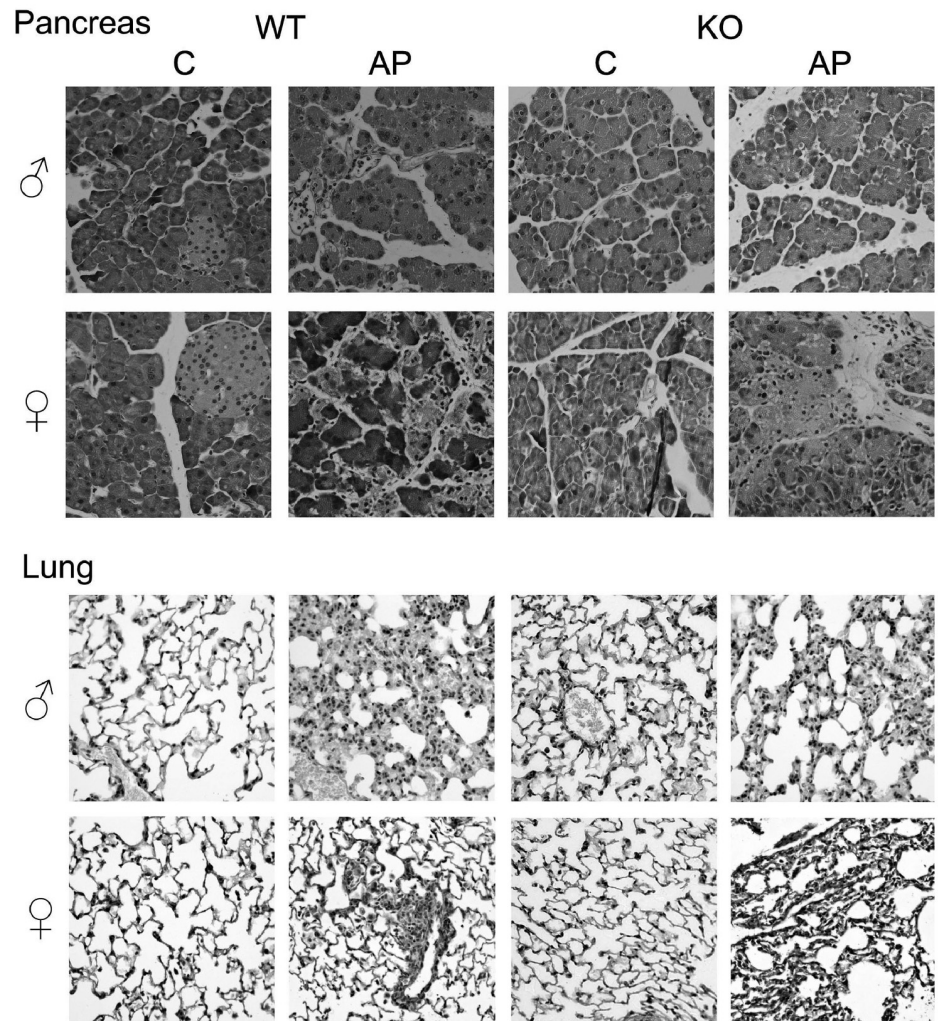


Fig 1. Induction of pancreatitis. (A) Levels of circulating lipase. Pancreatitis resulted in an increase in plasma lipase in all experimental groups. This increase was significantly higher in female *cbg*^{+/+}. (B) Myeloperoxidase activity in pancreas and (C) lung. Pancreatitis resulted in an increase in myeloperoxidase in all experimental groups. This increase resulted more marked in pancreas than in lung. Two Way Anova: circulating Lipase: Treatment P<0.0001, Sex P = 0.0063 Interaction P = 0.0040; Myeloperoxidase activity in pancreas: Treatment P<0.0001, Sex P = 0.7436, Interaction P = 0.7499; Myeloperoxidase activity in lung: Treatment P<0.0001, Sex P = 0.5030, Interaction P = 0.6427; Bonferroni Post-test: * P<0.05 control vs pancreatitis; + P<0.05 male vs female; • P<0.05 *cbg*^{+/+} vs *cbg*^{-/-}.

doi:10.1371/journal.pone.0146497.g001



	Males				Females			
	<i>cbg^{+/+}</i>		<i>cbg^{-/-}</i>		<i>cbg^{+/+}</i>		<i>cbg^{-/-}</i>	
	Control	Pancreatitis	Control	Pancreatitis	Control	Pancreatitis	Control	Pancreatitis
PANCREAS								
Interstitial edema	+	++	+	++	+	++	+	++
Acinar necrosis	-	-	-	-	-	+	-	++
PMN infiltration	-	++	-	++	-	++	-	+++
LUNG								
Alveolar thickening	-	++	-	++	-	+	-	+
PMN infiltration	-	++	-	++	-	++	-	++

Fig 2. Injury and severity scores for pancreas and lung. Representatives H&E stained sections and severity score for each experimental group. Severity score was obtained using semiquantitative evaluation scale and the results were the mean of the lesions observed in each group. PMN = polymorphonuclear leukocytes; — = no lesion; + = mild lesion; ++ = moderate lesion; +++ = intense lesion.

doi:10.1371/journal.pone.0146497.g002

With respect to 11 β -HSD2 expression (Fig 7B), gender differences were not found, nor in *cbg^{+/+}* nor in *cbg^{-/-}* mice. Pancreatitis, in males and females *cbg^{+/+}* mice, significantly reduced the expression of 11 β -HSD2. In the *cbg^{-/-}* mice, control expression was lower than in *cbg^{+/+}* and pancreatitis also resulted in a decreased expression although in this case only in females achieved significantly values.

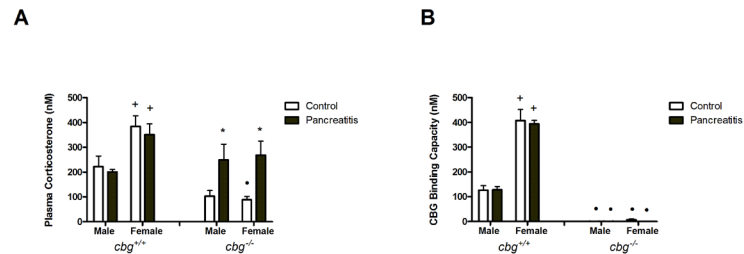


Fig 3. (A) Total corticosterone circulating in serum and (B) CBG binding capacity in serum. Female mice showed higher levels of corticosterone and CBG binding capacity than males in *cbg*^{+/+} animals. These differences disappeared in *cbg*^{-/-} animals. *cbg*^{-/-} females showed significantly lower levels of corticosterone. Pancreatitis did not modify the levels of corticosterone in *cbg*^{+/+} animals, while in *cbg*^{-/-} mice induced a recovery to levels of *cbg*^{+/+} animals. Two Way Anova: Total corticosterone: Treatment P = 0.0210, Sex P < 0.0001, Interaction P = 0.0171; CBG binding capacity: Treatment P = 0.7538, Sex P < 0.0001, Interaction P = 0.9624; Bonferroni Post-test: * P < 0.05 control vs pancreatitis; + P < 0.05 male vs female; • P < 0.05 *cbg*^{+/+} vs *cbg*^{-/-}.

doi:10.1371/journal.pone.0146497.g003

Since 11 β -HSD1 catalyzes the conversion of 11-dehydrocorticosterone to the active corticosterone, whereas 11 β -HSD2 catalyzes the opposite reaction, the ratio 11 β -HSD1/11 β -HSD2 indicates the changes in the local glucocorticoid metabolism (Fig 7C). Induction of pancreatitis increases the ratio 11 β -HSD1/11 β -HSD2 in both genders, indicating a higher level of local corticosterone activation. Similar effect was observed in the *cbg*^{-/-} mice.

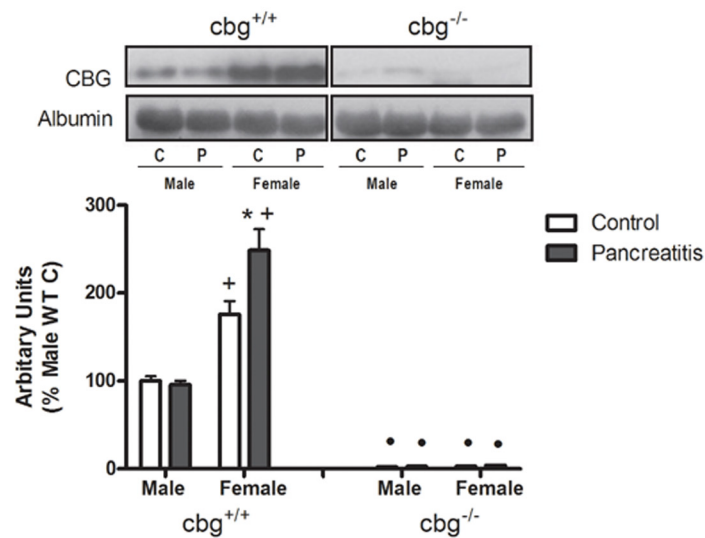
Discussion

The progression of the inflammatory response results from the balance of several pro- and anti-inflammatory mediators. Cytokines, free radicals, lipid mediators and activated enzymes promote the activation of inflammatory pathways, not only locally, but also in circulating cells and in distant organs [19]. These effects are counteracted by the release of anti-inflammatory cytokines as IL-10 [20] or proteins as pancreatitis associated protein [21]. However, glucocorticoids are known to play a major role in the control of the inflammatory response and corticosteroid insufficiency has been reported in patients with inflammatory diseases as acute pancreatitis [5][22].

It is known that the glucocorticoids ability to regulate the inflammatory response is strongly related with their availability on the site of inflammation. Tissue availability of glucocorticoids, namely the proportion of glucocorticoid able to bind to the receptor and carry out a response, depends of its synthesis at adrenal gland [23], its binding to the CBG [24], as well as its activation or inhibition catalyzed locally by the intracellular activity of enzymes 11 β -HSD1 and 11 β -HSD2 [25]. Elastase from activated neutrophils can cleave CBG and promote the release of bound glucocorticoids at the inflammation precise site [26]. An active role of CBG in glucocorticoid response is supported by observations in CBG deficient mice, that show a higher mortality in response to septic shock with lung particularly affected [15]. In acute pancreatitis the respiratory distress syndrome is the most relevant problem associated [1]. Therefore, we aimed to study the changes in blood and specifically lung glucocorticoid availability to cope with inflammation and the lung injury associated in CBG deficient mice with acute pancreatitis. Also we included males and females since the known sexual dimorphism of CBG could be an important modulator that would lead to different responses in each gender.

In general the induction of pancreatitis in mice resulted in higher levels of circulating lipase that were more pronounced in female *cbg*^{+/+} animals. This difference was not observed in *cbg*^{-/-} mice and the levels achieved were similar to that observed in male *cbg*^{+/+} mice (Fig 1A). In pancreas and lung the induction of pancreatitis also increased the inflammatory response without

A



B

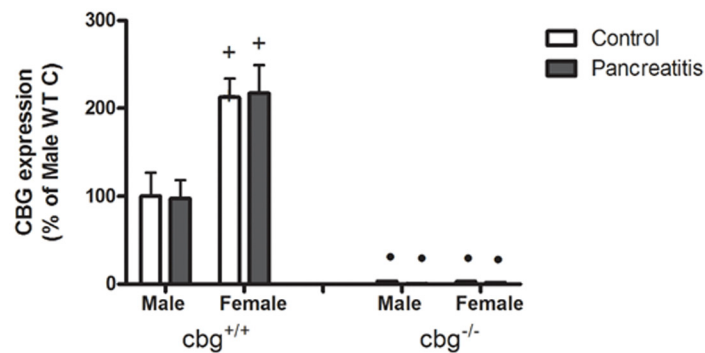


Fig 4. (A) Serum CBG protein levels measured by western blot and (B) liver CBG expression measured by RT-PCR. In both cases, females had higher levels than males and pancreatitis promoted an increase of CBG protein levels only in females. No CBG was detected in serum of *cbg*^{-/-} mice and only a residual expression was detected in liver. C refers to control mice and P refers to pancreatitis mice. Two Way Anova: Serum CBG levels: Treatment P = 0.0155, Sex P < 0.0001, Interaction P = 0.0007; liver CBG expression: Treatment P = 0.9681, Sex P < 0.0001, Interaction P = 0.9972; Bonferroni Post-test: * P < 0.05 control vs pancreatitis; + P < 0.05 male vs female; • P < 0.05 *cbg*^{+/+} vs *cbg*^{-/-}.

doi:10.1371/journal.pone.0146497.g004

differences between genders or *cbg*^{+/+} mice versus the *cbg*^{-/-} (Fig 1B and 1C). The pancreatitis severity score determined by histological study (Fig 2) showed pancreatic acinar necrosis in female but not in male while a minor lung alveolar thickening was observed in female. Differences triggered by the genotype were only observed in the females with a slightly more damaged pancreas in *cbg*^{-/-} compared to *cbg*^{+/+} mice. The results clearly state that pancreatitis was

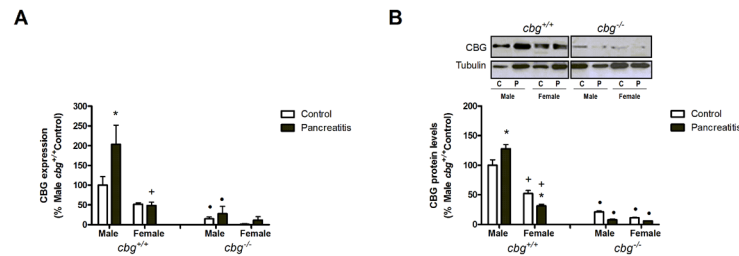


Fig 5. (A) Lung CBG expression measured by RT-PCR and (B) lung CBG protein levels measured by western blot. Females had significantly lower levels of CBG protein than males without differences in the expression levels. Only in mice males the both parameters were increased by induction of pancreatitis. A residual expression and levels of CBG were detected in *cbg*^{-/-} mice. C refers to control mice and P refers to pancreatitis mice. Two way Anova: Lung CBG expression: Treatment P = 0.0182, Sex P < 0.0001, Interaction P = 0.0188; lung CBG levels: Treatment P = 0.4544, Sex P < 0.0001, Interaction P = 0.0009; Bonferroni Post test: * P < 0.05 control vs pancreatitis; + P < 0.05 male vs female; • P < 0.05 *cbg*^{+/+} vs *cbg*^{-/-}.

doi:10.1371/journal.pone.0146497.g005

induced but failed to show significant differences in the severity of the disease as a consequence of circulating CBG levels. Whereas serum lipase suggested more severity in females *cbg*^{+/+} other parameters showed no differences between *cbg*^{+/+} vs *cbg*^{-/-} as pancreas and lung MPO activity or severity scores in the case of males. Finally, the histological analysis in females suggested more severity in *cbg*^{-/-} mice. To clearly determine if there are differences between *cbg*^{+/+} and *cbg*^{-/-} mice in the severity of the pancreatitis induced by cerulein further studies are needed.

On the other hand, when analyzing the total serum corticosterone levels in the *cbg*^{+/+} mice (Fig 3A) we observed that there was a clear difference between male and female, showing females the expected higher levels than males [27], however no changes due to pancreatitis. By contrast, *cbg*^{-/-} control mice showed low levels of corticosterone without differences between male and female. Interestingly, pancreatitis significantly increased corticosterone in *cbg*^{-/-} animals in a similar magnitude in both genders, until the levels of *cbg*^{+/+} mice (Fig 3A). We were very careful inducing pancreatitis and obtaining samples at the same time of day in all animals to avoid errors due to circadian changes in circulating corticosterone, a factor that may cause confusion as it has been demonstrated by Richard et al. [28].

The low levels observed in circulating corticosterone in *cbg*^{-/-} mice agree with those reported by Petersen et al [15]. It has been suggested that this carrier protein have specific roles in the regulation of circulating turnover, local delivery, and cellular signal transduction of steroid hormones [29]. The total corticosterone levels are regulated through hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis by a negative feed-back mechanism. It is accepted that the biologically active corticosterone is the free fraction circulating in blood while the corticosterone bound to CBG is unable to enter the cell and, therefore, is considered inactive. In our study, *cbg*^{-/-} mice display increased free levels, i.e. active glucocorticoid. Despite that, it has been described that *cbg*^{-/-} mice exhibit higher levels of ACTH, a sign of HPA activity [15]. Further, we have observed that the *cbg*^{-/-} mice show an adrenal gland weight significantly larger than *cbg*^{+/+} mice (unpublished results) indicating a major activity of the gland. These features suggest that the HPA axis is irresponsive to the negative feed-back exerted by free corticosterone in *cbg*^{-/-} pointing to a role of CBG in the HPA axis control and regulating corticosterone synthesis.

In addition to the higher levels of total serum corticosterone in female (Fig 3A) there were also clear differences in circulating CBG (Fig 4A), and CBG binding capacity (Fig 3B) when comparing males and females, as expected, having the females higher values in all these parameters [27]. It is noteworthy that in *cbg*^{-/-} mice, the gender difference in corticosterone levels was not observed in controls neither in pancreatitis induced animals. The role of CBG in the gender differences on circulating glucocorticoids have been observed recently in a model of emotional

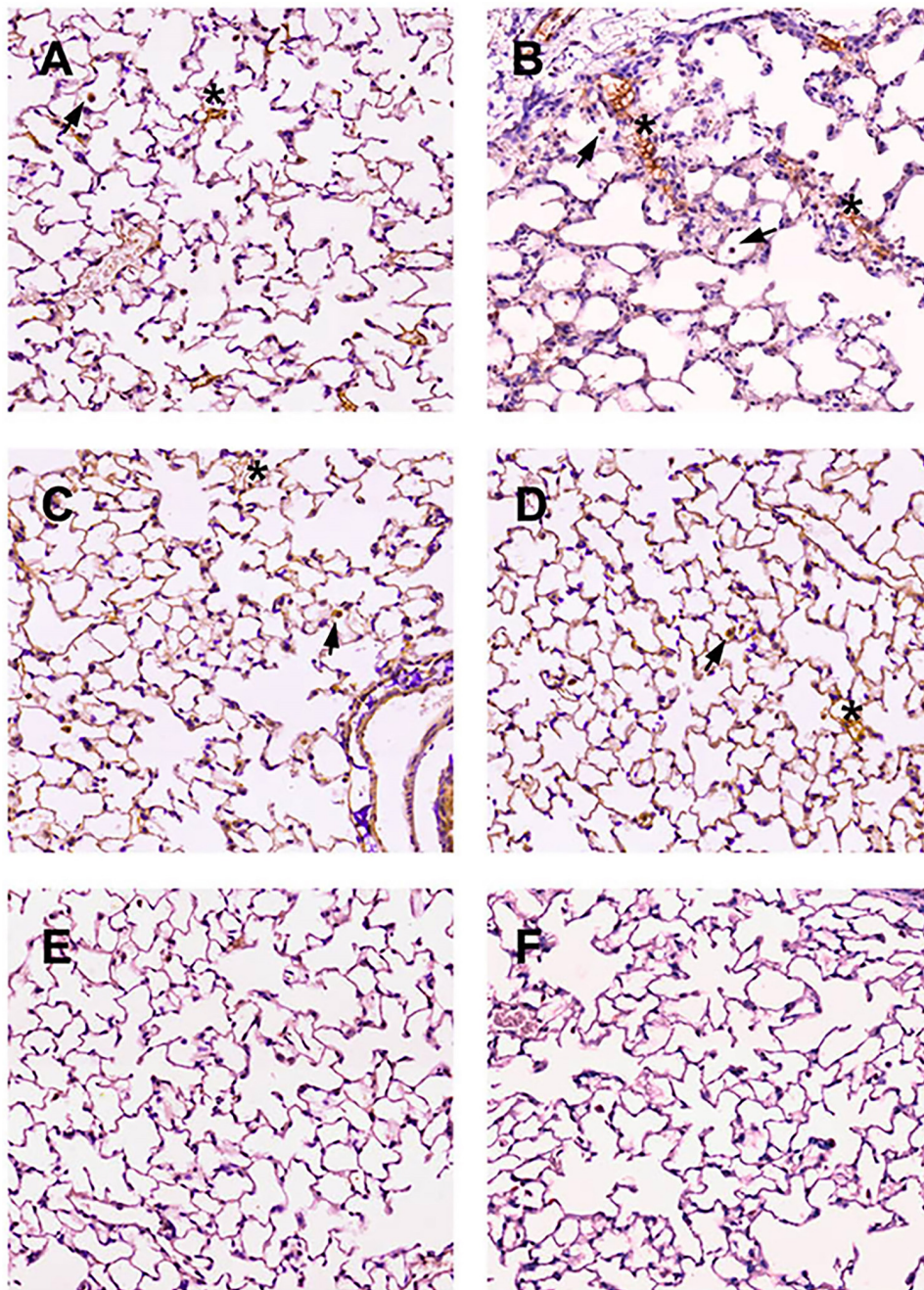
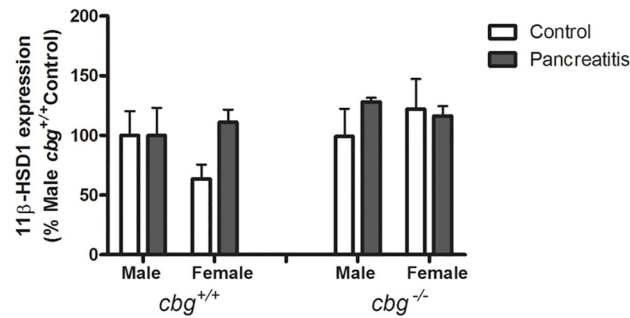


Fig 6. Immunohistochemical analysis of CBG in lung. A) male $cbg^{+/+}$ control, B) male $cbg^{+/+}$ pancreatitis, C) female $cbg^{+/+}$ control, D) female $cbg^{+/+}$ pancreatitis, E) mice $cbg^{-/-}$ control and F) negative control without primary antibody. In all $cbg^{+/+}$ groups there were stained alveolar epithelial cells indicated with an asterisk and some macrophages indicated with an arrow. There was an increase of positive cells in males after induction of pancreatitis. No differences were observed between controls and pancreatitis in females.

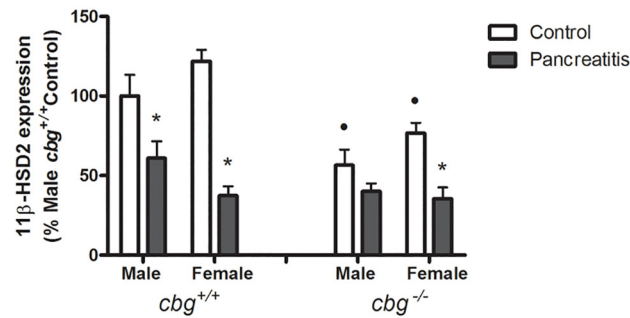
doi:10.1371/journal.pone.0146497.g006

stress [30] where was found that the sex differences normally described for stress reactivity disappear when estrogens are removed in ovariectomized mice. Furthermore, the $cbg^{-/-}$ mice showed no differences between males and females in stress reactivity and neither in the absence of estrogens. Nevertheless, there are some differences in the response of $cbg^{-/-}$ animals to stress

A



B



C

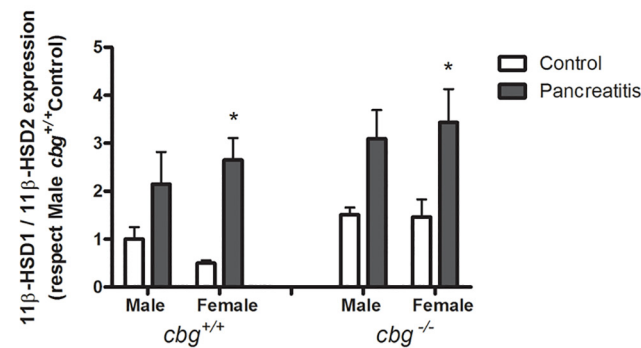


Fig 7. (A) Lung expression of 11β-HSD1, (B) of 11β-HSD2 and (C) the ratio 11β-HSD1/11β-HSD2 (C). The expression of 11β-HSD1 only showed a not significant increase induced by pancreatitis in *cbg*^{+/+} female. In contrast, pancreatitis decreased in both genders the expression of 11β-HSD2. *Cbg*^{-/-} mice showed lower expression of 11β-HSD2. The ratio 11β-HSD1/11β-HSD2 was increased by pancreatitis in all groups studied but only significantly in females for both genotypes. Two Way Anova: Lung expression of 11β-HSD1: Treatment P = 0.2238, Sex P = 3996, Interaction P = 5188; Lung expression of 11β-HSD2: Treatment P < 0.0001, Sex P = 0.0012, Interaction P = 0.0057; ratio 11β-HSD1/11β-HSD2: Treatment P < 0.0001, Sex P = 0.1818, Interaction P = 0.7634; Bonferroni Post test: * P < 0.05 control vs pancreatitis; + P < 0.05 male vs female; • P < 0.05 *cbg*^{+/+} vs *cbg*^{-/-}.

doi:10.1371/journal.pone.0146497.g007

or to acute pancreatitis inflammation. While under the stress, *cbg*^{-/-} animals failed to increase corticosterone levels [30], in our model they show the ability to increase its levels in response of inflammation. Therefore, CBG seems determinant to maintain the levels of circulating glucocorticoids and their gender differences.

It is well known that CBG regulates the amount of free corticosterone released during inflammation [26] but our results indicate that this protein also plays a role in modulating the concentration of total circulating corticosterone. The highest levels of serum CBG detected in females probably induces a high buffering effect thus promoting the synthesis of more total corticosterone in order to achieve the concentrations of free hormone necessary for homeostasis. Although liver is the main site of synthesis for CBG which is secreted into the blood to transport corticosterone, some reports described the generation of this globulin in other organs as kidney, pancreas, placenta, hypothalamus and adipose tissue [9] [31] [10] [32][11] where its function remains unknown. The cDNA of CBG was cloned firstly from a cDNA library of liver and lung [33] and a CBG precursor has been described in pleural effusions from lung adenocarcinoma patients [34], but despite this, the significance of its presence in the lung has been little explored. Here, we evaluated the presence of CBG in the lung. RNA expression, western blot and immunohistochemistry analysis revealed that lung also generate CBG. Interestingly, the local expression of CBG in the lung (Fig 5) showed a completely opposite pattern than that observed in liver (Fig 4B), having males higher expression of CBG than females. This fact suggests a different role for CBG in these organs. While liver is the main source for circulating CBG, the role in the lung appears to be restricted to the control of local corticoids bioavailability.

Although the circulating levels of corticosterone reflect the general systemic anti-inflammatory response, the action of corticosterone also depends on the local activity of the enzymes 11 β -HSD1 and 11 β -HSD2. In general, it is accepted that in response to inflammation the levels of 11 β -HSD1 are increased in order to potentiate the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. Less information is available on 11 β -HSD2. In vitro it is known that pro-inflammatory cytokines, as TNF α , upregulate 11 β -HSD1 [35] and downregulate 11 β -HSD2 [36]. Downregulation of 11 β -HSD2 without changes in 11 β -HSD1 has also been described in skin lesions of leprosy patients [37]. In our study, the main change observed in the lung was the decreased levels of the inactivating enzyme 11 β -HSD2 elicited by pancreatitis without modification of 11 β -HSD1 expression. Irrespective of gender or genotype, pancreatitis resulted in similar high levels of 11 β -HSD1/11 β -HSD2 ratio, evidencing the expected corticosterone activation status triggered by an inflammatory stimulus. Altogether suggests that in lung the anti-inflammatory actions of glucocorticoids would be determined by 11 β -HSD2.

Interestingly, in control *cbg*^{-/-} mice lung expression of 11 β -HSD2 showed lower levels than *cbg*^{+/+}. This fact could be a mechanism to increase corticosterone levels into the tissue to counteract the impaired availability of tissue corticosterone observed in *cbg*^{-/-} [15].

In conclusion, our results indicate that the role of CBG is not only restricted to act as a carrier of corticosteroids and a modulator of its tissue availability. It is also an important factor involved in the gender differences observed in corticosteroids levels. CBG is generated in the lung showing a pattern of expression opposite to the liver either in the response to the acute pancreatitis as in the sexual dimorphism. These differences between liver and lung suggest that CBG has a specific, and yet unexplored, role in the lung.

Acknowledgments

The investigation was supported by the Fondo Investigación Sanitaria PI09/00505 (to Montserrat Esteve) and PI13/00019 (to Daniel Closa). José Gulfo was the recipient of a predoctoral

scholarship from the University of Barcelona, Angelo Ledda was the recipient of a European and Sardinian scholarship “Master and Back” and Laia Bonjoch was supported by a grant from Generalitat de Catalunya (AGAUR, Grant FI DGR 2013). Thanks to the Biobank of the IDI-BAPS for the technical help on the immunohistochemistry study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ME MG DC. Performed the experiments: JG AL SG-S LB. Analyzed the data: ME MG DC JG AL. Wrote the paper: ME MG DC.

References

1. Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2005; 5: 132–144. PMID: [15849484](#)
2. Buter A, Imrie CW, Carter CR, Evans S, McKay CJ. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2002; 89: 298–302. PMID: [11872053](#)
3. Folch E, Salas A, Panés J, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Anderson DC, et al. Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress. *Ann Surg*. 1999; 230: 792–8; discussion 798–9. PMID: [10615934](#)
4. Yu J, Xu S, Wang W-X, Deng W-H, Jin H, Chen X-Y, et al. Changes of inflammation and apoptosis in adrenal gland after experimental injury in rats with acute necrotizing pancreatitis. *Inflammation*. 2012; 35: 11–22. doi: [10.1007/s10753-010-9284-2](#) PMID: [21161352](#)
5. De Waele JJ, Hoste EAJ, Baert D, Hendrickx K, Rijckaert D, Thibo P, et al. Relative adrenal insufficiency in patients with severe acute pancreatitis. *Intensive Care Med*. 2007; 33: 1754–60. PMID: [17572872](#)
6. Yu M, Yang Z, Zhu Y, Lu N. Efficacy of glucocorticoids in rodents of severe acute pancreatitis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7: 3647–61. PMID: [25120741](#)
7. Muller CA, Vogeser M, Belyaev O, Gloor B, Strobel O, Weyhe D, et al. Role of endogenous glucocorticoid metabolism in human acute pancreatitis. *Crit Care Med*. 2006; 34: 1060–6. PMID: [16484908](#)
8. Muller CA, Belyaev O, Vogeser M, Weyhe D, Gloor B, Strobel O, et al. Corticosteroid-binding globulin: a possible early predictor of infection in acute necrotizing pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 2007; 42: 1354–61. PMID: [17852861](#)
9. Scrocchi LA, Hearn SA, Han VK, Hammond GL. Corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the mouse liver and kidney during postnatal development. *Endocrinology*. 1993; 132: 910–6. PMID: [8425503](#)
10. Misao R, Iwagaki S, Sun WS, Fujimoto J, Saio M, Takami T, et al. Evidence for the synthesis of corticosteroid-binding globulin in human placenta. *Horm Res*. 1999; 51: 162–7. PMID: [10474016](#)
11. del Mar Grasa M, Cabot C, Adán C, de Matteis R, Esteve M, Cinti S, et al. Corticosteroid-binding globulin synthesis and distribution in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem*. 2001; 228: 25–31. PMID: [11855738](#)
12. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981; 53: 58–68. PMID: [7195404](#)
13. Hammond GL, Smith CL, Underhill DA. Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991; 40: 755–62. PMID: [1958574](#)
14. Caldwell JD, Jirikowski GF. Sex hormone binding globulin and corticosteroid binding globulin as major effectors of steroid action. *Steroids*. 2014; 81: 13–6. doi: [10.1016/j.steroids.2013.11.010](#) PMID: [24269740](#)
15. Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, Brasen JH, Schulz H, Gross V, et al. Hyporesponsiveness to Glucocorticoids in Mice Genetically Deficient for the Corticosteroid Binding Globulin. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 7236–7245. PMID: [16980625](#)
16. Pastor CM, Rubbia-Brandt L, Hadengue A, Jordan M, Morel P, Frossard JL. Role of macrophage inflammatory peptide-2 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Lab Invest*. 2003; 83: 471–8. PMID: [12695550](#)
17. Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg*. 1999; 229: 230–6. PMID: [10024105](#)

18. del Mar Grasa M, Serrano M, Fernández-López JA, Alemany M. Corticosterone inhibits the lipid-mobilizing effects of oleoyl-estrone in adrenalectomized rats. *Endocrinology*. 2007; 148: 4056–63. doi: [10.1210/en.2007-0331](https://doi.org/10.1210/en.2007-0331) PMID: [17510239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17510239/)
19. Franco-Pons N, Gea-Sorlí S, Closa D. Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis. *J Pathol*. 2010; 221: 175–82. doi: [10.1002/path.2691](https://doi.org/10.1002/path.2691) PMID: [20217859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20217859/)
20. Zhang J, Niu J, Yang J. Interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 in estimating the severity of acute pancreatitis: an updated meta-analysis. *Hepatology*. 2011; 53: 215–20. PMID: [24895824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24895824/)
21. Closa D, Motoo Y, Iovanna JL. Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 170–4. PMID: [17226896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17226896/)
22. Peng Y-S, Wu C-S, Chen Y-C, Lien J-M, Tian Y-C, Fang J-T, et al. Critical illness-related corticosteroid insufficiency in patients with severe acute biliary pancreatitis: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2009; 13: R123. doi: [10.1186/cc7978](https://doi.org/10.1186/cc7978) PMID: [19630953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19630953/)
23. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812: 581–91. doi: [10.1016/j.bbadis.2011.02.003](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.003) PMID: [21320597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21320597/)
24. Torpy DJ, Ho JT. Corticosteroid-binding globulin gene polymorphisms: clinical implications and links to idiopathic chronic fatigue disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007; 67: 161–7.
25. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol Rev*. 2013; 93: 1139–206. doi: [10.1152/physrev.00020.2012](https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012) PMID: [23899562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23899562/)
26. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990; 71: 34–9. PMID: [2370299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2370299/)
27. Jansson J-O, Oscarsson J, Mode A, Ritzen EM. Plasma growth hormone pattern and androgens influence the levels of corticosteroid-binding globulin in rat serum. *J Endocrinol*. 1989; 122: 725–732. PMID: [2809480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2809480/)
28. Richard EM, Helbling J-C, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, et al. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology*. 2010; 151: 649–59. doi: [10.1210/en.2009-0862](https://doi.org/10.1210/en.2009-0862) PMID: [20022933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20022933/)
29. Perogamvros I, Ray DW, Trainer PJ. Regulation of cortisol bioavailability—effects on hormone measurement and action. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8: 717–27. doi: [10.1038/nrendo.2012.134](https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.134) PMID: [22890008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22890008/)
30. Minni AM, de Medeiros GF, Helbling JC, Duittoz A, Marissal-Arvy N, Foury A, et al. Role of corticosteroid binding globulin in emotional reactivity sex differences in mice. *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier; 2014; 50: 252–63.
31. Scrocchi LA, Orava M, Smith CL, Han VK, Hammond GL. Spatial and temporal distribution of corticosteroid-binding globulin and its messenger ribonucleic acid in embryonic and fetal mice. *Endocrinology*. 1993; 132: 903–9. PMID: [7916682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7916682/)
32. Jirikowski GF, Pusch L, Möpert B, Herbert Z, Caldwell JD. Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat*. 2007; 34: 22–28. PMID: [17467234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17467234/)
33. Hammond GL, Smith CL, Goping IS, Underhill DA, Harley MJ, Reventos J, et al. Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 5153–7. PMID: [3299377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3299377/)
34. Tyan Y-C, Wu H-Y, Su W-C, Chen P-W, Liao P-C. Proteomic analysis of human pleural effusion. *Proteomics*. 2005; 5: 1062–74. doi: [10.1002/pmic.200401041](https://doi.org/10.1002/pmic.200401041) PMID: [15682465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15682465/)
35. Cai TQ, Wong B, Mundt SS, Thieringer R, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A. Induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 77: 117–22. PMID: [11377976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11377976/)
36. Heiniger CD, Rochat MK, Frey FJ, Frey BM. TNF- α enhances intracellular glucocorticoid availability. *FEBS Lett*. 2001; 507: 351–6. PMID: [11696370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11696370/)
37. Andersson AK, Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Chaduvula M, Jain S, Suneetha L, et al. Alteration of the cortisol-cortisone shuttle in leprosy type 1 reactions in leprosy patients in Hyderabad, India. *Immunol Lett*. 2007; 109: 72–5. PMID: [17320974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17320974/)

**DOWN-REGULATED ADRENAL CORTICOSTERONE SYNTHESIS IN CBG-
DEFICIENT MICE**

José Gulfo, Ricard Castel, Angelo Ledda, Montserrat Esteve, Mar Grasa

Manuscrito en preparación

MANUSCRITO EN PREPARACIÓN

Down-regulated adrenal corticosterone synthesis in CBG-deficient mice

José Gulfo^{1,2,3}, Ricard Castel¹, Angelo Ledda^{1,2,3}, Montserrat Esteve^{1,2,3,‡}, Mar Grasa^{1,2,3,‡}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²CIBER Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

³Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, Barcelona, Spain

‡ Both authors contributed equally to this work as senior researchers

Running title: adrenal gland hormones synthesis in CBG deficiency

Corresponding author: Montserrat Esteve; Faculty of Biology, Prevosti building, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain; E-mail: mesteve@ub.edu; Telephone number: +34-93-4020137

Keywords: Corticosteroid Binding Globulin, corticosterone, catecholamines, adrenal gland

Abstract

Corticosteroid-binding globulin (CBG) is synthesized by the liver and secreted into the bloodstream where binds to glucocorticoids. Thus CBG has the role of glucocorticoid transport and free hormone amount control. In addition, CBG has been detected in some extrahepatic tissues without a known role. CBG-deficient mice show decreased total corticosterone levels with missing of classical sexual dimorphism, increased free corticosterone, higher adrenal gland size and altered response to HPA axis. Here we aimed to ascertain whether CBG deficiency could affect the endocrine synthetic activity of adrenal gland and if the adrenal gland produces CBG. So, were determined the expression in adrenal gland of proteins involved in the cholesterol uptake and its transport to mitochondria, of the main enzymes involved in the corticosterone, aldosterone and catecholamines synthesis. We also studied if adrenal gland synthesizes CBG. The results obtained showed that CBG is present in adrenal gland and it is located mainly in the medulla. The absence of CBG results in a diminished expression of the ACTH receptor (MC2R), of the cholesterol uptake protein SRB1 and of the main proteins involved in the adrenal hormones synthesis. This decreased expression was stronger in females than males resulting in the loss of adrenal sexual dimorphism. In conclusion, as much the presence of CBG in adrenal gland as the consequences observed on the adrenal gland hormones synthesis due to its lack, point to a relevant, yet unexplored, role of CBG.

Introduction

Glucocorticoids are steroid hormones that are secreted by the adrenal gland and perform pleiotropic functions. Their synthesis is regulated through hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA)¹ activity. Disturbance of the HPA axis leads to important physiological consequences that significantly affect energy metabolism, immune function, etc.²

Corticosteroid-binding globulin (CBG) is the main protein that carries glucocorticoids in blood and has high binding affinity for glucocorticoids. Thus, 80% to 90% of glucocorticoids in the bloodstream bind to CBG, a small proportion (5% to 10%) binds non-specifically to albumin and about 5% circulates freely. According to the free hormone hypothesis³, the free fraction is available to interact with target cells and therefore act as the physiologically active hormone. In this context, CBG has the role of transporting glucocorticoids and controlling the amounts of free hormones⁴. CBG is primarily synthesized by the liver and secreted into the bloodstream, where it binds to glucocorticoids. Oestrogens are potent inducers of the hepatic synthesis of CBG⁵, whereas interleukin-6 (IL6), insulin and glucocorticoids inhibit its expression^{6,7}. In addition, CBG has been detected in extrahepatic tissues such as white adipose tissue, the lungs, the placenta and the CNS⁸⁻¹¹, although its role is unknown. The enzyme elastase, which is secreted by activated neutrophils, has the capacity to cleave CBG, which consequently loses its affinity for glucocorticoids. This has been interpreted as a way to deliver glucocorticoids to the inflammation site¹². A more active role for the modulation of glucocorticoid action by CBG is currently being explored¹³.

CBG-deficient mice present lower total corticosterone levels and higher free corticosterone and ACTH¹⁴, and greater adrenal gland size¹⁵, i.e., they have an altered response to the HPA axis. In addition, the sexual dimorphism that elicits increased levels of total corticosterone in females with respect to males is eliminated by CBG deficiency^{16,17}.

The present study aimed to ascertain whether CBG deficiency affects the synthetic endocrine activity of adrenal gland in male and female mice. For this purpose, we investigated the adrenal gland expression of: the ACTH receptor (MC2R), the proteins involved in cholesterol uptake (scavenger receptor class B member 1, SRB-1) and its transport to mitochondria where

steroidogenesis takes place (steroidogenic acute regulatory protein, StAR), the main enzymes involved in corticosterone, aldosterone and catecholamine synthesis. In addition, we also investigated whether the adrenal gland produces CBG. The results obtained showed that CBG is present in the adrenal gland and its absence reduces the expression of some of the main proteins involved in the adrenal hormone production that was stronger in females than males and resulted in a loss of adrenal sexual dimorphism.

Materials and methods

Animals and experimental protocol

Twelve-week-old wild-type (WT) and CBG-deficient (KO) mice were used. The KO colony was established by crossing heterozygous breeding pairs, which were kindly provided by Dr. Willnow. The procedure to disrupt the CBG gene was described by Petersen et al.¹⁴ The mice were divided into four groups of six to 10 animals: WT males (MWT), KO males (MKO), WT females (FWT) and KO females (FKO). The animals were housed in a controlled environment, fed a standard laboratory pelleted formula (Teklad Global 2018, Harlan-Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) and had access to tap water *ad libitum*. The mice were killed under isoflurane anaesthesia between 7 a.m. and 9 a.m., and the adrenal glands were carefully dissected, weighed and frozen at -80°C until use. Blood samples were obtained and centrifuged to obtain serum. For the histological analysis, a number of animals, following their death, were perfused with paraformaldehyde to fix the tissue. All procedures were conducted in accordance with the guidelines for the use of experimental animals established by the European Union, Spain and Catalonia, and were approved by the University of Barcelona Animal Handling Ethics Committee.

Total corticosterone

Corticosterone in serum was measured by radioimmunoassay using a sheep anti-corticosterone antibody (AB1297, Millipore, USA), and the experiment proceeded as described previously [18].

Western blot from adrenal gland homogenates

Homogenates from one adrenal gland were prepared in 300 μ L of PBS buffer containing 1/100 Complete™ protease inhibitor cocktail (Sigma). Samples were homogenized using an Ultra-Turrax T10 (IKA). After a 1000 g centrifugation for 10 min at 4°C, the pellet was discarded and the supernatant was collected and stored at -80°C until use. Protein concentration of homogenates was measured with the Bradford reagent (Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories).

Adrenal homogenate samples (25 μ g of protein) were separated by SDS/PAGE in a 10% gel and electrotransferred to a PVDF membrane (Millipore). After blocking nonspecific binding sites with 5% nonfat milk and in TBSTween 0.05% for 90 minutes at room temperature, the membranes were incubated overnight with a CBG goat anti-mouse polyclonal antibody (LS-C39044, LifeSpan) and β -actin as control (A-5316, Sigma). The immunoreactive proteins were further detected by an anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (sc-2922, Santa Cruz Biotechnology) and using Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific). The quantification was carried out using Total Lab v2003.3 (Non-Linear Dynamics).

RNA isolation and RT-PCR

The total RNA from the adrenal gland samples was extracted using the TRI Reagent Solution (Ambion, Inc.). The RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm and 280 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). The cDNA was synthesized using MMLV reverse transcriptase (Promega) and oligo-dT primers (Attendbio), and reverse transcription was then performed using 2 μ g of the RNA sample. Real-time PCR was conducted with SYBRGreen Master Mix (Life Technologies) on an ABI PRISM 7900 HT system (Applied Biosystems). The primers used are listed in the Supporting Information section (Table S1). The specificity of the amplicons was determined by melting curve analysis. The ratio of the relative expression of target genes to RPL32 was calculated by the $\Delta C(t)$ formula.

Histological and immunohistochemical analysis

The samples obtained from mice perfused with 40 g/L paraformaldehyde were embedded in paraffin, cut into 5 μm thick sections and stained with eosin-hematoxylin in accordance with standard procedures. The slides were visualized by light microscopy (Olympus BX-51).

For the immunohistochemical detection, the sections were deparaffinized, rehydrated and washed in PBS-Tween. They were then treated with 0.3% hydrogen peroxide, blocked with 25% rabbit serum and incubated overnight at 4°C with goat anti-mouse CBG at a dilution of 1/300 (LS-C39044, LifeSpan BioSciences). The detection was performed with an avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC Kit, Vector Labs) and developed with diaminobenzidine hydrochloride chromogen (Sigma).

Statistics

The data were analysed using GraphPad 5.0 and are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons were obtained by two-way ANOVA to evaluate the impact of sex and genotype (named "Sex" and "Gen", respectively, in the graphs). Interaction significance is also included ("Int"). A significant interaction would denote a different response in the mice of each genotype, depending on sex. The Bonferroni post-test was used as a multiple comparison method to evaluate significant differences between data pairs. The Student's *t*-test was used to compare MWT and FWT mice when the KO data was missing. P values below 0.05 were considered significant.

Results

Table 1 shows the weight of the animals and their adrenal glands, in addition to total serum corticosterone levels. As expected, the adrenal glands of females were heavier than male glands, and presented a corresponding increase in corticosterone levels in WT mice. However, the serum corticosterone levels in KO mice were similar in males and females, and lower than those observed in WT mice. By contrast, the weight of the adrenal glands in KO mice was higher than that of WT mice.

Table 1. Body and adrenal glands weights and serum corticosterone levels

Parameter	Unit	MWT	MKO	FWT	FKO
Body weight	g	34±1	32±1	24±1 χ	23±1 χ
Adrenal weight	mg	3.56±0.16	4.90±0.37*	5.40±0.35 χ	6.43±0.46 χ
Adrenal weight	%	0.011±0.001	0.015±0.001	0.023±0.001 χ	0.029±0.002 χ *
Total corticosterone	nM	222±43	124±30	466±88 ♀	117±30*

The significant results of two-way ANOVA were: for body weight (Sex $p < 0.0001$); adrenal weight in mg (Sex $p < 0.0001$ and Gen $p = 0.0034$); adrenal weight in % (Sex $p < 0.0001$ and Gen $p = 0.0009$) and total corticosterone levels (Sex $p = 0.0476$, Gen $p = 0.0010$ and Int $p = 0.0373$). Significant Bonferroni post-test: * denotes a significant difference between WT and KO under the appointed sex and χ denotes significant difference between males and females of the appointed genotype.

The total mRNA obtained from adrenal glands was significantly higher in females than in males (Figure 1A) as a consequence of their larger size (Figure 1B), and there were no differences due to genotype (WT vs KO). The RNA yield in μg per mg of adrenal gland tended to be lower in KO mice of both genders, but there were no significant differences (Figure 1B).

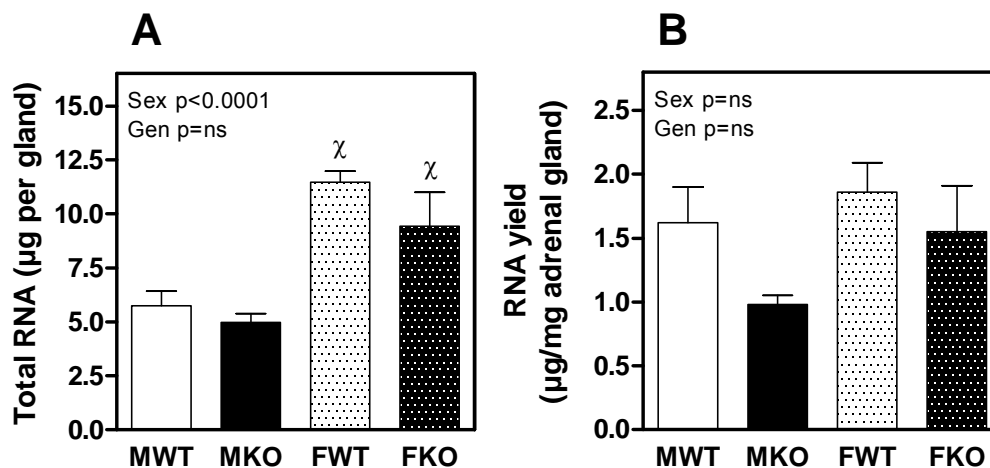


Figure 1. Total RNA (A) and RNA yield per mg of tissue (B) obtained from adrenal glands of males and females WT and KO (MWT, MKO, FWT and FKO respectively). The results of two-way ANOVA are specified in the graphs. Genotype (Gen) and sex (Sex) were the two variables assessed. Significant Bonferroni post-test: χ denotes significant difference between males and females of the appointed genotype.

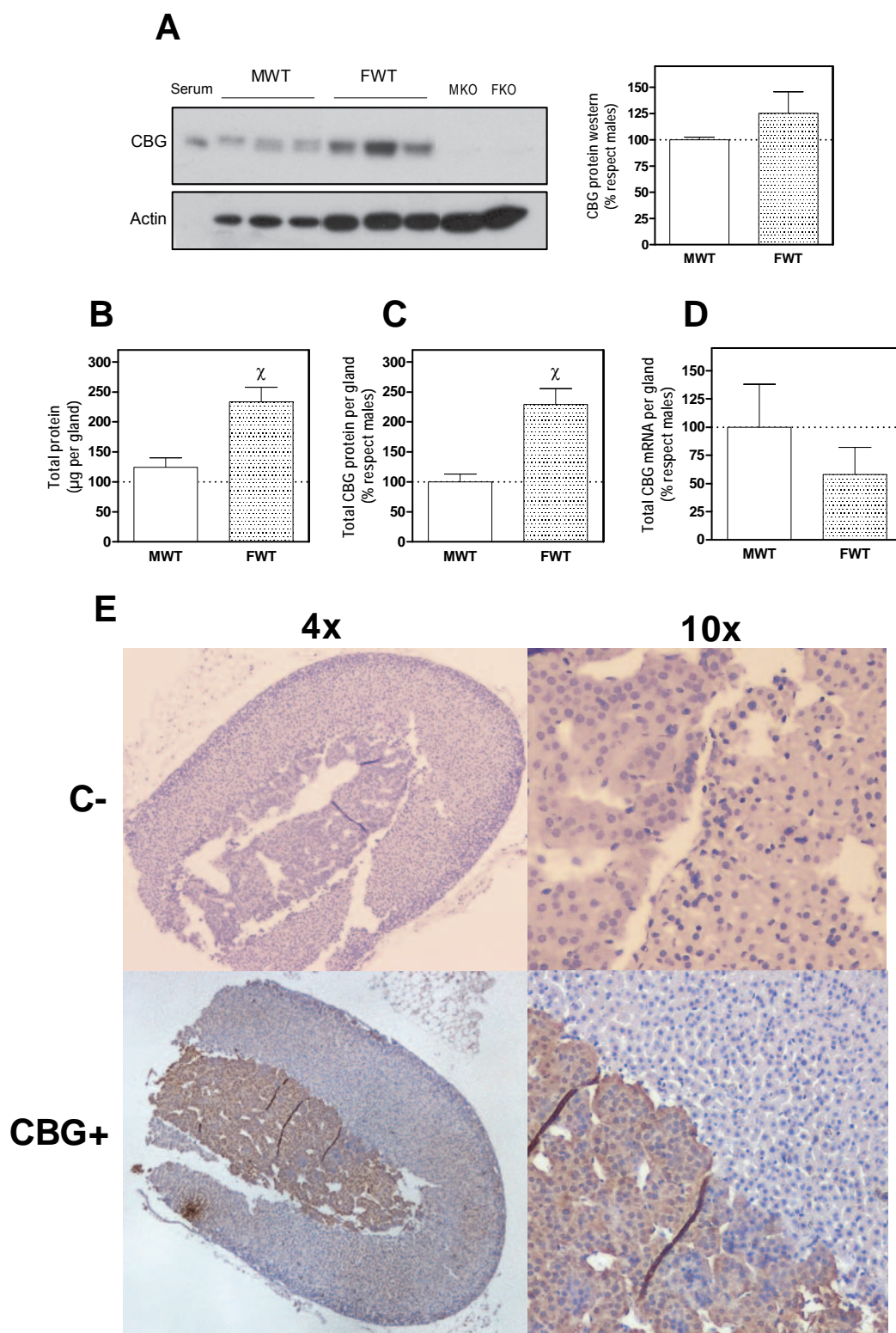


Figure 2. A) Western blot of adrenal CBG, B) total protein per adrenal gland, C) Total CBG protein per whole adrenal gland and D) total mRNA of CBG per adrenal gland expressed as percentage of the expression in males WT. The results of t-student: χ denotes significant difference between males and females WT. E) Representative CBG immunohistochemistry of adrenal gland, C- denotes a negative control.

CBG mRNA and protein were found in the adrenal glands of WT males and females (Figure 2A). The total protein (Figure 2B) and total CBG protein (Figure 2C) were higher in females than in males when expressed per gland, but these differences disappeared when they were calculated per μg of protein (Figure 2A). However, total mRNA per gland tends to decrease in females without being significant (figure 2D).

Surprisingly, the immunohistochemical analysis (Figure 2E) revealed a slight positive CBG signal inside the cells of the zona glomerulosa and the zona fasciculata, where glucocorticoids are synthesized, whereas there was strong positive staining for CBG in the medullary zone, where the adrenal gland produces catecholamines.

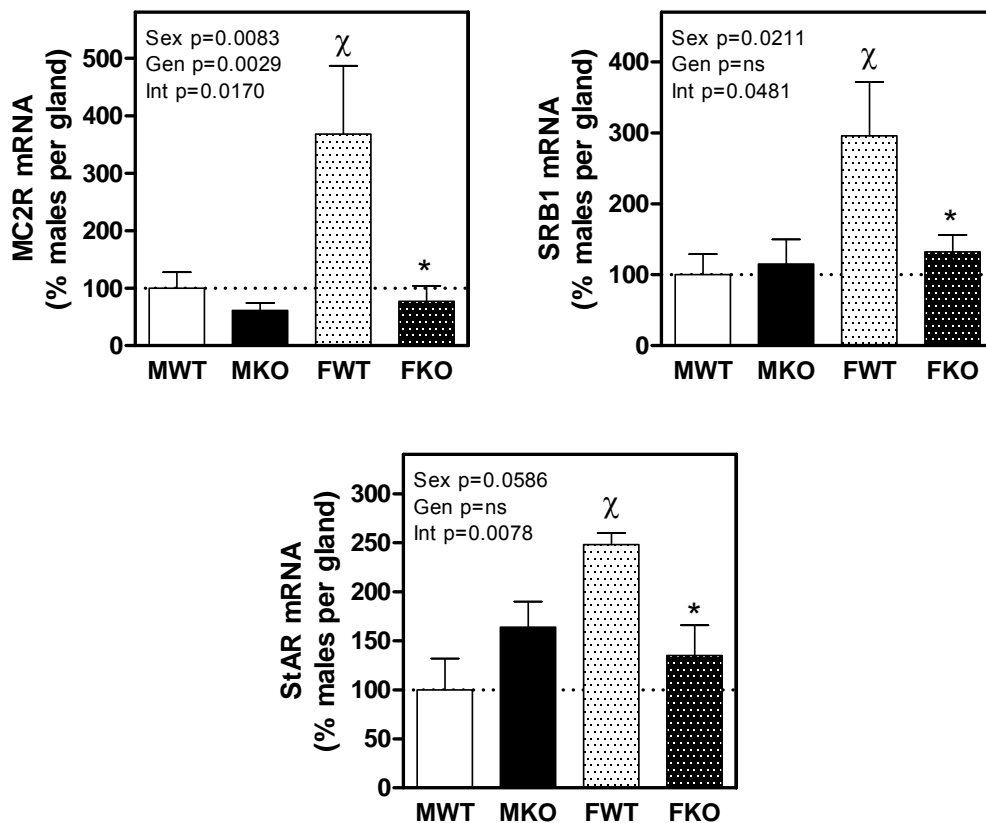


Figure 3. Expression of the ACTH receptor (MCR2), scavenger-receptor B1 (SRB1) involved in cholesterol uptake and StAR, the cholesterol carrier into the mitochondria. The results of two-way ANOVA are specified in the graphs. Genotype (Gen) and sex (Sex) were the two variables assessed. Significant Bonferroni post-test: * denotes a significant difference between WT and KO under the appointed sex and χ denotes significant difference between males and females of the appointed genotype.

Figure 3 shows the expression of the ACTH receptor MC2R, the main cellular cholesterol uptake receptor SRB1 and the protein that regulates cholesterol transfer within the mitochondria, StAR. In line with previous findings, with increased circulating corticosterone, females exhibited significantly higher expression of all three genes in WT mice. The KO mice

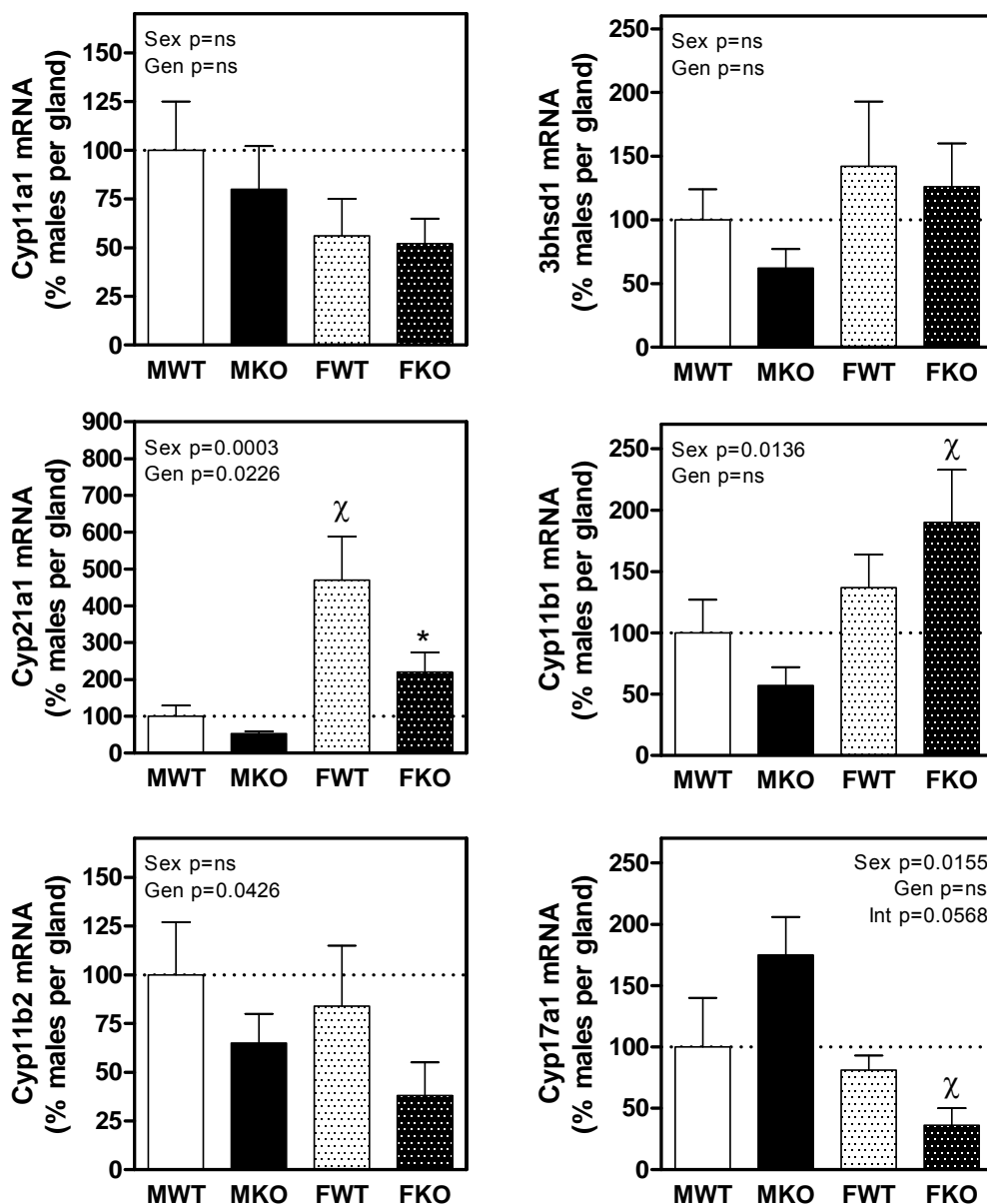


Figure 4. Expression of the main enzymes involved in steroid synthesis in the adrenal gland: Cyp11a1, 3bhsd1, Cyp21a1, Cyp11b1, Cyp11b2 and Cyp17a1. The results of two-way ANOVA are specified in the graphs. Genotype (Gen) and sex (Sex) were the two variables assessed. Significant Bonferroni post-test: * denotes a significant difference between WT and KO under the appointed sex and χ denotes significant difference between males and females of the appointed genotype.

displayed a reduced expression of MC2R mRNA, which was particularly evident in females. In the case of SRB1 and StAR, there were no significant differences between KO and WT males, but the expression of these two genes was greatly reduced in KO females.

The expression of the main enzymes involved in steroidogenesis is shown in Figure 4. There were no differences between males and females or among WT and KO mice for Cyp11a1 or 3bhs1. The expression of Cyp21a1, which catalyses the progesterone to deoxycorticosterone conversion, was much higher in females as compared to male WT mice. A deficiency of CBG diminished Cyp21a1 expression in both sexes of KO mice, and this effect was more pronounced in females. Meanwhile, Cyp11b1, which catalyses the deoxycorticosterone to

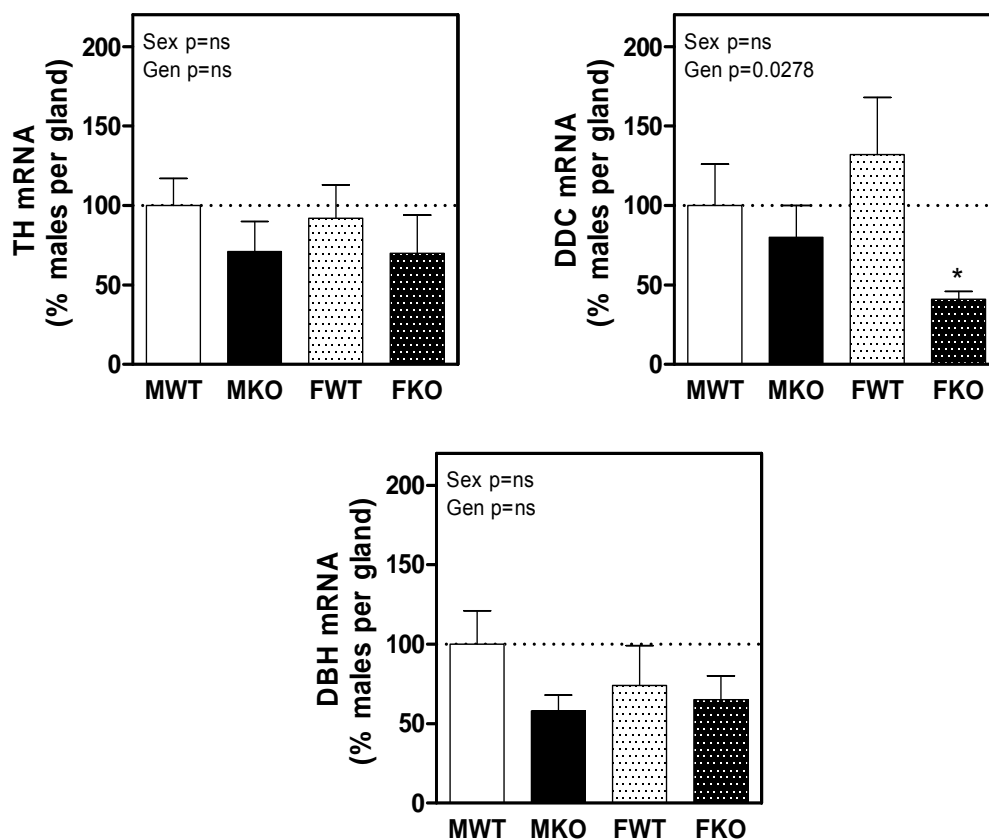


Figure 5. Expression of the main enzymes involved in catecholamine synthesis in adrenal gland: Tyrosine hydroxylase (TH), DOPA decarboxylase (DDC) and Dopamine β -hydroxylase (DBH). The results of two-way ANOVA are specified in the graphs. Genotype (Gen) and sex (Sex) were the two variables assessed. Significant Bonferroni post-test: * denotes a significant difference between WT and KO under the appointed sex and χ denotes significant difference between males and females of the appointed genotype.

corticosterone conversion, showed a similar pattern to Cyp21a1 in WT and KO males. The expression remained unaltered among females of both genotypes. A significant increase in Cyp11b1 was found in KO females with respect to KO males. The expression of Cyp11b2 (corticosterone to aldosterone conversion) did not vary between WT and KO males and females, but CBG-deficient mice exhibited a reduced expression compared to WT mice of both sexes. The expression of Cyp17a1 only decreased in female KO mice compared to WT females.

Figure 5 shows the expression of enzymes involved in catecholamine synthesis. Although the expressions tended to decrease in KO mice, the only significant difference found was a reduction in DOPA decarboxylase (DC) (an enzyme that catalyses the conversion of L-DOPA to dopamine) in female KO mice

Discussion

In humans, it is well known that there are CBG polymorphisms that decrease its affinity for cortisol or its plasma levels¹⁸⁻²¹. The most common symptoms in humans carrying CBG mutations are fatigue, chronic pain, hypotension and, in some cases, overweight or obesity. An inadequate response of HPA to stress is found in both humans and mice lacking functional CBG^{17,18,22}. Deficient CBG mice show reduced total circulating corticosterone and increased free corticosterone levels¹⁴⁻¹⁶ and exhibit a higher corticosterone turnover rate¹⁴ that is consistent with a larger adrenal size¹⁵. We therefore investigated whether the lack of CBG had direct consequences on the adrenal functionality of the cortical and medullary zones. Furthermore, we determined whether adrenal glands produce CBG, as previously described in adipose tissue and the lungs^{8,15,16}.

Ours results reinforce the premise that there is an adrenal increase in CBG-deficient mice⁸ and that a lack of CBG is associated with a loss of gender dimorphism in circulating corticosterone^{16,17}. Here we showed for the first time that adrenal glands express CBG, as previously described in other tissues^{8,10,15,16}. Adrenal glands from males and females presented the same amount of CBG when expressed per μg of protein, while the levels were higher in

females when expressed per gland, given the larger adrenal gland size in females compared to males. The adrenal gland is considered one of the most irrigated tissues²³, so the CBG found by western blot may have come from blood. Although we cannot totally rule this out, the presence of non-negligible CBG mRNA (about 27-28 cycles) and the location of CBG in the cytosolic compartment within cells revealed by the immunohistochemistry analysis indicate that the CBG detected was adrenal in origin. We ruled out blood contamination in the immunohistochemistry analysis due to the perfusion with paraformaldehyde prior to the adrenal dissection. Despite the fact that corticosterone synthesis takes place at adrenal cortex level, CBG was mainly found in the adrenal medulla. A possible explanation is that CBG plays a role in the glucocorticoid regulation exerted on catecholamine synthesis²⁴. The HPA axis is known to be involved in the regulation of catecholamine synthesis in the sympathetic ganglia and adrenal medulla of rats and mice^{25,26}, but in a different way. An increase in ACTH promotes the expression of TH and DBH in sympathetic ganglia, but has no effect on their expression in the adrenal medulla²⁷, since the MC2R receptor is only present in the adrenal cortex²⁸. However, cortisol favours the synthesis of adrenaline from noradrenaline^{29,30} in the adrenal medulla²⁴, so the presence of CBG could be interpreted as an intracellular carrier or as limiting the glucocorticoids that drive adrenaline synthesis. This unexpected finding requires further research to ascertain the impact of CBG on adrenal gland functionality.

The expression of MC2R, the ACTH receptor, decreased in both male and female KO mice, but this effect was only significant in females. The expression of MC2R, the ACTH receptor, decreased in both male and female KO mice, but this effect was only significant in females. Previously, no altered response to ACTH had been reported from cultured adrenal cells of males CBG KO mice³¹, but there were no data from females that, according to our finding, resulted more affected. This contrasts with the high levels of ACTH previously described in KO mice¹⁴ and the upregulation exerted by ACTH on MC2R expression³² and points to a lower response capacity of the adrenal gland in CBG KO mice. The marked decrease in the uptake of cholesterol (SRB1) and its transport to the mitochondria (StAR) found in females are a consequence of the decreased response of the adrenal glands to ACTH that regulates both expressions^{32,33}. The lack of differences between WT and KO in StAR expression in males is in agreement with previous described³¹

The study on the expression of the enzymes involved in adrenal steroidogenesis revealed a decrease in KO mice of Cyp21a1, which directs progesterone to glucocorticoid synthesis³⁴. Again, this effect was more pronounced in KO females. This demonstrated the reduced synthesis of glucocorticoids in the absence of CBG. On the other hand, Cyp11b1 expression in KO females showed a significant increase that could be explained by a lack of substrate or perhaps an excess of free corticosterone inside the cell. Finally, the decrease in Cyp11b2 in male and female KO mice again points to a decrease in synthetic activity in the adrenal glands of KO mice. With respect to Cyp17a1, we also found a decreased expression in female KO mice. Given that this is poorly expressed in the adrenal glands of rodents³⁵ (with a Ct of about 30 for Cyp17a1, while the rest of the enzymes presented a Ct of 15-20), the consequences for overall androgen production are not relevant.

It is worth noting that, in KO mice, the larger adrenal gland is accompanied by a reduced capacity for corticosterone synthesis. Higher adrenal size usually correlates with gland hyperactivity³⁶, except in congenital adrenal hyperplasia (CAH)³⁷. Patients with CAH present a natural mutation in any one of the enzymes involved in cortisol synthesis, which leads to impaired cortisol and adrenalin production, larger adrenal size and less vulnerability to psychological stress³⁸.

In conclusion, the results presented show that CBG is present in the adrenal gland, predominantly in the medullary zone, and provide evidence that a lack of CBG leads to a reduction in the adrenal synthesis of glucocorticoids, mineralocorticoids and catecholamines in a sex-dependent manner. This feature could lead to a lower capacity to respond to stressful stimuli, in accordance with previous results^{22,31,39}. The consequences of a lack of CBG in the synthesis of adrenal gland hormones point to a relevant, yet unexplored, role for CBG. However, further studies are required to establish the exact role of CBG in adrenal gland functionality.

Acknowledgments

The investigation was supported by the Fondo Investigación Sanitaria PI09/00505. José Gulfo was the recipient of a predoctoral scholarship from the University of Barcelona, Angelo Ledda was the recipient of a European and Sardinian scholarship "Master and Back". We thank Dr. Thomas Willnow for provide heterozygous CBG-deficient mice and Dr. Daniel Closa for his valuable comments.

References

1. Radhakutty A, Mangelsdorf BL, Drake SM, et al. Effects of prednisolone on energy and fat metabolism in patients with rheumatoid arthritis: tissue-specific insulin resistance with commonly used prednisolone doses. *Clin Endocrinol (Oxf)*. June 2016. doi:10.1111/cen.13138.
2. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(1-2):20-32. doi:10.1159/000362724.
3. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev*. 1989;10(3):232-274. doi:10.1210/edrv-10-3-232.
4. Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta*. 2005;359(1-2):189-194. doi:10.1016/j.cccn.2005.03.044.
5. Musa BU, Seal US, Doe RP. Elevation of certain plasma proteins in man following estrogen administration: a dose-response relationship. *J Clin Endocrinol Metab*. 1965;25(9):1163-1166. doi:10.1210/jcem-25-9-1163.
6. Tsigos C, Kyrou I, Chrousos GP, Papanicolaou DA. Prolonged suppression of corticosteroid-binding globulin by recombinant human interleukin-6 in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3379. doi:10.1210/jcem.83.9.5100-5.

7. Fernández-Real JM, Grasa M, Casamitjana R, Pugeat M, Barret C, Ricart W. Plasma total and glycosylated corticosteroid-binding globulin levels are associated with insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(9):3192-3196. doi:10.1210/jcem.84.9.5946.
8. Grasa M, Cabot C, Adán C, et al. Corticosteroid-binding globulin synthesis and distribution in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem.* 2001;228(1-2):25-31.
9. Garrapa GGM, Pantanetti P, Arnaldi G, Mantero F, Faloiá E. Body Composition and Metabolic Features in Women with Adrenal Incidentaloma or Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(11):5301-5306. doi:10.1210/jcem.86.11.8059.
10. Jirikowski GF, Pusch L, Möpert B, Herbert Z, Caldwell JD. Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat.* 2007;34(1):22-28. doi:10.1016/j.jchemneu.2007.03.007.
11. Scrocchi LA, Hearn SA, Han VK, Hammond GL. Corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the mouse liver and kidney during postnatal development. *Endocrinology.* 1993;132(2):910-916. doi:10.1210/endo.132.2.8425503.
12. Klieber MA, Underhill C, Hammond GL, Muller Y a. Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29594-29603. doi:10.1074/jbc.M705014200.
13. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(1):34-39. doi:10.1210/jcem-71-1-34.
14. Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, et al. Hyporesponsiveness to Glucocorticoids in Mice Genetically Deficient for the Corticosteroid Binding Globulin. *Mol Cell Biol.* 2006;26(19):7236-7245. doi:10.1128/MCB.00400-06.
15. Gulfo J, Ledda A, Serra E, Cabot C, Esteve M, Grasa M. Altered lipid partitioning and glucocorticoid availability in CBG-deficient male mice with diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(8):1677-1686. doi:10.1002/oby.21543.

16. Gulfo J, Ledda A, Gea-Sorli S, et al. New roles for corticosteroid binding globulin and opposite expression profiles in lung and liver. *PLoS One*. 2016;11(1). doi:10.1371/journal.pone.0146497.
17. Minni AM, de Medeiros GF, Helbling JC, et al. Role of corticosteroid binding globulin in emotional reactivity sex differences in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;50:252-263. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.07.029.
18. Meyer E, Nenke M, Rankin W, Lewis J, Torpy D. Corticosteroid-Binding Globulin: A Review of Basic and Clinical Advances. *Horm Metab Res*. 2016;48(6):359-371. doi:10.1055/s-0042-108071.
19. Torpy DJ, Ardesjö Lundgren B, Ho JT, Lewis JG, Scott HS, Mericq V. CBG Santiago: A novel CBG mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(1):151-155. doi:10.1210/jc.2011-2022.
20. Cizza G, Bernardi L, Smirne N, et al. Clinical manifestations of highly prevalent corticosteroid-binding globulin mutations in a village in southern Italy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(10):E1684-93. doi:10.1210/jc.2011-1321.
21. Torpy DJ, Bachmann AW, Grice JE, et al. Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3692-3700. doi:10.1210/jcem.86.8.7724.
22. Richard EM, Helbling JC, Tridon C, et al. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology*. 2010;151(2):649-659. doi:10.1210/en.2009-0862.
23. Xing Y, Lerario AM, Rainey W, Hammer GD. Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(2):243-274. doi:10.1016/j.ecl.2015.02.001.
24. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*. 2009;89(2):535-606. doi:10.1152/physrev.00042.2006.
25. Kvetnansky R. *Transsynaptic and Humoral Regulation of Adrenal Catecholamines*

- Synthesis in Stress. In: Frontiers in Catecholamine Research. Vol (Usdin E SS, ed.). Oxford: Pergamon; 1973.*
26. Kvetnansky R, Kubovcakova L, Tillinger A, Micutkova L, Krizanova O, Sabban EL. Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(4-6):735-754. doi:10.1007/s10571-006-9063-7.
 27. Nankova B, Kvetnansky R, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL. Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology.* 1996;137(12):5597-5604. doi:10.1210/endo.137.12.8940389.
 28. Nankova BB, Kvetnansky R, Sabban EL. Adrenocorticotropin hormone (MC-2) receptor mRNA is expressed in rat sympathetic ganglia and up-regulated by stress. *Neurosci Lett.* 2003;344(3):149-152.
 29. Wurtman RJ, Axelrod J. Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem.* 1966;241(10):2301-2305.
 30. Wong DL. Epinephrine biosynthesis: hormonal and neural control during stress. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(4-6):891-900. doi:10.1007/s10571-006-9056-6.
 31. Minni AM, Dorey R, Piérard C, et al. Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: Impact on memory retrieval. *Endocrinology.* 2012;153(10):4766-4774. doi:10.1210/en.2012-1485.
 32. Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE. ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endocrinol.* 2010;45(1):59-68. doi:10.1677/JME-10-0006.
 33. Shen W-J, Azhar S, Kraemer FB. ACTH Regulation of Adrenal SR-B1. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:42. doi:10.3389/fendo.2016.00042.

34. Midzak A, Papadopoulos V. Adrenal Mitochondria and Steroidogenesis: From Individual Proteins to Functional Protein Assemblies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:106. doi:10.3389/fendo.2016.00106.
35. van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schröder FH. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci*. 1992;50(12):857-861.
36. Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Balasch J. Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sci*. 1985;36(22):2085-2092.
37. Nebesio TD, Renbarger JL, Nabhan ZM, et al. Differential effects of hydrocortisone, prednisone, and dexamethasone on hormonal and pharmacokinetic profiles: a pilot study in children with congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2016;2016:17. doi:10.1186/s13633-016-0035-5.
38. Nordenström A, Butwicka A, Lindén Hirschberg A, et al. Are carriers of CYP21A2 mutations less vulnerable to psychological stress? A population-based national cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. September 2016. doi:10.1111/cen.13242.
39. Minni AM, de Medeiros GF, Helbling JC, et al. Role of corticosteroid binding globulin in emotional reactivity sex differences in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;50:252-263. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.07.029.

**LACK OF CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN PROMOTES COGNITIVE
DAMAGE IN THE HIPPOCAMPUS**

*José Gulfo, Joana Pérez de San Román, Angelo Ledda, Felix Junyent, Maria J Ramirez,
Francisco J. Gil-Bea, Montserrat Esteve, Mar Grasa*

Manuscrito en preparación

MANUSCRITO EN PREPARACIÓN

Lack of corticosteroid-binding globulin promotes cognitive damage in the hippocampus

José Gulfo^{1,2,3,‡}, Joana Pérez de San Román^{4,‡}, Angelo Ledda^{1,2,3}, Felix Junyent⁷, Maria J. Ramirez^{4,5}, Francisco J. Gil-Bea^{6,§}, Montserrat Esteve^{1,2,3,§} and Mar Grasa^{1,2,3,§}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² CIBER Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

³ Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Department of Pharmacology, University of Navarra, Pamplona, Spain

⁵ IdiSNA Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain

⁶ Center for Applied Medical Research (CIMA), Neuroscience, University of Navarra, Pamplona, Spain

⁷ Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

[‡] Both authors contributed equally to this work

[§] These authors contributed equally to this work as senior's researches

Corresponding author: Montserrat Esteve; Faculty of Biology, Prevosti building, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain; E-mail: mesteve@ub.edu; Telephone number: +34-93-4020137

Keywords: Corticosteroid-binding globulin, corticosterone, hippocampi, insulin resistance

Abstract

Glucocorticoids have an important role in the central nervous system. Their excess has been associated to reduced hippocampus volume and memory impairment, and glucocorticoid hypersecretion has been reported in Alzheimer's disease. CBG is the specific carrier of circulating glucocorticoids, nevertheless, evidences point to more active role of CBG modulating tissue glucocorticoid activity. CBG human polymorphisms affecting the affinity for glucocorticoid or its expression are associated with chronic pain, chronic fatigue, headaches, depression, hypotension and obesity with an altered HPA axis. CBG has been localized in different brain areas in humans and rodents, and has been suggested that could be important in delivering glucocorticoids to the brain. The aim of this study was to determine the involvement of CBG in glucocorticoid response in the hippocampus, specifically with regards to insulin resistance and memory. We used a *cbg*^{-/-} mouse model, which presents low total corticosterone and high free corticosterone blood levels. Our results revealed that *cbg*^{-/-} mice hippocampus displayed higher free corticosterone levels, together with increased MR-mediated responses, higher insulin resistance and greater phosphorylation of Tau protein, all consistent with the effects seen in situations of glucocorticoid excess. In conclusion, the results point out that CBG has an important role regulating the hippocampus glucocorticoid activity, and that individuals with CBG mutations could be predisposed to pathologies related with impaired memory.

Introduction

Glucocorticoids (cortisol in humans and corticosterone in rodents, CORT) are endogenous steroid hormones secreted by the adrenal glands under the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. They have pleiotropic functions, being involved in stress response^{1,2}, energy metabolism³, reproductive function⁴, and inflammatory and immune responses⁵ among others. Moreover, CORT excess, whether endogenous (Cushing's syndrome) or exogenous (administered as an anti-inflammatory drug), causes deleterious effects. For example, chronic high levels of circulating CORT result in obesity⁶ and metabolic syndrome^{7,8}. Furthermore, excessive glucocorticoid levels have been linked to insulin resistance and type 2 diabetes through their role in inhibiting the actions of insulin⁹ and from the impairment of pancreatic β -cell function^{10,11}.

CORT also have an important role in the central nervous system. High levels of circulating CORT are associated with memory impairment¹²⁻¹⁴. The effect of glucocorticoid excess on cognitive impairment has been largely attributed to a reduced volume of the hippocampus, as well as to deficits in neurogenesis and glucocorticoid-mediated synaptic plasticity¹⁵. In this sense, it has been suggested that the cognitive impairment associated with type 2 diabetes might involve glucocorticoids^{16,17}. Indeed, glucocorticoid hypersecretion has been reported in Alzheimer's disease^{18,19}, while the speed of cognitive decline has been linked to blood glucocorticoid levels at the pre-dementia clinical stage²⁰.

Two major receptors mediate CORT functions, the glucocorticoid receptor (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR). The MR displays 10-fold higher affinity than the GR for CORT. These receptors have different spatial distributions in the brain and peripheral organs, with GR being more broadly distributed and serving as the main receptor at times of stress²¹. In the hippocampi, MR and GR coexist in the same cells²².

Corticosteroid-binding globulin (CBG) is the specific carrier of circulating glucocorticoids. Around 80% to 90% of glucocorticoids in the blood bind to CBG with high affinity. In the free hormone hypothesis, CBG is thought to regulate the free biologically-active fraction of glucocorticoids^{23,24}. However, some evidence points to a more active role for CBG in directly modulating glucocorticoid activity²⁵. In humans, several mutations in CBG have been identified to affect the affinity for glucocorticoid or the expression, with some mutations leading to total CBG absence²⁶. The most common clinical symptoms of patients with CBG mutations include chronic pain, chronic fatigue, chronic headaches, depression, relative hypotension, and obesity. They also present irregular activity of the HPA axis, with low plasma total cortisol levels and elevated free cortisol amounts²⁶. CBG-knockout mice show higher mortality in response to septic shock²⁷, impaired response of the HPA axis to emotional stress²⁸, and larger adipocytes in visceral adipose tissue upon consumption of a high-fat diet²⁹.

It has been suggested that CBG could be important in delivering glucocorticoids to the brain, when act through fast non-genomic actions on neurons modulating stress-induced behavior, learning, and memory recall³⁰. Furthermore, CBG has been found in different localizations of the brain in humans and rodents³¹⁻³⁴, but its function is yet to be established.

The aim of this study was to determine the involvement of CBG in glucocorticoid action in the hippocampus, specifically with regards to insulin resistance and memory. We used a *cbg*^{-/-} mouse model, which presents low total corticosterone and high free corticosterone blood levels²⁹. Our results revealed that *cbg*^{-/-} mice showed increased MR-mediated response, higher insulin resistance, and greater phosphorylation of Tau protein, which are consistent with the effects seen in situations of glucocorticoid excess.

Materials and methods

Animals and experimental protocols

Eighteen-weeks-old wild-type (WT) and CBG-deficient (KO) mice were used. The colony of *cbg*^{-/-} mice was established through crossing the heterozygous breeds kindly provided by Dr. Willnow. The procedure used to generate CBG-knockout mice has been previously described²⁷. The mice were divided into two groups (WT and *cbg*^{-/-}) of six to ten animals. Animals were housed in a controlled environment, fed with standard laboratory pelleted formula (Teklad Global 2018, Harlan-Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) and tap water ad libitum. Mice were euthanized under isoflurane anesthesia between 7.00 and 9.00 a.m. and the hippocampi carefully removed and frozen at -80°C until use. All procedures were conducted in accordance with the guidelines for the use of experimental animals established by the European Union, Spain, and Catalonia, and were approved by the Animal Handling Ethics Committee of the University of Barcelona.

Western blot analysis of hippocampal homogenates

Hippocampal preparations from the mice were obtained by homogenizing hippocampal tissue (10mg) in HEPES-buffered saline (100mM HEPES, 200mM NaCl, 2mM Na₄P₂O₇, 10% glycerol, and 5mM EDTA, pH 7.2) at 4°C and, containing 1% Nonidet P-40 (Roche) and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (diluted 1:100, Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Samples were sonicated for 5 seconds at 200 W (Branson Sonifier 250® Analog Ultrasonic, Branson Ultrasonics) in ice. After centrifugation at 10,000 g and 4°C for 20 minutes, the pellet was discarded and the supernatant collected and stored at -80°C until use. Protein concentration was measured by the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (ref 3225, Thermo Scientific). Samples (10-30µg of protein) were separated electrophoretically by SDS-PAGE and electrotransferred on to a PVDF

membrane (Millipore). The membrane was then incubated in 5% non-fat milk or 2.5% bovine serum albumin (BSA) in 0.05% TBS-Tween, pH 7.4, for 60 minutes at room temperature to block non-specific binding sites. The membranes were incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: anti-CBG (1:1,000, LifeSpan); anti-GR (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology); anti-MR (1:500, AbD Serotec); anti-PAI-1 (1:1,000, Osenses); anti-pY1361-IR β (1:1,000, Cell Signaling Technology); anti-IR β (1:10,000, Cell Signaling Technology); anti-pAkt S473 (1:1,000, Cell Signaling Technology); anti-Akt (1:1,000, Cell Signaling Technology); anti-pERK T202/Y204 (1:1,000, Osenses); anti-ERK (1:20,000, Santa Cruz Biotechnology); anti-pJNK T183/Y185 (1:1,000, Cell Signaling Technology); anti-JNK (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology); anti-p-Tau AT8 (1:1,000, Thermo Fisher Scientific); anti-Tau Tau5 (1:100, Sigma); anti-pY216-GSK3 β (1:1,000, Cell Signaling Technology); anti-pS9-GSK3 β (1:1,000, Cell Signaling Technology); anti-GSK3 β (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology); anti-p35 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology); anti-p25 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology); anti-cdk5 (1:200, Santa Cruz Biotechnology); anti-synaptophysin (1:50,000, Millipore Corporation); anti-PSD95 (1:1,000, Millipore Corporation); anti-NR1 (1:1,000, Millipore Corporation); anti-NR2A (1:1,000, Millipore Corporation); anti-arc (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology); or anti-mBDNF (1:500, AbD Serotec) antibody. For control, anti- β -actin (1:2,000, Santa Cruz Biotechnology) was used.

Immunopositive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagent (ECL; Amersham). The optical density (OD) of reactive bands visible on X-ray film was determined densitometrically (Image J1.46r, Wayne Rasband, NIH). Results are expressed as percentage of OD values of *cbg*^{+/+} mice.

Determination of total and free corticosterone from hippocampal

Hippocampal homogenates (10mg) were prepared in assay buffer provided by the kit used to determine corticosterone levels (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor) following the same steps as before. A portion of supernatant was used to determine the levels of free corticosterone. Another portion of supernatant was incubated (1:40) with the Steroid Displacement Reagent, provided by the kit, for 15 minutes, before being mixed with ethyl acetate (1:1) and the upper layer collected. This step was repeated three times and the samples were then desiccated at -20°C with dry ice overnight and resuspended with the assay buffer. This fraction was used to determine the total corticosterone level. The corticosterone measurement with Correlate-EIA was performed according to the supplier's specifications.

Statistical analysis

Data were analyzed by STATA software version 12.0 (StataCorp LP, USA) and are expressed as mean \pm SEM. Normality was checked using the Shapiro-Wilks test ($P < 0.05$). Data were evaluated by Student's t-test. If the data did not show normal distribution, they were evaluated by the Mann-Whitney U test. The value of "t" or " χ^2 " is indicated in the text along with its associated probability. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The presence of CBG was confirmed in the hippocampi of WT whereas was absent in the hippocampi homogenates of *cbg*^{-/-} mice (Fig. 1).

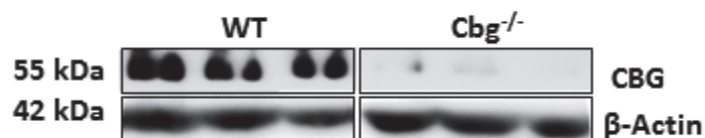


Figura 1. Western blot of CBG in hippocampi homogenate

While levels of total corticosterone in the hippocampal homogenates did not differ between WT and *cbg*^{-/-} mice (20.34 ± 2.62 vs 22.31 ± 2.28 ng/g protein; $t_{(16)} = 0.68$, $p = \text{ns}$), levels of free corticosterone were much more elevated in *cbg*^{-/-} than WT mice (20.90 ± 3.11 vs 12.61 ± 3.45 ng/g protein; $t_{(14)} = 2.17$, $p < 0.05$; Fig. 2A). The amount of the GR protein was unchanged in the hippocampi of *cbg*^{-/-} mice compared to WT ($t_{(22)} = -0.38$, $p = \text{ns}$; Fig. 2B). However, protein levels of the other corticosterone receptor in the hippocampus for which corticosterone has 10 times more affinity than for GR, the MR, were significantly increased in CBG-deficient mice (118.33 ± 3.45 vs 100.00 ± 2.99%; $t_{(22)} = 2.52$, $p < 0.01$; Fig. 2C). Serpine1 is one of the known genes regulated by MR activation³⁵. Its encoded protein, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), was increased in *cbg*^{-/-} mice (117.03 ± 6.71 vs 100.00 ± 8.52%; $t_{(20)} = 1.21$, $p < 0.05$; Fig. 2D) in parallel with the elevation in MR expression.

Lower levels of insulin receptor (IR)-β phosphorylation at residue tyrosine-1361, which is associated with decreased IR transduction through IRS1 and PI3K signaling, were observed in *cbg*^{-/-} mouse hippocampi ($t_{(22)} = -3.196$, $p < 0.01$; Fig. 3A). Activation of the downstream effectors of the IR-PI3K pathway, pAkt ($t_{(22)} = -1.876$, $p < 0.05$; Fig. 3B) and pERK ($t_{(22)} = -2.093$, $p < 0.05$; Fig. 3C), was also decreased in CBG-deficient mouse hippocampi, as was the level of activated JNK ($t_{(22)} = -1.655$, $p < 0.05$; Fig. 3D).

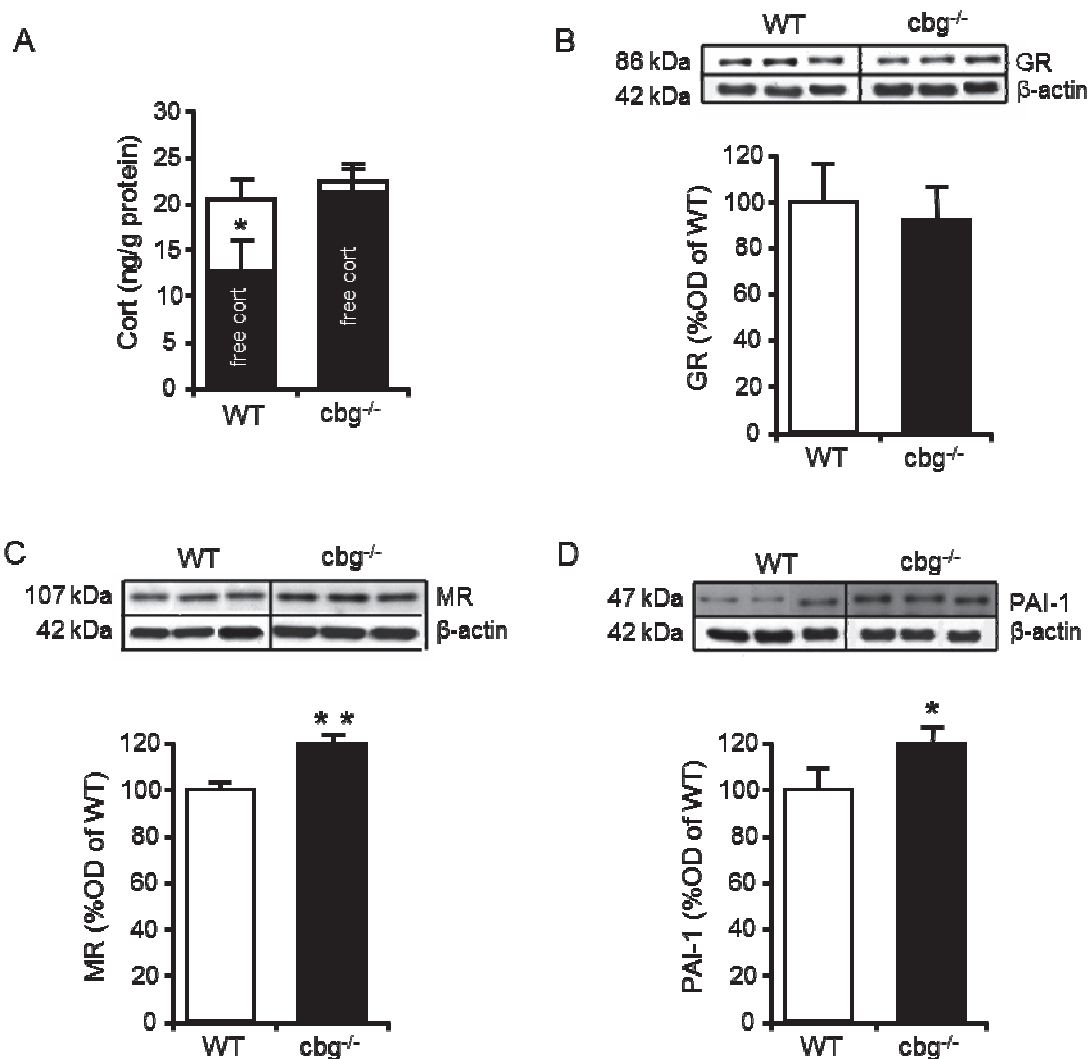


Figure 2. Hippocampus total and free corticosterone (A). Western blot of hippocampus homogenate of glucocorticoid receptor (B) of mineralocorticoid receptor (C) and plasminogen-activator inhibitor-1 (D). Differences between *cbg*^{-/-} vs WT: *P<0.05 and ** P<0.01.

Cbg^{-/-} mice showed significant increases in the phosphorylation of Tau protein at residues serine-202 and threonine-205, as demonstrated by the anti-AT8 antibody results ($t_{(22)}=2.586$, $p<0.01$; Fig. 4A). Levels of active GSK3 β (phosphorylated at residue tyrosine-216) were elevated ($t_{(20)}=1.750$, $P<0.05$; Fig. 4B), while levels of inactive GSK3 β (phosphorylated at residue serine-9) were reduced in *cbg*^{-/-} mice ($\chi^2=6$, $p<0.01$; Fig. 4C).

Meanwhile, p25/35 levels, which are indicative of cdk5 activity, were diminished in CBG-deficient mice hippocampi ($t_{(18)}=-1.828$, $P<0.05$; Fig. 4D).

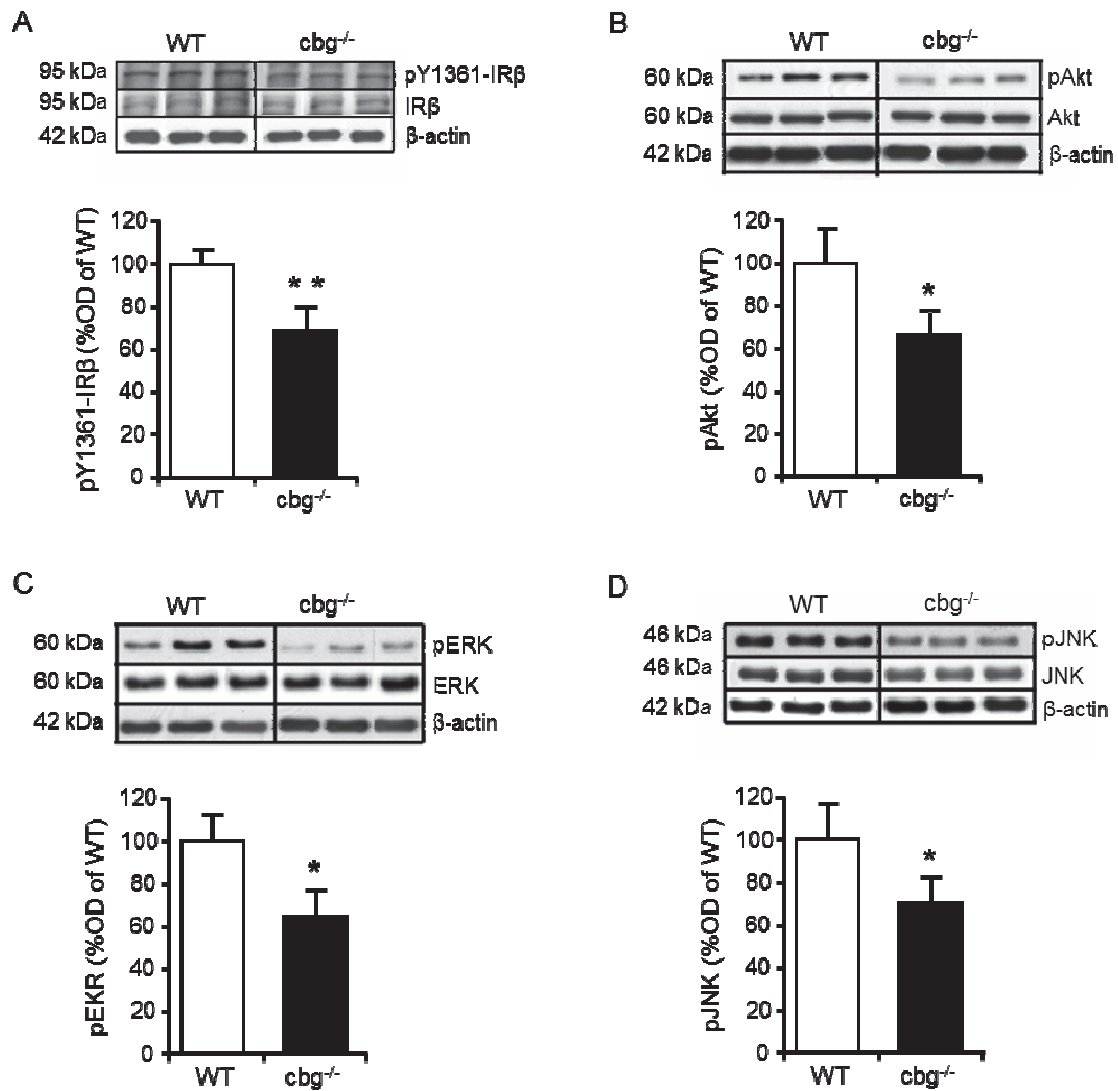


Figure 3. Western blot of hippocampus homogenate of total and tyr-1361 phosphorylated insulin receptor (IR)-β (A), total and phosphorylated Akt (B), total and phosphorylated ERK (C) and total and phosphorylated JNK (D). Differences between *cbg*^{-/-} and WT: * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

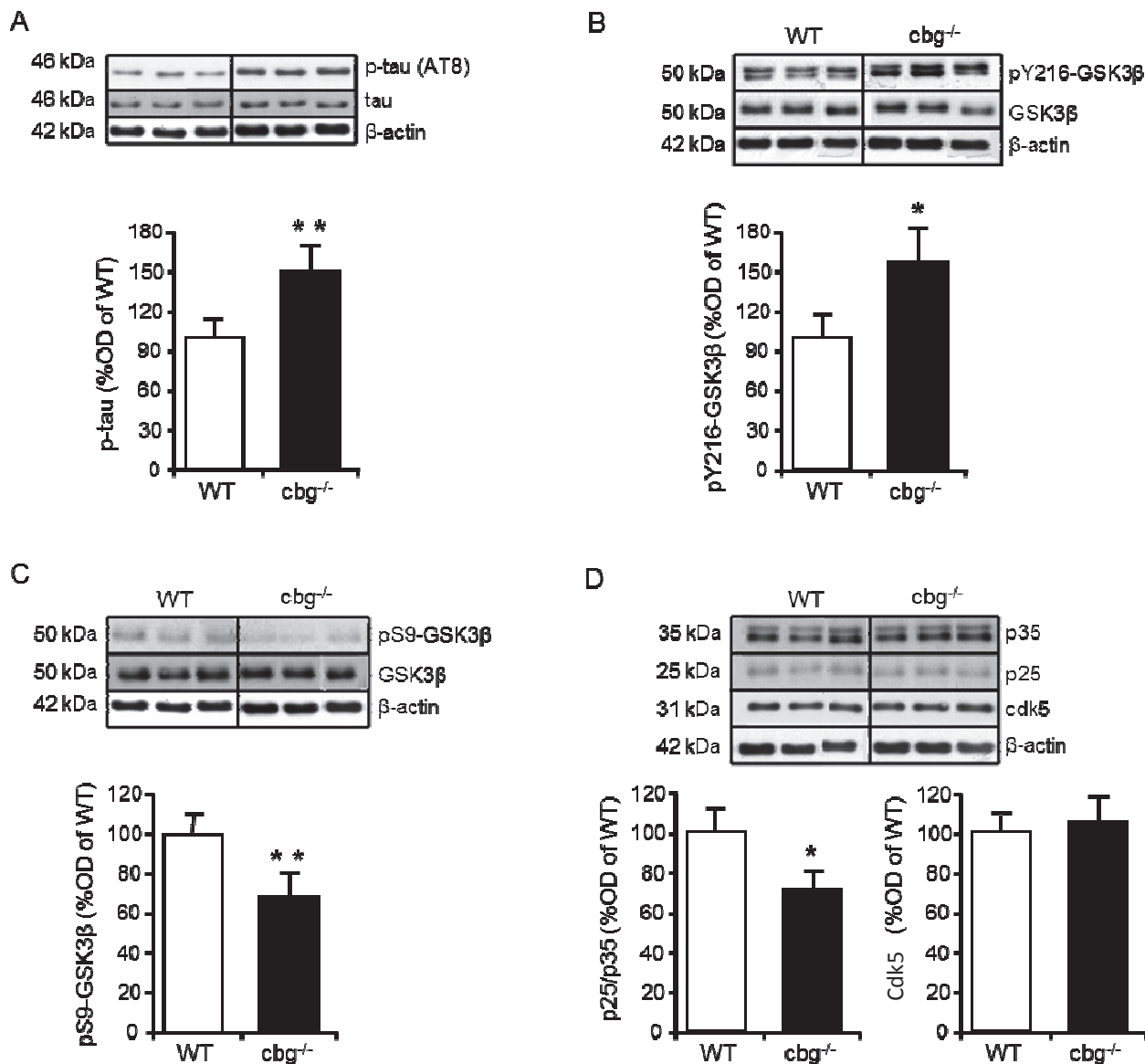


Figure 4. Western blot of hippocampus homogenate of Tau and phosphorylate Tau protein (A) of GSK3β, phosphorylate GSK3β at residue tyrosine-216 (active form) (B) and phosphorylate GSK3β at residue serine-9 (inactive form) (C) and p35, p25 and cdk5 kinase (D). Differences between *cbg*^{-/-} vs WT: *P<0.05 and ** P<0.01.

Although CBG deficiency affected insulin signaling in the hippocampus, synaptic function remained unchanged, since there were no differences in several synaptic markers such as synaptophysin ($t_{(22)}=-0.290$, $p=ns$; Fig. 5A), PSD95 ($t_{(22)}=0.334$, $p=ns$; Fig. 5B), NR1 ($t_{(22)}=0.957$, $p=ns$; Fig. 5C), NR2A ($\chi^2=0.667$, $p=ns$; Fig. 5D), arc ($t_{(21)}=0.030$, $p=ns$; Fig. 5E) and mature BDNF ($t_{(22)}=0.636$, $p=ns$; Fig. 5E).

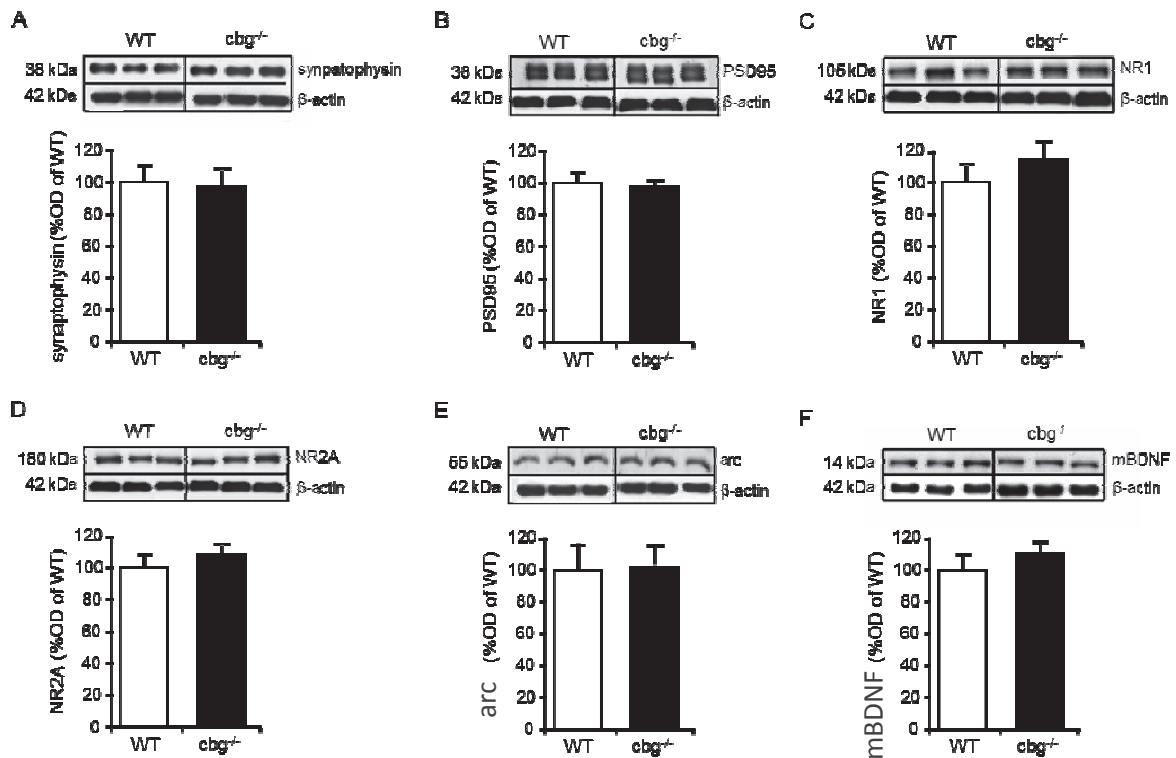


Figure 5. Western blot in hippocampus homogenates of synaptophysin (A), PSD95 (B), NR1 (C), NR2A (D), arc (E) and mBDNF (F). Differences between *cbg*^{-/-} vs WT: *P<0.05 and ** P<0.01.

Discussion

This study investigated whether CBG deficiency affected glucocorticoid activity in the hippocampus, a brain area containing a high density of GRs and MR^{22,36} and involved in learning and memory processes, in which glucocorticoids have an important role¹³⁻¹⁵. CBG presence has been reported in cells from the pineal gland, hypothalamus, hippocampus, and cerebrospinal fluid³¹⁻³⁴, although its role remains unknown. Here, we confirm the presence of CBG protein in the mouse hippocampus and that CBG deficiency in mice causes higher levels of free corticosterone and elicits features typical of glucocorticoid excess suggesting that CBG regulates glucocorticoid availability in the nervous system.

The *cbg*^{-/-} mice used here present in serum reduced levels of total corticosterone and higher amounts of free corticosterone compared to WT mice^{27,29}. By contrast, in the hippocampi of WT and *cbg*^{-/-} mice we observed similar levels of total corticosterone and significantly higher free corticosterone in *cbg*^{-/-} than WT mice, representing 93% of the total corticosterone amount. Ours results were discordant with diminished levels of total corticosterone in dorsal hippocampus previously described³⁷, that could be because we excised whole hippocampus and homogenized while Minni et al realized microdialysis in freely moving through the perfusion of dorsal hippocampus. We studied whether these higher levels of free corticosterone increased glucocorticoid activity. While there were no differences in the levels of the GR, hippocampi of *cbg*^{-/-} mice showed increased MR expression, which has been described in situations of glucocorticoid excess³⁸. This implies that different levels of glucocorticoids may elicit different responses by binding to MR and/or GR, leading to the formation of homodimers (GR-GR) or heterodimers (GR-MR) that trigger different responsive genes and, consequently, different signaling pathways³⁸⁻⁴⁰. Consistent with the elevated activity of CORT through the MR, we observed increased protein expression of PAI-1, a known downstream effector of activated MR³⁵. Thus, our results show that *cbg*^{-/-} mice hippocampus, with higher levels of free corticosterone, display MR-mediated glucocorticoid activity that is characteristic of situations of glucocorticoid excess.

It has been suggested that cognitive impairment in diabetes could be linked to the elevated glucocorticoid levels frequently associated with this disease¹⁶. The study of the insulin signaling pathway in hippocampus of *cbg*^{-/-} mice revealed diminished IR- β phosphorylation at tyrosine-1361, indicating decreased transduction through IRS1 and PI3K signaling. Accordingly, reduced phosphorylated levels of Akt and ERK, downstream effectors of IR-PI3K signaling, were also observed in *cbg*^{-/-} mice with respect to WT.

These results are in agreement with the previous study demonstrating that glucocorticoid excess induces insulin resistance through increased MR expression³⁸. We have reported that *cbg*^{-/-} mice show a slight, but higher energy intake²⁹ than WT mice consistent with the insulin resistance found here at central level. Nevertheless, we did not find peripheral insulin resistance in *cbg*^{-/-} mice assessed by intraperitoneal glucose tolerance test (unpublished results) stating a different affectation at peripheral or central localization to free corticosterone levels.

As a member of the MAPK family, JNK is central to the stress signaling pathway involved in inducing insulin resistance, as it phosphorylates IRS1 and blocks insulin signal transduction^{41,42}. Our results showed decreased JNK phosphorylation in *cbg*^{-/-} mice. Previously, we had described that chronic glucocorticoid administration promotes insulin resistance in the hippocampus by promoting JNK activation³⁸. Thus, JNK appears to be regulated in a different way in CBG-deficient mice. It is known that dual-specificity phosphatase-1 (DUSP-1) is a target gene for the anti-inflammatory glucocorticoid-mediated actions through GR. DUSP-1 upregulation decreases MAPK and JNK activation⁴³. The administration of LPS to rats promotes the inhibition of DUSP-1 on the frontal cortex but an increase in hippocampus which seems less susceptible to pro-inflammatory effects of CORT⁴⁴. We have observed that *cbg*^{-/-} mice showed increased DUSP-1 expression in epididymal adipose tissue and in locally established macrophages (unpublished results) probably as a consequence of elevated free corticosterone. The upregulation of DUSP-1 in *cbg*^{-/-} mice in hippocampus, if confirmed, could explain the decreased JNK phosphorylation in *cbg*^{-/-} mice observed.

Glucocorticoid excess has been linked to cognitive impairment and Alzheimer's disease, with phosphorylated Tau (pTau) protein also implicated^{18,20,38}. *Cbg*^{-/-} mice had significantly increased pTau levels possibly as a consequence of the elevated free

corticosterone levels, indicating damage in the hippocampus. Tau protein is phosphorylated by several kinases belonging to different signaling pathways, such as Gsk3 β and Cdk5^{45,46}. Our results suggest that increased pTau levels in CBG-deficient mice could be a consequence of impaired insulin receptor signaling affecting the Akt-Gsk3 β pathway, since *cbg*^{-/-} mice showed increased pY216-GSK3 β (active form), decreased pS9-GSK3 β (inactive form) and, subsequently, increased Gsk3 β phosphorylation activity, with no changes in Cdk5 activation.

Despite the changes in insulin signaling and Tau phosphorylation, *cbg*^{-/-} mice did not present impaired synaptic function since there were no changes in the synaptic markers studied.

In conclusion, our results demonstrate that CBG has an important role in regulating the glucocorticoid activity in the hippocampus. CBG deficiency elicited higher levels of free corticosterone in hippocampus that activated MRs and disrupted insulin signaling, resulting in insulin resistance and Tau protein phosphorylation that is associated with neuronal damage and impaired memory. In addition, our results suggest that individuals with mutations in their CBG gene could be predisposed to suffer pathologies related with impaired memory, such as Alzheimer's disease. Further studies are required to confirm the role of CBG in the central nervous system, more specifically the hippocampus, and its involvement in glucocorticoid activity.

Acknowledgments

The investigation was supported by the Fondo Investigación Sanitaria PI09/00505. José Gulfo was the recipient of a predoctoral scholarship from the University of Barcelona, Angelo Ledda was the recipient of a European and Sardinian scholarship “Master and Back”.

References

1. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(6):463-475. doi:10.1038/nrn1683.
2. de Kloet ER, Karst H, Joëls M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):268-272. doi:10.1016/j.yfrne.2007.10.002.
3. Radhakutty A, Mangelsdorf BL, Drake SM, et al. Effects of prednisolone on energy and fat metabolism in patients with rheumatoid arthritis: tissue-specific insulin resistance with commonly used prednisolone doses. *Clin Endocrinol (Oxf).* June 2016. doi:10.1111/cen.13138.
4. Whirledge S, Cidlowski JA. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology.* 2013;154(12):4450-4468. doi:10.1210/en.2013-1652.
5. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation.* 2015;22(1-2):20-32. doi:10.1159/000362724.
6. Björntorp P, Rosmond R. Obesity and cortisol. *Nutrition.* 2000;16(10):924-936.
7. Muhtz C, Zyriax B-C, Klähn T, Windler E, Otte C. Depressive symptoms and metabolic risk: effects of cortisol and gender. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(7):1004-1011. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.01.016.
8. Vogelzangs N, Penninx BW. Cortisol and Insulin in Depression and Metabolic Syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32(7):856. doi:10.1016/j.psyneuen.2007.04.012.

9. Amatruda JM, Livingston JN, Lockwood DH. Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess, and chronic renal failure. *Diabetes Metab Rev.* 1985;1(3):293-317.
10. Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol.* 2014;223(3):R49-62. doi:10.1530/JOE-14-0373.
11. Delaunay F, Khan A, Cintra A, et al. Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest.* 1997;100(8):2094-2098. doi:10.1172/JCI119743.
12. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32(3):256-266. doi:10.1016/j.psyneuen.2006.12.013.
13. Coluccia D, Wolf OT, Kollias S, Roozendaal B, Forster A, de Quervain DJ-F. Glucocorticoid Therapy-Induced Memory Deficits: Acute versus Chronic Effects. *J Neurosci.* 2008;28(13):3474-3478. doi:10.1523/JNEUROSCI.4893-07.2008.
14. Abercrombie HC, Jahn AL, Davidson RJ, Kern S, Kirschbaum C, Halverson J. Cortisol's effects on hippocampal activation in depressed patients are related to alterations in memory formation. *J Psychiatr Res.* 2011;45(1):15-23. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.10.005.
15. Sousa N, Lukoyanov N V, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience.*

- 2000;97(2):253-266.
16. Stranahan AM, Arumugam T V, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci.* 2008;11(3):309-317. doi:10.1038/nn2055.
 17. Dobarro M, Orejana L, Aguirre N, et al. Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid β levels, tau phosphorylation and insulin resistance in response to chronic corticosterone administration. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(6):1351-1360. doi:10.1017/S1461145712001393.
 18. Elgh E, Lindqvist Astot A, Fagerlund M, Eriksson S, Olsson T, Näsman B. Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2006;59(2):155-161. doi:10.1016/j.biopsych.2005.06.017.
 19. Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, et al. Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology.* 2007;85(2):71-80. doi:10.1159/000101694.
 20. Csernansky JG, Dong H, Fagan AM, et al. Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer-type dementia. *Am J Psychiatry.* 2006;163(12):2164-2169. doi:10.1176/ajp.2006.163.12.2164.
 21. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 1985;117(6):2505-2511. doi:10.1210/endo-117-6-2505.
 22. van Steensel B, van Binnendijk EP, Hornsby CD, et al. Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of

- rat hippocampus neurons. *J Cell Sci.* 1996;792:787-792.
23. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev.* 1989;10(3):232-274. doi:10.1210/edrv-10-3-232.
24. Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta.* 2005;359(1-2):189-194. doi:10.1016/j.cccn.2005.03.044.
25. Cizza G, Rother KI. Cortisol binding globulin: more than just a carrier? *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):77-80. doi:10.1210/jc.2011-3090.
26. Meyer E, Nenke M, Rankin W, Lewis J, Torpy D. Corticosteroid-Binding Globulin: A Review of Basic and Clinical Advances. *Horm Metab Res.* 2016;48(6):359-371. doi:10.1055/s-0042-108071.
27. Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, et al. Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol.* 2006;26(19):7236-7245. doi:10.1128/MCB.00400-06.
28. Richard EM, Helbling J-C, Tridon C, et al. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology.* 2010;151(2):649-659.
29. Gulfo J, Ledda A, Serra E, Cabot C, Esteve M, Grasa M. Altered lipid partitioning and glucocorticoid availability in CBG-deficient male mice with diet-induced obesity. *Obesity.* 2016;24(8):1677-1686. doi:10.1002/oby.21543.
30. Moisan MP, Minni AM, Dominguez G, et al. Role of corticosteroid binding globulin in the fast actions of glucocorticoids on the brain. *Steroids.* 2014;81:109-115. doi:10.1016/j.steroids.2013.10.013.

31. Predine J, Brailly S, Delaporte P, Milgrom E. Protein binding of cortisol in human cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;58(1):6-11. doi:10.1210/jcem-58-1-6.
32. Perrot-Applanat M, Racadot O, Milgrom E. Specific localization of plasma corticosteroid-binding globulin immunoreactivity in pituitary corticotrophs. *Endocrinology.* 1984;115(2):559-569. doi:10.1210/endo-115-2-559.
33. Sivukhina E V, Jirikowski GF, Bernstein HG, Lewis JG, Herbert Z. Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin. *Horm Metab Res.* 2006;38(4):253-259. doi:10.1055/s-2006-925346.
34. Sivukhina E, Helbling J-C, Minni AM, et al. Intrinsic expression of transcortin in neural cells of the mouse brain: a histochemical and molecular study. *J Exp Biol.* 2013;216(Pt 2):245-252.
35. Chun T-Y, Pratt JH. Aldosterone increases plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;239(1-2):55-61. doi:10.1016/j.mce.2005.03.016.
36. De Kloet E, Vreugdenhil V, Oitzl M, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 1998;19(3):269-301. doi:10.1210/edrv.19.3.0331.
37. Minni AM, Dorey R, Piérard C, et al. Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: Impact on memory retrieval. *Endocrinology.* 2012;153(10):4766-4774. doi:10.1210/en.2012-1485.
38. Solas M, Gerenu G, Gil-Bea FJ, Ramírez MJ. Mineralocorticoid receptor activation

- induces insulin resistance through c-Jun N-terminal kinases in response to chronic corticosterone: cognitive implications. *J Neuroendocrinol.* 2013;25(4):350-356. doi:10.1111/jne.12006.
39. Nishi M, Tanaka M, Matsuda K, Sunaguchi M, Kawata M. Visualization of Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor Interactions in Living Cells with GFP-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J Neurosci.* 2004;24(21):4918-4927. doi:10.1523/JNEUROSCI.5495-03.2004.
40. Nishi M. Dynamics of corticosteroid receptors: lessons from live cell imaging. *Acta Histochem Cytochem.* 2011;44(1):1-7. doi:10.1267/ahc.10028.
41. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(2):142-149. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.001.
42. Tanti J-F, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(6):753-762. doi:10.1016/j.coph.2009.07.004.
43. Zhou Y, Ling E-A, Dheen ST. Dexamethasone suppresses monocyte chemoattractant protein-1 production via mitogen activated protein kinase phosphatase-1 dependent inhibition of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in activated rat microglia. *J Neurochem.* 2007;102(3):667-678. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04535.x.
44. Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM. Glucocorticoids Exacerbate Lipopolysaccharide-Induced Signaling in the Frontal Cortex and Hippocampus in a Dose-Dependent Manner. *J Neurosci.* 2010;30(41):13690-13698. doi:10.1523/JNEUROSCI.0303-09.2010.

45. Martin L, Latypova X, Wilson CM, et al. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 2013;12(1):289-309.
doi:10.1016/j.arr.2012.06.003.
46. Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* 2012;22(3):169-175. doi:10.1016/j.tcb.2011.11.003.

DISCUSIÓN

Discusión

El primer artículo en la base de datos pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) relacionado con los glucocorticoides data del año 1938 [280], 19 años después en 1956 se descubrió que los glucocorticoides se unían a proteínas plasmáticas haciéndolo con alta afinidad a la *Corticosteroid Binding Globulin* (CBG) [281], [282]. La CBG, que se produce principalmente por el hígado, es el transportador más importante para los glucocorticoides endógenos y tiene la capacidad de unir aproximadamente el 80% de los glucocorticoides activos en plasma, en los seres humanos cortisol y en los roedores corticosterona [165], una parte minoritaria de la hormona es unida por la albumina en un 10 a 15% aproximadamente quedando un 5% de hormona libre, que clásicamente se ha definido (teoría de la hormona libre) como la parte activa de la hormona capaz de atravesar la membrana celular y activar los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides. De esta forma es la CBG la proteína más importante en la regulación de fracción libre de los glucocorticoides [161], [162], [283], [284]. Además de su papel como proteína transportadora y reguladora del acervo de hormona libre, varios estudios han propuesto un papel más relevante de la CBG en la respuesta a los glucocorticoides, así se ha descrito la existencia de un posible receptor membranal para la CBG aunque, hasta la fecha, no ha podido ser clonado [161], [182], [285], [286].

Por otro lado se ha descrito la presencia de CBG en tejidos extra-hepáticos [171], [174], [175], [287] cuya función no está totalmente evidenciada. Además, en humanos se han encontrado varios polimorfismos para la CBG que afectan a su afinidad y capacidad de unión al cortisol, a su clivaje proteolítico por parte de la elastasa o incluso que comportan la falta total de la proteína [202], [203]. En estos individuos se ha podido observar que, si bien la falta de la proteína no es letal, sí que su ausencia o alteración en su funcionalidad está asociada a síntomas de fatiga crónica, dolor crónico, hipotensión e incluso en algunos casos obesidad [202].

Con el objetivo de ahondar en el estudio de cuál es la implicación de la CBG en la acción de los glucocorticoides, se diseñó un modelo de ratón KO para el gen de la CBG [220].

Este modelo se desarrolló en células madre embrionarias usando la metodología de recombinación homóloga y la falta de proteína en el ratón KO se comprobó por PCR y western blot [220]. Se observó que estos animales deficientes en CBG mostraban niveles disminuidos de corticosterona total e incrementados de corticosterona libre, pero que a su vez genes diana de los glucocorticoides, como la PEPCK, no mostraban una expresión incrementada, interpretándose que este ratón era insensible al incremento de la corticosterona libre [288].

Con todos estos antecedentes y resultados previos de nuestro grupo en los que se describió por primera vez la presencia de CBG en tejido adiposo [175], nos interesó ahondar en el estudio de la síntesis de CBG en tejidos extrahepáticos, de cómo esta se puede ver afectada en situaciones de inflamación y además determinar las consecuencias de su ausencia. Para llevar a cabo el estudio el Dr. Thomas Willnow del Max-Delbrueck Center for Molecular Medicine de Berlín nos cedió tres hembras y dos machos heterocigotos (*cbg^{+/-}*) para la deficiencia de CBG a partir de los que iniciamos nuestra colonia tal y como se describe en la sección materiales y métodos.

Siendo el síndrome metabólico una de las patologías que más afecta a la población mundial y que su desarrollo aparece como consecuencia del uso crónico de glucocorticoides como anti-inflamatorios [289], nuestro primer objetivo fue estudiar cómo se afecta la CBG del tejido adiposo durante el desarrollo de la obesidad, un modelo de inflamación crónica leve y de estrés metabólico, así como determinar qué consecuencias acarrea la falta de CBG en esta situación.

Observamos diferencias en el peso corporal y la ingesta entre los ratones KO y WT alimentados con dieta control (C), de forma que los ratones KO mostraron una mayor ingesta y un peso corporal ligeramente superior a los ratones WT. Curiosamente estas diferencias desaparecieron en los ratones alimentados con dieta hiperlipídica (HL). Es conocida que la acción de los glucocorticoides sobre el peso corporal en roedores depende de sus niveles circulantes [290], [291]. Así unos niveles moderados pero sostenidos de corticosterona total inducen un incremento del peso corporal, mientras que niveles farmacológicos crónicos causa una reducción del peso [292]. En el estudio de Petersen et al [220] no se observaron diferencias de peso corporal entre los ratones KO y WT ni en dieta control ni con dieta HL. Una diferencia remarcable entre su estudio y el nuestro es que ellos sólo registraron el peso final, mientras que nosotros registramos el peso de los animales durante las doce semanas de estudio de forma continuada lo que nos permitió observar un peso ligeramente más alto en los ratones KO con dieta C de forma sostenida y que estadísticamente resultó significativo. Además, acompañando este pequeño incremento de peso también existe un incremento significativo de ingesta en los ratones KO respecto a WT con dieta C. Este comportamiento es coherente con el efecto de la corticosterona en

situaciones de niveles de insulina normales [293], que era nuestro caso para la dieta C. Las diferencias encontradas entre el experimento de Petersen et al [220] y el de nuestro grupo en cuando la respuesta a una dieta HL pensamos que son debidas a la composición de la dieta. Así, en nuestro caso la dieta aportaba un 60% de la energía en forma de lípidos mientras que en su caso era sólo el 30%. Además, en nuestro caso una alta proporción de los ácidos grasos eran saturados (37%), dato que ignoramos en la dieta del trabajo de Petersen et al. todo ello contribuyó a inducir un marcado incremento de peso. A pesar que, esperábamos un mayor peso en los ratones KO alimentados con dieta HL respecto de los WT dado sus mayores niveles de corticosterona libre en un ambiente con la insulina elevada [293], no observamos ninguna diferencia ni en el peso ni en la ingesta. Quizás el incremento de corticosterona total, aunque no libre, en los ratones WT por efecto de la dieta HL igualase el efecto de la corticosterona en los KO.

La dieta HL incrementó los niveles de CBG en hígado y plasma (western y binding) en los ratones con 12 semanas de tratamiento. Junto con el incremento de CGB se observó también un incremento de los niveles de corticosterona total sin cambios en los de corticosterona libre. Sin embargo, en los ratones sometidos a dieta HL solamente durante una semana la capacidad de unión de la CBG no se vió modificada respecto de los animales alimentados con dieta C, siendo, además esta capacidad menor que a 12 semanas. Se observa pues, en este caso, un comportamiento atípico de una proteína negativa de fase aguda como ha sido descrita la CBG [294].

Por inmunohistoquímica se localizó CBG en el tejido adiposo blanco (TAB) epididimal de ratones WT tal como habíamos descrito previamente en rata [175]. La dieta HL provocó un incremento de la expresión de CBG en el TAB epididimal, pero no de la proteína. Ello podría ser debido a una regulación post-transcripcional, pero también a un flujo de CBG entre el pool plasmático y el tejido. Aunque con nuestros datos no podemos descartar totalmente ninguna de las dos posibilidades, el hecho la dieta HL no provoque ningún cambio en la cantidad de proteína pero si un aumento en su expresión sugiere una regulación post-traducciona l o una secreción hacia la circulación sanguínea. Qué significado tiene esta CBG en el tejido adiposo no la conocemos, pero atendiendo a la función que tiene en la sangre, la CBG podría regular los niveles de corticosterona libre en el tejido.

No se observaron diferencias en el peso de los depósitos de TAB de distintas localizaciones entre los ratones KO y WT alimentados con dieta C. Sin embargo, la dieta HL promovió una tendencia a un mayor incremento en el peso del TAB epididimal, a la vez que un menor incremento del peso del TAB subcutáneo en ratones KO respecto de los WT. Es decir, los ratones KO mostraron una alteración en el acúmulo de lípidos favoreciéndose el depósito visceral en detrimento del subcutáneo. Es conocido que el

tejido adiposo visceral es especialmente sensible a la acción de los glucocorticoides [295], y este repartimiento en la deposición de lípidos que mostró el ratón KO en comparación con el WT está de acuerdo con lo descrito previamente en un modelo de ratón con exceso de glucocorticoides e insulina [296]. Así estos resultados nos llevarían a pensar que la deficiencia de CBG conllevaría un ambiente de un cierto exceso de glucocorticoides que en situaciones fisiológicas no estresantes pasaría inadvertido, pero que frente al estrés metabólico de una dieta HL este se pondría de manifiesto. A pesar que los ratones KO con dieta C no mostraron diferencias en el peso del TAB, curiosamente se encontró una mayor expresión del factor de transcripción adipogénico PPAR γ en TAB epididimal y menor en TAB subcutáneo respecto de los ratones WT, patrón en la expresión que también estaría de acuerdo con un mayor acumulo de grasa visceral y con una acentuada acción glucocorticoide [297]. Al analizar el tamaño de los adipocitos, otra vez se hace patente la falta de diferencias significativas entre KO y WT con dieta C. Sin embargo, con dieta HL el tamaño de los adipocitos de los ratones KO fue significativamente mayor que el de los WT en el TAB epididimal y menor en el TAB subcutáneo datos coherentes con el tamaño del tejido y la expresión de PPAR γ y de acuerdo a un modelo aumento de acción de glucocorticoides [295]. Además, de acuerdo con todo ello, los adipocitos de TAB epididimal de los ratones KO con dieta HL también mostraron una lipólisis más activada respecto de los de ratones WT.

La infiltración de neutrófilos en un tejido es un proceso temprano y transitorio en la respuesta inflamatoria, allanando el camino para el reclutamiento y la activación de otros tipos de células [298]–[300]. En el TAB epididimal de los ratones KO de una semana de tratamiento con dieta C encontramos mayor infiltración de neutrófilos respecto de los ratones WT, coincidiendo con el incremento en la expresión de algunos genes implicados en la inflamación (TNF α , IL6). Como ya estaba descrito [298], era de esperar que la dieta HL provocara un incremento temprano en la infiltración de neutrófilos y así se observó en nuestros resultados. Lo destacable y novedoso de nuestros resultados es que en los ratones KO la infiltración promovida por la dieta HL fue mucho mayor que en los ratones WT, lo cual es coherente con la mayor infiltración que presentan ya de base, es decir con dieta C.

En cuanto a la abundancia de crown-like structures (CLS) analizadas en el TAB epididimal de los ratones con 12 semanas de tratamiento, solo se observó una tendencia a aumentar en los ratones KO aunque sin mostrar diferencias significativas. La dieta HL, como era de esperar, aumentó la presencia de CLS en el TAB epididimal pero sin diferencia entre los ratones KO y los WT. La mayor inflamación (expresión de genes proinflamatorios) observada a 1 semana en los ratones KO no se encuentra a las 12 semanas de tratamiento. Hay que tener en cuenta que los glucocorticoides no se comportan siempre como antiinflamatorios [301]. Así, se han sugerido tres diferentes niveles de actividad

glucocorticoide: unos niveles basales de glucocorticoides mantendrían un sistema inmune inactivo en ausencia de estímulo, unos niveles medios de glucocorticoides promoverían la respuesta inmunitaria, es decir, actuarían como proinflamatorios y finalmente niveles elevados de glucocorticoides actuarían como anti-inflamatorios promoviendo la restauración de la homeostasis [301]. En nuestro estudio, observamos que en los ratones KO, con unos niveles elevados de corticosterona libre, la expresión de DUSP1 en el TAB epididimal se encontraba elevada a lo largo de todo el estudio respecto de los ratones WT. DUSP1 es una diana de los glucocorticoides a través de la cual se promueven sus efectos antiinflamatorios [302], así DUSP1 desfosforila e inactiva los miembros de la superfamilia de MAPK, en particular, las JNK y p38 [156], [303]. Nuestros datos parecen indicar que la respuesta temprana a estímulos inflamatorios, como es la dieta HL, los glucocorticoides libres que están más elevados en ausencia de CBG provocarían una respuesta más inflamatoria (preparativa) que se atenuaría con el tiempo a través de la persistencia de proteínas antiinflamatorias clave, como lo es DUSP1.

El factor de transcripción NFκB es un importan mediador de la respuesta inflamatoria [304] y los glucocorticoides ejercen su efecto anti-inflamatorio, en parte, inhibiendo la activación de NFκB mediante su fosforilación en el residuo ser276 (pNFκB), acción que es mediada a través del receptor de glucocorticoides (GR) [305], [306]. Estudiamos NFκB en adipocitos de TAB epididimal de ratones tratados con dieta durante 12 semanas. Encontramos unos niveles incrementados de NFκB en los ratones KO respecto de los WT, más acentuada en la dieta C y siendo el único grupo en que observamos un incremento de pNFκB. Además, la relación pNFκB/NFκB no resultó afectada en ninguna de las situaciones estudiadas. Este patrón es bastante coherente con lo que se ha comentado previamente, de que en lo ratones KO los elevados niveles de corticosterona libre promoverían acciones proinflamatorias y anti-inflamatorias según el ambiente fisiológico en que se encuentren.

Trabajos previos han relacionado la involución del timo y el incremento de la glándula adrenal como una consecuencia de la desregulación de los niveles de glucocorticoides [97]. Los timocitos inmaduros son la principal diana de los glucocorticoides en el timo asociado a un efecto inmunosupresor [307], [308]. Así, se ha observado que la administración exógena de glucocorticoides o su incremento endógeno causado por el estrés promueven una involución del timo por apoptosis masiva de timocitos [309]. Una vez más, nuestros resultados sugieren que la involución del timo podría deberse a una exposición prolongada de niveles elevados de corticosterona libre, pero se habrá de estudiar con más profundidad la falta de CBG en este tejido y sus efectos sobre los timocitos.

Previamente el grupo del Dr. Willnow había descrito que los ratones KO mostraban una mayor mortalidad cuando se les inyectaba LPS para provocar un shock séptico y que el

pulmón resultaba particularmente afectado incrementando la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-6 [220]. Los glucocorticoides son esenciales para el desarrollo y maduración del pulmón [125], [310]. Además, la presencia de CBG descrita en placenta humana plantea la hipótesis de que podría cumplir un papel protector regulando los niveles de glucocorticoides maternos hacia el feto [311]. Si bien en nuestro modelo la falta de CBG no comprometió el desarrollo del pulmón, sí que presenta una respuesta alterada frente a cuadros inflamatorios agudos. Por otro lado, la pancreatitis aguda, enfermedad inflamatoria, se caracteriza por una importante afectación pulmonar que acaba siendo la causa de muerte de uno de cada tres pacientes [312] sin que respondan a la terapia con glucocorticoides [313]. Además algunos estudios señalan que en la pancreatitis existe una disminución de CBG circulante [314]. Por todo ello, nos planteamos usar este modelo de inflamación aguda en el ratón deficiente en CBG para determinar su implicación en esta situación. Este estudio nos pareció interesante realizarlo en ratones machos y hembras dado al dimorfismo sexual que existe en los niveles de CBG y corticosterona, mayores en hembras [315], y que podía comportar una respuesta diferente frente a esta inflamación aguda. Es de destacar que justo en este estudio pusimos en evidencia que la CBG es esencial para mantener el dimorfismo sexual en los niveles de corticosterona circulante ya que los ratones KO machos y hembras no presentan diferencias en los niveles de corticosterona total circulante. Es interesante comentar que en el momento de iniciar este experimento no se había aún descrito la falta de dimorfismo sexual en los niveles de corticosterona cuando la CBG está ausente, pero que, fue descrito por el grupo de la Dra. MP Moisan de la Universidad de Bordeaux a finales del 2015 justo unos meses antes de publicar nuestros resultados [316].

Nuestros resultados no mostraron ninguna diferencia en cuanto a la mortalidad y afectación pulmonar entre los ratones WT y los KO. Una posible explicación podría ser el tiempo, quizás si hubiésemos dejado más horas tras la inducción de la pancreatitis hubiéramos observado algún cambio en la supervivencia. En nuestro caso sacrificamos los animales a 10 horas tras el inicio de la inducción de la pancreatitis, en el punto álgido de la inflamación, en cambio el grupo del Dr. Willnow encontraron la mayor mortalidad aproximadamente a las 25h tras inducir el shock séptico [220]. Por otro lado, el modelo de inducción de pancreatitis en ratón a través de la administración de ceruleína intraperitoneal, resulta útil para el estudio de la patogénesis de la enfermedad, pero tiene la desventaja que aún con dosis máximas de ceruleína sólo logra inducir una pancreatitis aguda leve, con una baja mortalidad [317].

Curiosamente se encontró que la pancreatitis provocaba un incremento en los niveles de corticosterona total sólo en los ratones KO, machos y hembras, mientras que no hubo ningún cambio en los WT. Estos resultados sugieren que la CBG no solo regularía los

niveles de corticosterona libre sino que también tendría la capacidad de regular los niveles de corticosterona total durante la inflamación aguda.

Investigamos la presencia de CBG en el pulmón y mediante inmunohistoquímica detectamos su presencia en células epiteliales alveolares y en macrófagos pulmonares. Los resultados de expresión génica y western confirmaron la presencia de CBG en el pulmón. Además, la CBG en pulmón presentaba un dimorfismo sexual inverso al observado en el hígado, es decir, era mayor en machos que en hembras. Destacar que a pesar de que la CBG fue clonada a partir de ADNc de pulmón, hasta el momento no se había descrito su presencia en este órgano [166]. La pancreatitis promovió un incremento de CBG sólo en el pulmón los ratones machos, mientras que el análisis histológico para evaluar la severidad de la enfermedad mostró que las hembras KO estaban ligeramente más afectadas. La presencia de CBG en el pulmón y que sus niveles se vean afectados por la inflamación aguda sugiere un papel específico, aún desconocido, de la CBG en este órgano.

Tanto el grupo del Dr. Willnow como el de la Dr. Moisan habían descrito una respuesta alterada del eje HHA en ausencia de CBG [220], [221]. Se había descrito que cuando la CBG está ausente existe un mayor recambio de corticosterona y unos niveles incrementados de ACTH [220]. Por otro lado nosotros habíamos observamos un mayor peso de la glándula adrenal en los ratones KO tanto en hembras como en machos, lo cual nos llevó a investigar si la síntesis de corticosteroides estaría también alterada en situaciones de déficit de CBG. Así mismo nos interesó determinar si la glándula adrenal sintetizaba CBG.

Hemos encontrado en los ratones deficientes en CBG una disminución de la expresión del receptor de ACTH (MC2R), de la proteína encargada de la captación de colesterol (SRB1), de la proteína Star, junto con una disminución de la expresión de los principales enzimas responsables de la síntesis de corticoides (glucocorticoides y mineralcorticoides) indicando una menor actividad sintética de la glándula. Es interesante señalar que la disminución fue mucho más marcada en hembras que en machos, perdiéndose el dimorfismo sexual observado en los ratones WT que muestran una mayor expresión para las proteínas implicadas en la síntesis de glucocorticoides en las hembras, reflejando los niveles circulantes de corticosterona. Estos resultados nos sorprendieron dado el mayor recambio de corticosterona y los mayores niveles de ACTH circulantes previamente descritos [220]. Además, normalmente un mayor tamaño de la glándula adrenal se asocia a una hiperactividad de la misma [318]. Sin embargo, ellos son coherentes con el síndrome de hiperplasia suprarrenal (HSC) descrito en humanos y que se debe, en la mayoría de los casos, a una mutación en la enzima Cyp21a1 [319]. La interpretación de estos datos nos lleva a pensar que los niveles elevados de corticosterona libre que también hemos encontrados a nivel central en el ratón KO mantendrían la ACTH elevada, este estímulo

constante a nivel de adrenal llevaría a una baja respuesta, una *down regulation* del receptor MR2C, resultando un incremento de la glándula consecuencia de esta sobreestimulación. Una vez más, estos resultados nos llevan a que el ratón deficiente en CBG muestra síntomas de un estado de exceso moderado de glucocorticoides.

Además, mediante inmunohistoquímica y western hemos encontrado CBG en la glándula adrenal y por PCR hemos detectado síntesis de ARNm. La inmunohistoquímica nos reveló presencia de CBG en la corteza adrenal de forma moderada y sorprendentemente abundante en la medula adrenal. La glándula adrenal es uno de los órganos más irrigados del organismo por lo que debemos descartar que la CBG sea procedente del plasma sanguíneo. Por ello, en el caso de la inmunohistoquímica los animales fueron perfundidos con paraformaldehído previa obtención de los tejidos.

La glándula adrenal de los mamíferos consta de dos partes anatómicamente distintos: una corteza externa, en donde hay la síntesis de los esteroides y una médula central, donde tiene lugar la síntesis de catecolaminas [320]. La corticosterona, sintetizada en el córtex, por su naturaleza hidrofóbica puede alcanzar la médula donde el receptor de glucocorticoides (GR) es abundante [320]. Se ha descrito que los glucocorticoides son activadores de la enzima feniletanolamina *N*-metiltransferasa (PNMT), la cual cataliza la conversión de noradrenalina a adrenalina potenciando su síntesis y liberación en situaciones de estrés [321]. Por ello, hipotetizamos que la presencia de CBG en la médula adrenal podría ejercer un papel regulador del acceso de los glucocorticoides para regular la síntesis de catecolaminas.

Puesto que la falta de CBG está asociada a una respuesta alterada del eje HHA, que los glucocorticoides desempeñan un importante papel a nivel de sistema nervioso central y que se había descrito la presencia de CBG en hipotálamo e hipocampo [322], [323], quisimos analizar si la falta de CBG también podía afectar la señalización de los glucocorticoides a nivel central. Escogimos el hipocampo por ser, en realidad, donde se inicia la señalización de los glucocorticoides en el eje HHA y porque es una área con una alta densidad de GR [324]. Además, el exceso de glucocorticoides se ha relacionado con pérdida de memoria que a la vez correlaciona con disminución del tamaño del hipocampo [325]

Detectamos mediante western CBG en el hipocampo de los ratones WT mientras que no se detectó en los KO como se esperaba. Los niveles de corticosterona total, a diferencia del plasma, fueron similares en KO y WT, sin embargo los niveles de corticosterona libre fueron muy superiores en los ratones KO (93% del total de corticosterona) comparado con los WT (62% del total de corticosterona). No se encontraron diferencias en los niveles de GR entre ambos genotipos, mientras que los niveles del receptor de mineralcorticoides (MR) estaban incrementados en los ratones KO respecto de los WT, así como los niveles

de proteínas mediadas a través de MR, como PAI-1 [326]. El incremento de PAI-1 está asociado a la acumulación de la proteína beta-amiloide relacionada con el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer [327]. Los glucocorticoides han sido reconocidos como perturbadores en la función cognitiva, especialmente con el envejecimiento [328]. Así en personas mayores que presentan deficiencias de aprendizaje y memoria se encuentran elevados los niveles de glucocorticoides con una asociación entre el déficit cognitivo y la atrofia del hipocampo [329]. Está descrito que a nivel de hipocampo el exceso de glucocorticoides mediatiza sus efectos a través de MR [330], de forma que el ratón deficiente en CBG se comportaría, a pesar que los niveles de corticosterona total circulantes están disminuidos, como en una situación de exceso de glucocorticoides.

La actividad de la proteína GSK3 β también llamada quinasa de Tau, viene determinada por el estado de su fosforilación: en su forma inactiva la fosforilación ocurre a nivel de la serina 9 pGSK3 β (Ser9), mientras que su forma activa es fosforilada en la tirosina 216 pGSK3 β (Tyr216) [331], [332]. En los ratones KO encontramos niveles aumentados pGSK3 β (Tyr216) y niveles disminuidos de pGSK3 β (Ser9) con una mayor fosforilación de Tau. Estos resultados están de acuerdo con los efectos descritos como consecuencia de la exposición crónica a glucocorticoides [333]. Así, nuestros resultados apuntan a un papel importante de la CBG a nivel de hipocampo modulando la acción de los glucocorticoides y que su ausencia desemboca a un ambiente de corticosterona libre aumentado.

Estudios recientes revelan que existe una relación entre la diabetes y el estrés, y que un exceso de glucocorticoides puede desempeñar un papel en la patogénesis subyacente de ambas enfermedades [334]. Además, se ha sugerido que el deterioro cognitivo asociado a la diabetes puede estar relacionado con los elevados niveles de glucocorticoides ligados a esta patología [335], [336]. Así, estudiamos la señalización de la insulina en el hipocampo y encontramos que los ratones KO respecto de los WT tenían alterada esta vía, presentando una reducción en la fosforilación del receptor de la insulina (IR) indicando una disminución de la señalización a través de IRS1 y PI3K. De acuerdo con ello, también presentaban disminuida la fosforilación de Akt y ERK, efectores de la señalización mediada por insulina a través de IR-PI3K. Nuestros resultados están de acuerdo con que un exceso de glucocorticoides induce resistencia a la insulina a través de un incremento de la expresión de MR [330]. Cabe destacar, que mientras encontramos resistencia a la insulina a nivel central (hipocampo) en los ratones KO, a nivel periférico no la hemos encontrado, esto nos podría estar indicando que la deficiencia de CBG comporta un ambiente de exceso de glucocorticoides leve que conlleva una diferente respuesta según la sensibilidad del tejido a los glucocorticoides.

La unión de insulina al IR también promueve la activación de otra cascada de señalización mediante la activación de la MAPK. Está descrito que JNK, miembro de la cascada de

señalización de MAPK, está involucrado en la inducción de resistencia a la insulina fosforilando IRS1 y bloqueando así la señalización de la insulina [337], [338]. Los ratones KO mostraron una disminución de la fosforilación de JNK respecto a los WT, mientras que está descrito que la administración crónica de glucocorticoides promueve resistencia a la insulina en el hipocampo a través de la fosforilación de JNK [330]. En nuestro caso podría estar implicado DUSP1 ya que es un inhibidor de MAPK y JNK, y como se ha comentado anteriormente, DUSP1 se encuentra incrementado en el TAB epididimal de los ratones KO. Así, podría ser que como diana de los glucocorticoides DUSP1 también se encontrara incrementado en el hipocampo de los ratones KO como se ha encontrado en el hipocampo de ratas a las que se les ha administrado LPS [339].

En resumen, los resultados de esta tesis permiten afirmar que la CBG se sintetiza a nivel de tejido adiposo blanco, pulmón, glándula adrenal e hipocampo. Además, todos los estudios que se han realizado utilizando un modelo de ratón deficiente en CBG apuntan a que las alteraciones observadas son consecuencia de los elevados niveles de corticosterona libre ya sea circulante o dentro de la célula.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1- La obesidad inducida por la dieta hiperlipídica provoca a largo plazo el aumento de la expresión hepática de CBG, que correlaciona con mayor CBG sérica, capacidad de unión específica de y corticosterona total mientras que la hormona libre permanece inalterada.
- 2- El tejido adiposo blanco sintetiza CBG aunque en una cantidad muy minoritaria respecto del hígado. Esta expresión es modulada al alza por la dieta hiperlipídica a pesar que los niveles de proteína no se ven aumentados, sugiriendo una regulación post-transcripcional o bien el flujo de CBG entre el tejido y el pool plasmático.
- 3- Aunque los ratones deficientes en CBG con dieta control presentan un peso e ingesta sutilmente mayores respecto a los WT, frente una dieta hiperlipídica estas diferencias desaparecen. En la obesidad inducida por la dieta la deficiencia de CBG promueve el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo visceral en lugar del subcutáneo como se evidencia por los cambios en el peso y área de los adipocitos. Ello se corresponde con un modelo de moderado exceso de glucocorticoides y podría estar modulado, al menos en parte, por la expresión diferencial de PPAR γ .
- 4- La deficiencia de CBG frente a una dieta hiperlipídica intensifica en tejido adiposo epididimal la infiltración de neutrófilos inicial pero no la formación de *crown-like structures* ni los los marcadores inflamatorios a largo plazo acorde con la acción antiinflamatoria clásica de los glucocorticoides. Además, la resistencia a la insulina y el aumento de la lipólisis en adipocitos epididimales presentes ratifican que la deficiencia de CBG constituye un modelo de exceso moderado de glucocorticoides en el que actúan simultáneamente como antiinflamatorios y disruptores metabólicos

- 5- El pulmón presenta CBG con tinción específica en células epiteliales alveolares y macrófagos. Además la CBG en el pulmón presenta dimorfismo sexual con mayor expresión en machos que en hembras, a la inversa que el dimorfismo sexual establecido en hígado. La pancreatitis induce el aumento de CBG únicamente en pulmón de machos. Esta expresión diferencial sugiere que la CBG posee un papel específico en pulmón de ratones adultos.
- 6- La presencia de CBG es necesaria para que se manifieste el dimorfismo sexual en los niveles de corticosterona total circulante, mayores en hembras que en machos. Incluso ante el aumento de corticosterona que se da en ratones KO en respuesta a la pancreatitis, siguen sin observarse diferencias entre machos y hembras.
- 7- En la glándula adrenal existe síntesis de CBG, que por inmunohistoquímica se ubica principalmente en la médula adrenal a pesar que la síntesis de corticosterona se da en la corteza. A pesar que no se encuentran diferencias en los niveles de ARNm total en la glándula entre machos y hembras los niveles de proteína total son mayores en hembras debido al mayor tamaño y actividad esteroidogénica de la glándula adrenal en las hembras.
- 8- En los ratones deficientes en CBG se observa una caída de la expresión del receptor de ACTH y de los enzimas claves implicados en la esteroidogénesis adrenal en machos y sobretodo en hembras. Los responsables de la llegada de colesterol a la mitocondria, SRB1 y Star, disminuyen específicamente en hembras KO hasta los niveles de los machos. Todo ello indica una disminución de la actividad esteroidogénica en la glándula de los ratones KO que se contrapone con el aumento de su tamaño, normalmente asociado a hiperactividad.
- 9- Se confirma la presencia de CBG en hipocampo de ratón. En el hipocampo la deficiencia de CBG aumenta los niveles de corticosterona libre del 60% al 90% KO respecto de la corticosterona total. Ello va acompañado del aumento de expresión de proteínas reguladas por el receptor de mineralocorticoides, la disminución de la señalización de la insulina y aumento de fosforilación de la proteína Tau involucrada en daño neuronal, patrón de expresión que concuerda con un modelo de exceso moderado de glucocorticoides.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- [1] B. Leoutsakos and A. Leoutsakos, “The adrenal glands: a brief historical perspective,” *Hormones*, vol. 7, no. 4, pp. 334–336, Oct. 2008.
- [2] G. Pincus and K. V. Thimann, *The Hormones: Physiology, Chemistry, and Applications - Vol. 1*, vol. I. Academic Press (1948), 1948.
- [3] K. Løvås and E. S. Husebye, “Addison’s disease,” *Lancet*, vol. 365, no. 9476, pp. 2058–2061, 2005.
- [4] G. W. Thorn, A. E. Renold, and A. I. Winegrad, “Some Effects of Adrenal Cortical Steroids on Intermediary Metabolism,” *Br. Med. J.*, vol. 2, no. 5052, pp. 1009–1017, 1957.
- [5] S. Kuriyama, “The Adrenals in Relation to Carbohydrate Metabolism II: The Influence of Adrenalectomy Upon the Glycogenetic Power of The Liver,” *J. Biol. Chem.*, vol. 34, pp. 287–297, 1918.
- [6] A. J. Chakera and B. Vaidya, “Addison Disease in Adults: Diagnosis and Management,” *Am. J. Med.*, vol. 123, no. 5, pp. 409–413, 2010.
- [7] H. Raff and J. Findling, “A physiologic approach to diagnosis of the Cushing syndrome,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 138, no. 12, pp. 980–991, 2003.
- [8] I. Kyrou, G. P. Chrousos, and C. Tsigos, “Stress, visceral obesity, and metabolic complications,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1083, pp. 77–110, 2006.
- [9] Reichstein Tadeusr, “Chemistry of the adrenal cortex hormones,” *Nobel Lect. December 11, 1950*, 1950.
- [10] D. Ingle, *Edward C. Kendall*, vol. 47. The Natuonal Academic Press, 1972.
- [11] W. L. Miller, “A brief history of adrenal research: steroidogenesis - the soul of the adrenal.,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 371, no. 1–2, pp. 5–14, May 2013.

- [12] J. Glyn, "The discovery and early use of cortisone.," *J. R. Soc. Med.*, vol. 91, no. 10, pp. 513–517, 1998.
- [13] S. Hillier, "Diamonds are forever: the cortisone legacy," *J. Endocrinol.*, vol. 195, no. 1, pp. 1–6, Oct. 2007.
- [14] P. Hench, "The present status of cortisone and ACTH in general medicine," *Proc. R. Soc. Med.*, vol. 43, no. 10, pp. 769–773, 1950.
- [15] H. Schäcke, W. Döcke, and K. Asadullah, "Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids," *Pharmacol. Ther.*, vol. 96, pp. 23–43, 2002.
- [16] F. Spiga and S. L. Lightman, "Dynamics of adrenal glucocorticoid steroidogenesis in health and disease," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 408, pp. 227–234, 2015.
- [17] A. Eisenstein, "Effects of adrenal cortical hormones on carbohydrate, protein, and fat metabolism.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 26, no. 1, pp. 113–20, Jan. 1973.
- [18] T. Dickmeis, "Glucocorticoids and the circadian clock," *J. Endocrinol.*, vol. 200, no. 1, pp. 3–22, 2009.
- [19] J. M. H. M. Reul, A. Collins, R. S. Saliba, K. R. Mifsud, S. D. Carter, M. Gutierrez-Mecinas, X. Qian, and A. C. E. Linthorst, "Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience," *Neurobiol. Stress*, vol. 1, pp. 44–59, 2015.
- [20] M. Wang, "The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome.," *Nutr. Metab. (Lond.)*, vol. 2, no. 1, p. 3, Mar. 2005.
- [21] J. Galon, D. Franchimont, N. Hiroi, and G. Frey, "Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells," *FASEB J.*, vol. 16, pp. 61–71, 2002.
- [22] P. K. Siiteri, J. T. Murai, G. L. Hammond, J. A. Nisker, W. J. Raymoure, and R. W. Kuhn, "The serum transport of steroid hormones.," *Recent Prog. Horm. Res.*, vol. 38, pp. 457–510, 1982.
- [23] G. Vila, M. Krebs, M. Riedl, S. M. Baumgartner-Parzer, M. Clodi, C. Maier, G. Pacini, and A. Luger, "Acute effects of hydrocortisone on the metabolic response to a glucose load: increase in the first-phase insulin secretion.," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 163, no. 2, pp. 225–31, Aug. 2010.
- [24] A. Papadimitriou and K. N. Priftis, "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.," *Neuroimmunomodulation*, vol. 16, no. 5, pp. 265–71, Jan. 2009.
- [25] D. Cruz-Topete and J. a Cidlowski, "One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids.," *Neuroimmunomodulation*, vol. 22, no. 1–2, pp. 20–32, Jan. 2015.
- [26] N. Pecoraro, M. F. Dallman, J. P. Warne, A. B. Ginsberg, K. D. Laugero, S. E. la Fleur, H. Houshyar, F. Gomez, A. Bhargava, and S. F. Akana, "From Malthus to motive: How the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants," *Prog. Neurobiol.*, vol. 79, no. 5–6, pp. 247–340, 2006.

- [27] W. L. Miller and R. J. Auchus, "The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders.," *Endocr. Rev.*, vol. 32, no. 1, pp. 81–151, Feb. 2011.
- [28] D. Richard, Q. Lin, and E. Timofeeva, "The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: Their roles in the regulation of energy balance," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 440, no. 2–3, pp. 189–197, 2002.
- [29] E. Potter, S. Sutton, C. Donaldson, R. Chen, M. Perrin, K. Lewis, P. E. Sawchenko, and W. Vale, "Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 19, pp. 8777–8781, 1994.
- [30] M. Birnbaumer, "Vasopressin Receptors," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 11, no. 10, pp. 406–410, Dec. 2000.
- [31] M. L. Raffin-Sanson, Y. de Keyzer, and X. Bertagna, "Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: From physiology to pathological conditions," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 149, no. 2, pp. 79–90, 2003.
- [32] S. J. Getting, "Melanocortin peptides and their receptors: New targets for anti-inflammatory therapy," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 23, no. 10, pp. 447–449, 2002.
- [33] A. Catania, "Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity," *Trends Neurosci.*, vol. 31, no. 7, pp. 353–360, 2008.
- [34] I. Hanukoglu, "Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 43, no. 8, pp. 779–804, 1992.
- [35] A. H. Payne and D. B. Hales, "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones.," *Endocr. Rev.*, vol. 25, no. 6, pp. 947–70, Dec. 2004.
- [36] W. L. Miller, "Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer," *Endocrinology*, vol. 146, no. 6, pp. 2544–2550, 2005.
- [37] W. L. Miller and H. S. Bose, "Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking.," *J. Lipid Res.*, vol. 52, no. 12, pp. 2111–35, Dec. 2011.
- [38] L. K. Fonken and R. J. Nelson, "The effects of light at night on circadian clocks and metabolism," *Endocr. Rev.*, vol. 35, no. 4, pp. 648–670, 2014.
- [39] E. Challet, "Circadian clocks, food intake, and metabolism.," *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 119, pp. 105–35, 2013.
- [40] S. Chung, G. H. Son, and K. Kim, "Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1812, no. 5, pp. 581–591, 2011.
- [41] F. Spiga, E. J. Waite, Y. Liu, Y. M. Kershaw, G. Aguilera, and S. L. Lightman, "ACTH-dependent ultradian rhythm of corticosterone secretion," *Endocrinology*,

- vol. 152, no. 4, pp. 1448–1457, 2011.
- [42] F. Spiga, J. J. Walker, J. R. Terry, and S. L. Lightman, “HPA Axis-Rhythms,” *Compr. Physiol.*, vol. 4, no. July, pp. 1273–1298, 2014.
- [43] B. S. McEwen, “Protective and Damaging Effects of Stress Mediators,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 338, no. 3, pp. 171–179, 1998.
- [44] G. M. Russell, K. Kalafatakis, and S. L. Lightman, “The importance of biological oscillators for HPA activity and tissue glucocorticoid response: Coordinating stress and neurobehavioural adaptation,” *J. Neuroendocrinol.*, vol. 27, no. 0, p. n/a-n/a, 2014.
- [45] B. S. McEwen, “Allostasis and allostatic load: Implications for neuropsychopharmacology,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 22, no. 2, pp. 108–124, 2000.
- [46] S. F. Sorrells, J. R. Caso, C. D. Munhoz, and R. M. Sapolsky, “The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation,” *Neuron*, vol. 64, no. 1, pp. 33–39, 2009.
- [47] M. F. Dallman, N. C. Pecoraro, and S. E. La Fleur, “Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 19, no. 4, pp. 275–280, 2005.
- [48] B. S. McEwen and J. C. Wingfield, “The concept of allostasis in biology and biomedicine,” *Horm. Behav.*, vol. 43, no. 1, pp. 2–15, 2003.
- [49] S. Smith and W. Vale, “The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress,” *Dialogues Clin. Neurosci.*, Sep. 2006.
- [50] B. E. Leonard, “HPA and Immune Axes in Stress: Involvement of the Serotonergic System,” *Neuroimmunomodulation*, vol. 13, no. 5–6, pp. 268–276, 2006.
- [51] E. R. de Kloet, M. Joëls, and F. Holsboer, “Stress and the brain: from adaptation to disease,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, no. 6, pp. 463–75, Jun. 2005.
- [52] B. E. Leonard, “HPA and immune axes in stress: Involvement of the serotonergic system,” *Eur. PSYCH IATRY*, vol. 20, no. 3, pp. S302–S306, 2005.
- [53] R. Rosmond, “Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to Type 2 diabetes?,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 9, no. 2, p. RA35-A39, 2003.
- [54] R. M. Sapolsky, L. M. Romero, and A. U. Munck, “How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Preparative Actions *,” *Endocr. Rev.*, vol. 21, no. April, pp. 55–89, 2000.
- [55] T. M. O’Connor, D. J. O’Halloran, and F. Shanahan, “The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia,” *QJM*, vol. 93, no. 6, pp. 323–333, 2000.
- [56] E. Fries, J. Hesse, J. Hellhammer, and D. H. Hellhammer, “A new view on

- hypocortisolism,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 30, no. 10, pp. 1010–1016, 2005.
- [57] C. Heim, E. Ulrike, and D. H. Hellhammer, “The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related disorders,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 25, pp. 1–35, 2000.
- [58] T. C. Adam and E. S. Epel, “Stress, eating and the reward system,” *Physiol. Behav.*, vol. 91, no. 4, pp. 449–458, 2007.
- [59] S. Bhatnagar, M. E. Bell, J. Liang, L. Soriano, T. R. Nagy, and M. F. Dallman, “Corticosterone facilitates saccharin intake in adrenalectomized rats: Does corticosterone increase stimulus salience?,” *J. Neuroendocrinol.*, vol. 12, no. 5, pp. 453–460, 2000.
- [60] G. Riccardi, R. Giacco, and A. Rivellese, “Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome,” *Clin. Nutr.*, vol. 23, no. 4, pp. 447–456, 2004.
- [61] W. Katon, M. Von Korff, P. Ciechanowski, J. E. Russo, E. H. B. Lin, G. E. Simon, E. J. Ludman, E. Walker, T. Bush, and B. Young, “Behavioral and Clinical Factors,” *Diabetes Care*, vol. 27, no. 4, pp. 914–920, 2004.
- [62] K. M. Scott, R. Bruffaerts, G. E. Simon, J. Alonso, M. Angermeyer, G. de Girolamo, K. Demyttenaere, I. Gasquet, J. M. Haro, E. Karam, R. C. Kessler, D. Levinson, M. E. Medina Mora, M. A. Oakley Browne, J. Ormel, J. P. Villa, H. Uda, and M. Von Korff, “Obesity and mental disorders in the general population: results from the world mental health surveys,” *Int. J. Obes.*, vol. 32, no. 1, pp. 192–200, 2008.
- [63] M. Kivimäki, G. D. Batty, A. Singh-Manoux, H. Nabi, S. Sabia, A. G. Tabak, T. N. Akbaraly, J. Vahtera, M. G. Marmot, and M. Jokela, “Association between common mental disorder and obesity over the adult life course,” *Br. J. Psychiatry*, vol. 195, no. 2, pp. 149–155, 2009.
- [64] A. D. McNeilly, C. A. Stewart, C. Sutherland, and D. J. K. Balfour, “High fat feeding is associated with stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and reduced anxiety in the rat,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 52, pp. 272–280, 2015.
- [65] D. J. Wallis and M. M. Hetherington, “Stress and eating: The effects of ego-threat and cognitive demand on food intake in restrained and emotional eaters,” *Appetite*, vol. 43, no. 1, pp. 39–46, 2004.
- [66] D. J. Wallis and M. M. Hetherington, “Emotions and eating. Self-reported and experimentally induced changes in food intake under stress,” *Appetite*, vol. 52, no. 2, pp. 355–362, 2009.
- [67] J. D. Royal and J. L. Kurtz, “I ate what?! The effect of stress and dispositional eating style on food intake and behavioral awareness,” *Pers. Individ. Dif.*, vol. 49, no. 6, pp. 565–569, 2010.
- [68] N. Garg, B. Wansink, and J. J. Inman, “The Influence of Incidental Affect on Consumers’ Food Intake,” *J. Mark.*, vol. 71, no. 1, pp. 194–206, 2007.

- [69] G. Garipey, D. Nitka, and N. Schmitz, “The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis.,” *Int. J. Obes. (Lond).*, vol. 34, no. 3, pp. 407–419, 2010.
- [70] R. J. Anderson, K. E. Freedland, R. E. Clouse, and P. J. Lustman, “The Prevalence of Comorbid Depression in Adults With Diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 24, no. 6, 2001.
- [71] F. S. Luppino, L. M. de Wit, P. F. Bouvy, T. Stijnen, P. Cuijpers, B. W. J. H. Penninx, and F. G. Zitman, “Overweight, Obesity, and Depression: A Systematic Review and Meta-analysis of Longitudinal Studies,” *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 67, no. 3, pp. e442-229, 2010.
- [72] Y. M. Ulrich-Lai and K. K. Ryan, “Neuroendocrine circuits governing energy balance and stress regulation: functional overlap and therapeutic implications.,” *Cell Metab.*, vol. 19, no. 6, pp. 910–25, Jun. 2014.
- [73] L. Gautron and J. K. Elmquist, “Sixteen years and counting: An update on leptin in energy balance,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, no. 6. pp. 2087–2093, 2011.
- [74] B. K. Anand and J. R. Brobeck, “Hypothalamic control of food intake in rats and cats.,” *Yale J. Biol. Med.*, vol. 24, no. 2, pp. 123–40, Nov. 1951.
- [75] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman, “Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.,” *Nature*, vol. 372, no. 6505, pp. 425–32, Dec. 1994.
- [76] L. a Campfield, F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, and P. Burn, “Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.,” *Science*, vol. 269, no. 5223, pp. 546–549, 1995.
- [77] M. L. Heiman, R. S. Ahima, L. S. Craft, B. Schoner, T. W. Stephens, and J. S. Flier, “Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress,” *Endocrinology*, vol. 138, no. 9, pp. 3859–3863, 1997.
- [78] B. Laferrère, a. Caixas, S. K. Fried, C. Bashore, J. Kim, and F. X. Pi-Sunyer, “A pulse of insulin and dexamethasone stimulates serum leptin in fasting human subjects,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 146, no. 6, pp. 839–845, 2002.
- [79] J. Gibbs, R. C. Young, and G. P. Smith, “Cholecystokinin decreases food intake in rats. 1973.,” *Obes. Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 284–290, 1997.
- [80] H. J. Grill and M. R. Hayes, “Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance,” *Cell Metab.*, vol. 16, no. 3, pp. 296–309, 2012.
- [81] I. A. Odeniyi, O. A. Fasanmade, A. O. Ogbera, and A. E. Ohwovoriole, “Body mass index and its effect on serum cortisol level.,” *Niger. J. Clin. Pract.*, vol. 18, no. 2, pp. 194–7.
- [82] P. Björntorp and R. Rosmond, “Obesity and cortisol,” *Nutrition*, vol. 16, no. 10, pp.

- 924–936, 2000.
- [83] R. Rosmond and P. Björntorp, “The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity as a predictor of cardiovascular disease, type 2 diabetes and stroke,” *J. Intern. Med.*, vol. 247, no. 2, pp. 188–197, 2000.
- [84] A. Vegiopoulos and S. Herzig, “Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 275, no. 1–2, pp. 43–61, Sep. 2007.
- [85] H. Sakoda, T. Ogihara, M. Anai, M. Funaki, K. Inukai, H. Katagiri, Y. Fukushima, Y. Onishi, H. Ono, M. Fujishiro, M. Kikuchi, Y. Oka, and T. Asano, “Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction,” *Diabetes*, vol. 49, no. 10, pp. 1700–1708, 2000.
- [86] S. P. Weinstein, C. M. Wilson, A. Pritsker, and S. W. Cushman, “Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle,” *Metabolism*, vol. 47, no. 1, pp. 3–6, 1998.
- [87] J. Burén, Y. C. Lai, M. Lundgren, J. W. Eriksson, and J. Jensen, “Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 474, no. 1, pp. 91–101, 2008.
- [88] C. B. Djurhuus, C. H. Gravholt, S. Nielsen, a Mengel, J. S. Christiansen, O. E. Schmitz, and N. Møller, “Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 283, no. 1, pp. E172–E177, 2002.
- [89] C. Lambillotte, P. Gilon, and J. C. Henquin, “Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion,” *J. Clin. Invest.*, vol. 99, no. 3, pp. 414–423, 1997.
- [90] R. Patel, J. Williams-Dautovich, and C. L. Cummins, “Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 28, no. 7, pp. 999–1011, 2014.
- [91] G. P. Chrousos, “The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes,” *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, vol. 24 Suppl 2, pp. S50–S55, 2000.
- [92] T. C. Friedman, G. Mastorakos, T. D. Newman, N. M. Mullen, E. G. Horton, R. Costello, N. M. Papadopoulos, and G. P. Chrousos, “Carbohydrate and lipid metabolism in endogenous hypercortisolism: shared features with metabolic syndrome X and NIDDM,” *Endocr. J.*, vol. 43, no. 6, pp. 645–655, 1996.
- [93] C. Hryhorczuk, S. Sharma, and S. E. Fulton, “Metabolic disturbances connecting obesity and depression,” *Front. Neurosci.*, vol. 7, no. 7 OCT, pp. 1–14, 2013.
- [94] A. Agha and J. P. Monson, “Modulation of glucocorticoid metabolism by the growth hormone - IGF-1 axis,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 66, no. 4, pp. 459–465, 2007.

- [95] D. H. Van Raalte, D. M. Ouwens, and M. Diamant, “Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: Towards expansion of therapeutic options?,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 39, no. 2, pp. 81–93, 2009.
- [96] R. Pivonello, M. De Leo, P. Vitale, A. Cozzolino, C. Simeoli, M. C. De Martino, G. Lombardi, and A. Colao, “Pathophysiology of diabetes mellitus in Cushing’s syndrome,” *Neuroendocrinology*, vol. 92, no. SUPPL. 1, pp. 77–81, 2010.
- [97] H. L. Jaffe, “The Influence of The Suprarenal Gland on The Thymus,” *J. Exp. Med.*, vol. 40, no. 5, pp. 619–625, 1924.
- [98] S. Szabo, Y. Tache, and A. Somogyi, “The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature.,” *Stress*, vol. 15, no. 5, pp. 472–8, Sep. 2012.
- [99] M. N. Silverman, B. D. Pearce, C. A. Biron, and A. H. Miller, “Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection.,” *Viral Immunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 41–78, 2005.
- [100] S. E. Besedovsky H, “Network of immune-neuroendocrine interactions,” *Clin Exp Immunol*, vol. 27, no. 1, pp. 1–12, 1977.
- [101] G. P. Chrousos, “The hypothalamic–pituitary– adrenal axis and immune-mediated inflammation,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 20, pp. 638–644, 1995.
- [102] G. P. Chrousos, “Stressors, Stress, and Neuroendocrine Integration of the Adaptive Response,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, pp. 311–35, 1998.
- [103] E. M. Sternberg, “Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens,” *Nat Rev Immunol.*, vol. 6, no. 4, pp. 318–328, 2007.
- [104] A. V Turnbull and C. L. Rivier, “Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action.,” *Physiol. Rev.*, vol. 79, no. 1, pp. 1–71, 1999.
- [105] S. Akira, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, “Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF).,” *FASEB J.*, vol. 4, no. 11, pp. 2860–7, 1990.
- [106] G. P. C. Dimitris A. Papanicolaou, Ronald L. Wilder, Stavros C. Manolagas, “The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 128, no. 2, pp. 127–137, 1998.
- [107] R. L. Wilder, T. R. Cupps, J. E. Balow, P. Endocrinol-, D. E. Branch, H. Develop-, and G. Receptors, “Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: Basic and clinical correlates,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 119, no. 12, pp. 1198–1208, 1993.
- [108] J. C. Kam, S. J. Szeffler, W. Surs, E. R. Sher, and D. Y. Leung, “Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids,” *J. Immunol.*, vol. 151, no. 7, pp. 3460–3466, 1993.
- [109] A. J. Dunn, “Cytokine Activation of the HPA Axis,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 917,

- no. 1, pp. 608–617, 2000.
- [110] R. Dantzer, “Cytokine, Sickness Behaviour, and Depression,” *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, vol. 29, no. 2, pp. 247–264, 2009.
- [111] M. G. Swain, V. Patchev, J. Vergalla, G. Chrousos, and E. A. Jones, “Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to stress in a rat model of acute cholestasis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 91, no. 5, pp. 1903–1908, 1993.
- [112] C. M. Bamberger, A. M. Bamberger, M. De Castro, and G. P. Chrousos, “Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans,” *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 6, pp. 2435–2441, 1995.
- [113] J. W. Funder, “Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 48, no. 1, pp. 231–240, 1997.
- [114] L. A. Stechschulte, L. Wuescher, J. S. Marino, J. W. Hill, C. Eng, and T. D. Hinds, “Glucocorticoid receptor?? stimulates Akt1 growth pathway by attenuation of pten,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 25, pp. 17885–17894, 2014.
- [115] C. M. Bamberger, a. M. Bamberger, M. De Castro, and G. P. Chrousos, “Glucocorticoid receptor??, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans,” *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 6, pp. 2435–2441, 1995.
- [116] B. He, D. Cruz-topete, R. H. Oakley, X. Xiao, and A. Cidlowski, “Human Glucocorticoid Receptor ^u Regulates Gluconeogenesis and,” vol. 36, no. 5, pp. 714–730, 2016.
- [117] N. C. Nicolaides, Z. Galata, T. Kino, G. P. Chrousos, and E. Charmandari, “The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function,” *Steroids*, vol. 75, no. 1, pp. 1–12, 2010.
- [118] X. Zhao, H. Cho, R. T. Yu, A. R. Atkins, M. Downes, and R. M. Evans, “Nuclear receptors rock around the clock,” *EMBO Rep.*, vol. 15, no. 5, pp. 518–28, May 2014.
- [119] M. D. Heitzer, I. M. Wolf, E. R. Sanchez, S. F. Witchel, and D. B. DeFranco, “Glucocorticoid receptor physiology,” *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 8, no. 4, pp. 321–330, 2007.
- [120] D. J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R. M. Evans, “The nuclear receptor superfamily: the second decade,” *Cell*, vol. 83, pp. 835–839, 1995.
- [121] M. Robinson-Rechavi, A. S. Carpentier, M. Duffraisse, and V. Laudet, “How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?,” *Trends Genet.*, vol. 17, no. 10, pp. 554–556, 2001.
- [122] M. J. . Schaaf and J. A. Cidlowski, “Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 83, no. 1–5, pp. 37–48, 2002.
- [123] B. Wu, P. Li, Y. Liu, Z. Lou, Y. Ding, C. Shu, S. Ye, M. Bartlam, B. Shen, and Z.

- Rao, “3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 22, pp. 8348–53, 2004.
- [124] H. M. R. and G. François Tronche, Christoph Kellendonk, “Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, pp. 532–538, 1998.
- [125] T. J. Cole, K. Myles, J. F. Purton, P. S. Brereton, N. M. Solomon, D. I. Godfrey, and J. W. Funder, “GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 173, no. 1–2, pp. 193–202, 2001.
- [126] H. M. Reichardt, K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel, and G. Schütz, “DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival,” *Cell*, vol. 93, no. 4, pp. 531–541, 1998.
- [127] H. M. Reichardt, J. P. Tuckermann, M. Göttlicher, M. Vujic, F. Weih, P. Angel, P. Herrlich, and G. Schütz, “Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor,” *EMBO J.*, vol. 20, no. 24, pp. 7168–7173, 2002.
- [128] M. Löwenberg, C. Stahn, D. W. Hommes, and F. Buttgerit, “Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands,” *Steroids*, vol. 73, no. 9–10, pp. 1025–1029, 2008.
- [129] M. Orchinik, L. Matthews, and P. J. Gasser, “Distinct specificity for corticosteroid binding sites in amphibian cytosol, neuronal membranes, and plasma.,” *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 118, no. 2, pp. 284–301, 2000.
- [130] C. Stahn and F. Buttgerit, “Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids,” *Nat Clin Pr. Rheumatol*, vol. 4, no. 10, pp. 525–533, 2008.
- [131] C. M. Bamberger and H. M. Schulte, “Molecular mechanisms of dissociative glucocorticoid activity.,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 30 Suppl 3, pp. 6–9, 2000.
- [132] R. H. Oakley and J. a Cidlowski, “The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease.,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 132, no. 5, pp. 1033–44, Nov. 2013.
- [133] M.-J. Lee and S. K. Fried, “The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes.,” *Int. J. Obes.*, vol. 38, no. 9, pp. 1228–33, Sep. 2014.
- [134] P. J. Fuller, S. S. Lim-Tio, and F. E. Brennan, “Specificity in mineralocorticoid versus glucocorticoid action,” *Kidney Int.*, vol. 57, no. 4, pp. 1256–1264, 2000.
- [135] P. J. Fuller, “Novel interactions of the mineralocorticoid receptor,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 408, pp. 33–37, 2015.
- [136] A. Odermatt and D. V. Kratschmar, “Tissue-specific modulation of

- mineralocorticoid receptor function by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: An overview,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 350, no. 2, pp. 168–186, 2012.
- [137] M. Caprio, B. Fève, A. Claës, S. Viengchareun, M. Lombès, and M.-C. Zennaro, “Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis.,” *FASEB J.*, vol. 21, no. 9, pp. 2185–2194, 2007.
- [138] M. C. Zennaro, M. Caprio, and B. Fève, “Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 20, no. 9, pp. 444–451, 2009.
- [139] A. Hirata, N. Maeda, H. Nakatsuji, A. Hiuge-Shimizu, T. Okada, T. Funahashi, and I. Shimomura, “Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 419, no. 2, pp. 182–187, 2012.
- [140] C. Mammi, V. Marzolla, A. Armani, A. Feraco, A. Antelmi, E. Maslak, S. Chlopicki, H. Hunt, A. Fabbri, and M. Caprio, “A novel combined glucocorticoid-mineralocorticoid receptor selective modulator markedly prevents weight gain and fat mass expansion in mice fed a high-fat diet,” *Int. J. Obes.*, no. November 2015, pp. 1–9, 2016.
- [141] O. J. L. M. Schoneveld, I. C. Gaemers, and W. H. Lamers, “Mechanisms of glucocorticoid signalling,” *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, vol. 1680, no. 2, pp. 114–128, 2004.
- [142] A. Alangari, “Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma.,” *Ann. Thorac. Med.*, vol. 5, no. 3, pp. 133–139, 2010.
- [143] C. M. Spies, C. Strehl, M. C. van der Goes, J. W. J. Bijlsma, and F. Buttgerit, “Glucocorticoids.,” *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 25, no. 6, pp. 891–900, Dec. 2011.
- [144] D. Duma, C. M. Jewell, and J. a. Cidlowski, “Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 102, no. 1–5 SPEC. ISS., pp. 11–21, 2006.
- [145] T. J. Cole, J. A. Blendy, A. P. Monaghan, W. Schmid, A. Aguzzi, and G. Schütz, “Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development.,” *Steroids*, vol. 60, no. 1, pp. 93–6, 1995.
- [146] N. Z. Lu and J. a Cidlowski, “Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity.,” *Trends Cell Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 301–7, Jun. 2006.
- [147] W. Y. Almawi and O. K. Melemedjian, “Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor.,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 71, no. 1, pp. 9–15, 2002.
- [148] A. a Alangari, “Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma.,” *Ann. Thorac. Med.*, vol. 5, no. 3, pp. 133–139, 2010.
- [149] E. Falkenstein, A. W. Norman, and M. Wehling, “Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s),” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol.

- 85, no. 5, pp. 2072–2075, 2000.
- [150] C. Stahn, M. Löwenberg, D. W. Hommes, and F. Buttgerit, “Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 275, no. 1–2, pp. 71–78, 2007.
- [151] C. Stellato, “Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids.,” *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 1, no. 11, pp. 255–263, 2004.
- [152] J. Haller, É. Mikics, and G. B. Makara, “The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings,” *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 29, no. 2, pp. 273–291, 2008.
- [153] S. Bruscoli, R. Di Virgilio, V. Donato, E. Velardi, M. Baldoni, C. Marchetti, G. Migliorati, and C. Riccardi, “Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 529, no. 1–3, pp. 63–70, 2006.
- [154] A. R. Clark, “Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 275, no. 1–2, pp. 79–97, Oct. 2007.
- [155] R. Newton and N. S. Holden, “Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor?,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 72, no. 4, pp. 799–809, Oct. 2007.
- [156] E. Ayroldi, L. Cannarile, G. Migliorati, G. Nocentini, D. V. Delfino, and C. Riccardi, “Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways,” *FASEB J.*, vol. 26, no. 12, pp. 4805–4820, 2012.
- [157] P. J. Barnes, “How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005.,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 148, no. 3, pp. 245–54, Jun. 2006.
- [158] M. Löwenberg, A. P. Verhaar, G. R. van den Brink, and D. W. Hommes, “Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression.,” *Trends Mol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 158–63, Apr. 2007.
- [159] Roger Ekins, “The Free Hormone Hypothesis and Measurement of Free Hormones,” *Clin. Chem.*, vol. 38, no. 7, pp. 1289–1293, 1992.
- [160] J. D. Faix, “Principles and pitfalls of free hormone measurements,” *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 27, no. 5, pp. 631–645, 2013.
- [161] G. L. Hammond, “Potential functions of plasma steroid-binding proteins.,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 6, no. 9–10, pp. 298–304, 1995.
- [162] C. W. Breuner and M. Orchinik, “Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates,” *J. Endocrinol.*, vol. 175, no. 1, pp. 99–112, 2002.
- [163] D. E. Henley and S. L. Lightman, “New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery.,” *Neuroscience*, vol. 180, pp. 1–8, Apr. 2011.

- [164] G. Cizza and K. I. Rother, "Cortisol binding globulin: more than just a carrier?," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 1, pp. 77–80, Jan. 2012.
- [165] I. Perogamvros, D. W. Ray, and P. J. Trainer, "Regulation of cortisol bioavailability--effects on hormone measurement and action.," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 8, no. 12, pp. 717–27, Dec. 2012.
- [166] G. L. Hammond, C. L. Smith, I. S. Goping, D. A. Underhill, M. J. Harley, J. Reventos, N. A. Musto, G. L. Gunsalus, and C. W. Bardin, "Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 15, pp. 5153–5157, 1987.
- [167] T. Chung, K. Gunganah, J. P. Monson, and W. M. Drake, "Circadian variation in serum cortisol during hydrocortisone replacement is not attributable to changes in cortisol binding globulin concentrations," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, p. n/a-n/a, 2015.
- [168] H.-Y. Lin, Y. a Muller, and G. L. Hammond, "Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, no. 1, pp. 3–12, 2010.
- [169] M.-P. Moisan, "Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, no. 1, pp. 35–41, Mar. 2010.
- [170] J. Heo, H. G. Kattesh, M. P. Roberts, and J. F. Schneider, "Plasma levels of cortisol and corticosteroid-binding globulin (CBG) and hepatic CBG mRNA expression in pre- and postnatal pigs," *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 25, no. 3, pp. 263–273, 2003.
- [171] L. A. Scrocchi, S. A. Hearn, V. K. Han, and G. L. Hammond, "Corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the mouse liver and kidney during postnatal development.," *Endocrinology*, vol. 132, no. 2, pp. 910–916, Feb. 1993.
- [172] L. A. Scrocchi, M. Orava, C. L. Smith, V. K. Han, and G. L. Hammond, "Spatial and temporal distribution of corticosteroid-binding globulin and its messenger ribonucleic acid in embryonic and fetal mice.," *Endocrinology*, vol. 132, no. 2, pp. 903–9, Feb. 1993.
- [173] H. Schäfer, V. Gebhart, K. Hertel, and G. Jirikowski, "Expression of Corticosteroid-Binding Globulin CBG in the Human Heart," *Horm. Metab. Res.*, vol. 47, no. 8, pp. 596–599, 2014.
- [174] G. F. Jirikowski, L. Pusch, B. Möpert, Z. Herbert, and J. D. Caldwell, "Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system," *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 34, no. 1, pp. 22–28, 2007.
- [175] M. del Mar Grasa, C. Cabot, C. Adán, R. de Matteis, M. Esteve, S. Cinti, J. A. Fernández-López, X. Remesar, and M. Alemany, "Corticosteroid-binding globulin synthesis and distribution in rat white adipose tissue," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 228, no. 1–2, pp. 25–31, 2001.

- [176] S. A. Krupenko, G. V Avvakumov, and O. A. Strel'chyonok, "A transcortin-binding protein in the plasma membrane of human syncytiotrophoblast.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 177, no. 2, pp. 834–9, Jun. 1991.
- [177] B. Möpert, Z. Herbert, J. D. Caldwell, and G. F. Jirikowski, "Expression of corticosterone-binding globulin in the rat hypothalamus.," *Horm. Metab. Res.*, vol. 38, no. 4, pp. 246–52, Apr. 2006.
- [178] J. Predine, S. Brailly, P. Delaporte, and E. Milgrom, "Protein binding of cortisol in human cerebrospinal fluid.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 58, no. 1, pp. 6–11, Jan. 1984.
- [179] E. Sivukhina, J.-C. Helbling, A. M. Minni, H. H. Schäfer, V. Pallet, G. F. Jirikowski, and M.-P. Moisan, "Intrinsic expression of transcortin in neural cells of the mouse brain: a histochemical and molecular study.," *J. Exp. Biol.*, vol. 216, no. Pt 2, pp. 245–52, Jan. 2013.
- [180] D. J. Hryb, M. S. Khan, N. a Romas, and W. Rosner, "Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. May, pp. 3253–3256, 1986.
- [181] F. Hamel and G. Bellemare, "Organization of the transcortin-binding domain on placental plasma membranes," vol. 1263, pp. 212–220, 1995.
- [182] G. V Avvakumov, "Structure and function of corticosteroid-binding globulin: role of carbohydrates," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 53, no. 1–6, pp. 515–522, 1995.
- [183] J. R. G. Challis, E. T. M. Berdusco, T. M. Jeffray, K. Yang, and G. L. Hammond, "Corticosteroid-binding globulin (CBG) in fetal development," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 53, no. 1–6, pp. 523–527, 1995.
- [184] M. A. Klieber, C. Underhill, G. L. Hammond, and Y. a Muller, "Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 40, pp. 29594–603, Oct. 2007.
- [185] W. L. Chan, R. W. Carrell, A. Zhou, and R. J. Read, "How changes in affinity of corticosteroid-binding globulin modulate free cortisol concentration," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 8, pp. 3315–3322, 2013.
- [186] A. Cameron, D. Henley, R. Carrell, A. Zhou, A. Clarke, and S. Lightman, "Temperature-responsive release of cortisol from its binding globulin: A protein thermocouple," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 10, pp. 4689–4695, 2010.
- [187] A. Zhou, Z. Wei, P. L. D. Stanley, R. J. Read, P. E. Stein, and R. W. Carrell, "The S-to-R Transition of Corticosteroid-Binding Globulin and the Mechanism of Hormone Release," *J. Mol. Biol.*, vol. 380, no. 1, pp. 244–51, Jun. 2008.
- [188] M. A. Nenke, W. Rankin, M. J. Chapman, N. E. Stevens, K. R. Diener, J. D. Hayball, J. G. Lewis, and D. J. Torpy, "Depletion of high-affinity corticosteroid-binding globulin corresponds to illness severity in sepsis and septic shock; clinical implications.," *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 82, no. 6, pp. 801–7, Jun. 2015.

- [189] X. Qi, F. Loiseau, W. L. Chan, Y. Yan, Z. Wei, L. G. Milroy, R. M. Myers, S. V. Ley, R. J. Read, R. W. Carrell, and A. Zhou, “Allosteric modulation of hormone release from thyroxine and corticosteroid-binding globulins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 18, pp. 16163–16173, 2011.
- [190] Y. J. Bae and J. Kratzsch, “Corticosteroid-binding globulin: Modulating mechanisms of bioavailability of cortisol and its clinical implications,” *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 29, no. 5, pp. 761–772, 2015.
- [191] T. G. Brien, “Human corticosteroid binding globulin.,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 14, no. 1973, pp. 193–212, 1981.
- [192] S. D. Stroupe, R. D. Gray, and U. Westphal, “Steroid-Protein Interactions: Kinetics of binding of cortisol and progesterone to human corticosteroid-binding globulin,” *FEBS Lett.*, vol. 86, no. 1, pp. 1–4, 1978.
- [193] T. J. Cole, H. J. Harris, I. Hoong, N. Solomon, R. Smith, Z. Krozowski, and M. J. Fullerton, “The glucocorticoid receptor is essential for maintaining basal and dexamethasone-induced repression of the murine corticosteroid-binding globulin gene,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 154, no. 1–2, pp. 29–36, 1999.
- [194] J. G. Lewis, B. Möpert, B. I. Shand, M. P. Doogue, S. G. Soule, C. M. Frampton, and P. a Elder, “Plasma variation of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin.,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 38, no. 4, pp. 241–5, Apr. 2006.
- [195] J. M. Fernández-Real, M. Grasa, R. Casamitjana, M. Pugeat, C. Barret, and W. Ricart, “Plasma total and glycosylated corticosteroid-binding globulin levels are associated with insulin secretion.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 84, no. 9, pp. 3192–6, 1999.
- [196] A. Tinnikov, “Responses of serum corticosterone and corticosteroid-binding globulin to acute and prolonged stress in the rat.,” *Endocrine*, vol. 11, no. 2, pp. 145–150, 1999.
- [197] M. del M. Romero, F. Holmgren-Holm, M. del M. Grasa, M. Esteve, X. Remesar, J. A. Fernández-López, and M. Alemany, “Modulation in Wistar rats of blood corticosterone compartmentation by sex and a cafeteria diet.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e57342, Jan. 2013.
- [198] J. G. Lewis, B. I. Shand, P. a Elder, and R. S. Scott, “Plasma sex hormone-binding globulin rather than corticosteroid-binding globulin is a marker of insulin resistance in obese adult males.,” *Diabetes. Obes. Metab.*, vol. 6, no. 4, pp. 259–63, 2004.
- [199] J.-M. Fernandez-Real, M. Pugeat, A. López-Bermejo, H. Bornet, and W. Ricart, “Corticosteroid-binding globulin affects the relationship between circulating adiponectin and cortisol in men and women.,” *Metabolism.*, vol. 54, no. 5, pp. 584–9, May 2005.
- [200] J. M. Adams, V. Otero-Corchon, G. L. Hammond, J. D. Veldhuis, N. Qi, and M. J. Low, “Somatostatin Is Essential for the Sexual Dimorphism of GH Secretion, Corticosteroid-Binding Globulin Production, and Corticosterone Levels in Mice,”

- Endocrinology*, vol. 156, no. 3, pp. 1052–1065, 2015.
- [201] R. H. P. Law, Q. Zhang, S. McGowan, A. M. Buckle, G. a Silverman, W. Wong, C. J. Rosado, C. G. Langendorf, R. N. Pike, P. I. Bird, and J. C. Whisstock, “An overview of the serpin superfamily.,” *Genome Biol.*, vol. 7, no. 5, p. 216, 2006.
- [202] E. Meyer, M. Nenke, W. Rankin, J. Lewis, and D. Torpy, “Corticosteroid-Binding Globulin: A Review of Basic and Clinical Advances,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 48, no. 6, pp. 359–371, May 2016.
- [203] M. Simard, L. A. Hill, J. G. Lewis, and G. L. Hammond, “Naturally occurring mutations of human corticosteroid-binding globulin,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 1, pp. E129–E139, 2015.
- [204] D. J. Torpy and J. T. Ho, “Corticosteroid-binding globulin gene polymorphisms: clinical implications and links to idiopathic chronic fatigue disorders.,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 67, no. 2, pp. 161–7, Aug. 2007.
- [205] L. Gagliardi, J. T. Ho, and D. J. Torpy, “Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations.,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, no. 1, pp. 24–34, Mar. 2010.
- [206] M. Simard, L. A. Hill, J. G. Lewis, and G. L. Hammond, “Naturally occurring mutations of human corticosteroid-binding globulin.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 1, pp. E129-39, Jan. 2015.
- [207] C. L. Smith and G. L. Hammond, “An amino acid substitution in biobreeding rat corticosteroid binding globulin results in reduced steroid binding affinity,” *J Biol Chem*, vol. 266, no. 28, pp. 18555–18559, 1991.
- [208] D. J. Torpy, A. W. Bachmann, J. E. Grice, S. P. Fitzgerald, P. J. Phillips, J. A. Whitworth, and R. V Jackson, “Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 8, pp. 3692–700, Aug. 2001.
- [209] G. Cizza, L. Bernardi, N. Smirne, R. Maletta, C. Tomaino, A. Costanzo, M. Gallo, J. G. Lewis, S. Geracitano, M. B. Grasso, G. Potenza, C. Monteleone, G. Brancati, J. T. Ho, D. J. Torpy, and A. C. Bruni, “Clinical manifestations of highly prevalent corticosteroid-binding globulin mutations in a village in southern Italy.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 10, pp. E1684-93, Oct. 2011.
- [210] H.-Y. Lin, C. Underhill, J.-H. Lei, A. Helander-Claesson, H.-Y. Lee, B. R. Gardill, Y. A. Muller, H. Wang, and G. L. Hammond, “High frequency of SERPINA6 polymorphisms that reduce plasma corticosteroid-binding globulin activity in Chinese subjects.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 4, pp. E678-86, Apr. 2012.
- [211] D. J. Torpy, B. A. Lundgren, J. T. Ho, J. G. Lewis, H. S. Scott, and V. Mericq, “CBG Santiago: a novel CBG mutation.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 1, pp. E151-5, Jan. 2012.
- [212] H. Van Baelen, R. Brepoels, and P. De Moor, “Transcortin Leuven: A variant of

- human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol-binding affinity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 7, pp. 3397–3400, 1982.
- [213] H. Van Baelen, S. G. Power, and G. L. Hammond, “Decreased cortisol-binding affinity of transcortin Leuven is associated with an amino acid substitution at residue-93.,” *Steroids*, vol. 58, no. 6, pp. 275–7, Jun. 1993.
- [214] C. L. Smith, S. G. Power, and G. L. Hammond, “A Leu---His substitution at residue 93 in human corticosteroid binding globulin results in reduced affinity for cortisol.,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 42, no. 7, pp. 671–6, Aug. 1992.
- [215] A. Emptoz-Bonneton, P. Cousin, K. Seguchi, G. V. Avvakumov, C. Bully, G. L. Hammond, and M. Pugeat, “Novel human corticosteroid-binding globulin variant with low cortisol-binding affinity,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 1, pp. 361–367, 2000.
- [216] E. Brunner, J. Baima, T. C. Vieira, J. G. H. Vieira, and J. Abucham, “Hereditary corticosteroid-binding globulin deficiency due to a missense mutation (Asp367Asn, CBG Lyon) in a Brazilian kindred.,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 58, no. 6, pp. 756–62, Jun. 2003.
- [217] I. Perogamvros, C. Underhill, D. E. Henley, K. D. Hadfield, W. G. Newman, D. W. Ray, S. L. Lightman, G. L. Hammond, and P. J. Trainer, “Novel corticosteroid-binding globulin variant that lacks steroid binding activity.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 10, pp. E142-50, Oct. 2010.
- [218] L. A. Hill, D. A. Vassiliadi, M. Simard, A. Pavlaki, I. Perogamvros, D. Hadjidakis, and G. L. Hammond, “Two different corticosteroid-binding globulin variants that lack cortisol-binding activity in a greek woman.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 11, pp. 4260–7, Nov. 2012.
- [219] H.-Y. Lin, C. Underhill, B. R. Gardill, Y. a Muller, and G. L. Hammond, “Residues in the human corticosteroid-binding globulin reactive center loop that influence steroid binding before and after elastase cleavage.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 2, pp. 884–96, Jan. 2009.
- [220] H. H. Petersen, T. K. Andreassen, T. Breiderhoff, J. H. Brasen, H. Schulz, V. Gross, H.-J. Grone, A. Nykjaer, and T. E. Willnow, “Hyporesponsiveness to Glucocorticoids in Mice Genetically Deficient for the Corticosteroid Binding Globulin,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 19, pp. 7236–7245, 2006.
- [221] E. M. Richard, J. C. Helbling, C. Tridon, A. Desmedt, A. M. Minni, M. Cador, L. Pourtau, J. P. Konsman, P. Mormède, and M. P. Moisan, “Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice,” *Endocrinology*, vol. 151, no. 2, pp. 649–659, 2010.
- [222] F. Hamel and G. Bellemare, “Organization of the transcortin-binding domain on placental plasma membranes,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1235, no. 2, pp. 387–394, 1995.
- [223] L. Savu and C. Lombart, “Corticosterone binding globulin: an acute phase ‘negative’ protein in the rat,” *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, vol. 113, no. 1, pp. 102–106,

- 1980.
- [224] A. Emptoz-Bonneton, J. C. Crave, H. LeJeune, C. Brébant, M. Pugeat, and C. Brébant, “Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 82, no. 11, pp. 3758–3762, 1997.
- [225] A. Beishuizen, L. G. Thijs, and I. Vermes, “Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma,” *Intensive Care Med.*, vol. 27, no. 10, pp. 1584–91, 2001.
- [226] C. A. Muller, M. Vogeser, O. Belyaev, B. Gloor, O. Strobel, D. Weyhe, J. Werner, A. Borgstrom, M. W. Buchler, and W. Uhl, “Role of endogenous glucocorticoid metabolism in human acute pancreatitis,” *Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 4, pp. 1060–6, Apr. 2006.
- [227] C. A. Muller, O. Belyaev, M. Vogeser, D. Weyhe, B. Gloor, O. Strobel, J. Werner, A. Borgstrom, M. W. Buchler, and W. Uhl, “Corticosteroid-binding globulin: a possible early predictor of infection in acute necrotizing pancreatitis,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 42, no. 11, pp. 1354–61, Nov. 2007.
- [228] J. M. Fernández-Real, M. Pugeat, A. Emptoz-Bonneton, and W. Ricart, “Study of the effect of changing glucose, insulin, and insulin-like growth factor-I levels on serum corticosteroid binding globulin in lean, obese, and obese subjects with glucose intolerance,” *Metabolism.*, vol. 50, no. 10, pp. 1248–52, Oct. 2001.
- [229] J.-M. Fernandez-Real, M. Pugeat, M. Grasa, M. Broch, J. Vendrell, J. Brun, and W. Ricart, “Serum corticosteroid-binding globulin concentration and insulin resistance syndrome: a population study,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 10, pp. 4686–90, Oct. 2002.
- [230] M. A. Nenke, J. G. Lewis, W. Rankin, and D. J. Torpy, “Evidence of Reduced CBG Cleavage in Abdominal Obesity: A Potential Factor in Development of the Metabolic Syndrome,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 48, no. 8, pp. 523–8, Aug. 2016.
- [231] K. E. Chapman, A. E. Coutinho, Z. Zhang, T. Kipari, J. S. Savill, and J. R. Seckl, “Changing glucocorticoid action: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 137, pp. 82–92, 2013.
- [232] K. Chapman, M. Holmes, and J. Seckl, “11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action,” *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 3, pp. 1139–206, Jul. 2013.
- [233] M. Wamil and J. R. Seckl, “Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target,” *Drug Discov. Today*, vol. 12, no. July, pp. 504–520, 2007.
- [234] P. M. Jamieson, B. R. Walker, K. E. Chapman, R. Andrew, S. Rossiter, and J. R. Seckl, “11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Is a Predominant 11 Beta-Reductase in the Intact Perfused Rat Liver,” *J. Endocrinol.*, vol. 165, no. 3, pp. 685–92, 2000.

- [235] S. Diederich, E. Eigendorff, P. Burkhardt, M. Quinkler, C. Bumke-Vogt, M. Rochel, D. Seidelmann, P. Esperling, W. Oelkers, and V. Bähr, "11Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Types 1 and 2: an Important Pharmacokinetic Determinant for the Activity of Synthetic Mineralo- and Glucocorticoids.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 12, pp. 5695–701, 2002.
- [236] J. R. Seckl, "11b-hydroxysteroid dehydrogenases: Changing glucocorticoid action," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 4, pp. 597–602, 2004.
- [237] R. Andrew, K. Smith, G. C. Jones, and B. R. Walker, "Distinguishing the activities of 11b-hydroxysteroid dehydrogenases in vivo using isotopically labeled cortisol," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 1, pp. 277–285, 2002.
- [238] C. L. Cope and Black E, "The production rate of cortisol in man.," *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 5078, pp. 1020–1024, 1958.
- [239] E. Maser, B. Völker, and J. Friebertshäuser, "11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: Dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase," *Biochemistry*, vol. 41, pp. 2459–2465, 2002.
- [240] K. N. Hewitt, E. a Walker, and P. M. Stewart, "Minireview: hexose-6-phosphate dehydrogenase and redox control of 11 {beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity.," *Endocrinology*, vol. 146, no. 6, pp. 2539–2543, 2005.
- [241] J. R. Seckl and B. R. Walker, "11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a modulator of glucocorticoid action: From metabolism to memory," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 15, no. 9, pp. 418–424, 2004.
- [242] H. Masuzaki, J. Paterson, H. Shinyama, N. M. Morton, J. J. Mullins, J. R. Seckl, and J. S. Flier, "A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome.," *Science*, vol. 294, no. 5549, pp. 2166–70, Dec. 2001.
- [243] J. M. Paterson, N. M. Morton, C. Fievet, C. J. Kenyon, M. C. Holmes, B. Staels, J. R. Seckl, and J. J. Mullins, "Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, pp. 7088–7093, 2004.
- [244] S. A. Morgan, E. L. McCabe, L. L. Gathercole, Z. K. Hassan-Smith, D. P. Lerner, I. J. Bujalska, P. M. Stewart, J. W. Tomlinson, and G. G. Lavery, "11 β -HSD1 is the major regulator of the tissue-specific effects of circulating glucocorticoid excess.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 24, pp. E2482-91, 2014.
- [245] G. E. N. Hirasawa, J. Takeyama, H. Sasano, T. Toyota, H. Nagura, and Z. S. Krozowski, "Mineralocorticoid Receptor in Human Placenta," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 3, pp. 1306–1309, 2000.
- [246] R. E. Smith, "Immunohistochemical and Molecular Characterization of the Rat 11 - Hydroxysteroid Dehydrogenase Type II Enzyme," *Endocrinology*, vol. 138, no. 2, pp. 540–547, 1997.
- [247] N. Farman and M. E. Rafestin-Oblin, "Multiple aspects of mineralocorticoid

- selectivity.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 280, no. 2, pp. F181–F192, 2001.
- [248] D. Ackermann, N. Gresko, M. Carrel, D. Loffing-Cueni, D. Habermehl, C. Gomez-Sanchez, B. C. Rossier, and J. Loffing, "In vivo nuclear translocation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat kidney: differential effect of corticosteroids along the distal tubule.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 299, no. 6, pp. F1473-85, 2010.
- [249] L. J. Mullins, C. J. Kenyon, M. A. Bailey, B. R. Conway, M. E. Diaz, and J. J. Mullins, "Mineralocorticoid Excess or Glucocorticoid Insufficiency: Renal and Metabolic Phenotypes in a Rat Hsd11b2 Knockout Model.," *Hypertension*, pp. 667–673, 2015.
- [250] F. Pizzolo, S. Friso, F. Morandini, F. Antoniazzi, C. Zaltron, S. Udali, A. Gandini, P. Cavarzere, G. Salvagno, A. Giorgetti, G. Speziali, S.-W. Choi, and O. Olivieri, "Apparent Mineralocorticoid Excess by a Novel Mutation and Epigenetic Modulation by HSD11B2 Promoter Methylation.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 9, pp. E1234-41, Sep. 2015.
- [251] M. Yau, H. S. Al Azkawi, S. Haider, A. Khattab, M. Al Badi, W. Abdullah, A. Al Senani, R. C. Wilson, T. Yuen, M. Zaidi, and M. I. New, "A novel mutation in HSD11B2 causes apparent mineralocorticoid excess in an Omani kindred.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1376, no. 1, pp. 65–71, Aug. 2016.
- [252] J. R. Manning, M. A. Bailey, D. C. Soares, D. R. Dunbar, and J. J. Mullins, "In silico structure-function analysis of pathological variation in the HSD11B2 gene sequence.," *Physiol. Genomics*, vol. 42, no. 3, pp. 319–330, 2010.
- [253] J. M. Apostolakos and L. C. Caines, "Apparent Mineralocorticoid Excess Syndrome: A Case of Resistant Hypertension From Licorice Tea Consumption.," *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*, Jun. 2016.
- [254] B. J. F. Robles, A. R. H. Sandoval, J. D. P. Dardon, and C. A. Blas, "Lethal liquorice lollies (liquorice abuse causing pseudohyperaldosteronism).," *BMJ Case Rep.*, vol. 2013, 2013.
- [255] J. W. Funder, "Apparent mineralocorticoid excess.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. March 5, Mar. 2016.
- [256] Y. Kotelevtsev, R. W. Brown, S. Fleming, C. Kenyon, C. R. Edwards, J. R. Seckl, and J. J. Mullins, "Hypertension in mice lacking 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2.," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 5, pp. 683–689, 1999.
- [257] A. Harris and J. Seckl, "Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease," *Horm. Behav.*, vol. 59, no. 3, pp. 279–289, 2011.
- [258] C. S. Wyrwoll, P. J. Mark, and B. J. Waddell, "Developmental programming of renal glucocorticoid sensitivity and the renin-angiotensin system.," *Hypertension*, vol. 50, no. 3, pp. 579–84, 2007.
- [259] J. A. Beck, S. Lloyd, M. Hafezparast, M. Lennon-Pierce, J. T. Eppig, M. F. W. Festing, and E. M. C. Fisher, "Genealogies of mouse inbred strains.," *Nat. Genet.*,

- vol. 24, no. january, pp. 23–25, 2000.
- [260] N. Matsuo, K. Takao, K. Nakanishi, N. Yamasaki, K. Tanda, and T. Miyakawa, “Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains.,” *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 4, no. June, p. 29, 2010.
- [261] K. Mekada, K. Abe, A. Murakami, S. Nakamura, H. Nakata, K. Moriwaki, Y. Obata, and A. Yoshiki, “Genetic differences among C57BL/6 substrains.,” *Exp. Anim.*, vol. 58, no. 2, pp. 141–149, 2009.
- [262] N. Wong, A. R. Blair, G. Morahan, and S. Andrikopoulos, “The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance,” *Endocrinology*, vol. 151, no. 1, pp. 96–102, 2010.
- [263] C. Podrini, E. L. Cambridge, C. J. Lelliott, D. M. Carragher, J. Estabel, A. K. Gerdin, N. A. Karp, C. L. Scudamore, R. Ramirez-Solis, and J. K. White, “High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice,” *Mamm. Genome*, vol. 24, no. 5–6, pp. 240–251, 2013.
- [264] C. Kiselycznyk and A. Holmes, “All (C57BL/6) mice are not created equal,” *Front. Neurosci.*, vol. 5, no. FEB, pp. 5–7, 2011.
- [265] T. G. Jacob, R. Raghav, A. Kumar, P. K. Garg, and T. S. Roy, “Duration of injury correlates with necrosis in caerulein-induced experimental acute pancreatitis: Implications for pathophysiology,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 95, no. 3, pp. 199–208, 2014.
- [266] C. M. Pastor, L. Rubbia-Brandt, A. Hadengue, M. Jordan, P. Morel, and J. L. Frossard, “Role of macrophage inflammatory peptide-2 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury.,” *Lab. Invest.*, vol. 83, no. 4, pp. 471–8, Apr. 2003.
- [267] B. Delehanty, S. Hossain, C. C. Jen, G. J. Crawshaw, and R. Boonstra, “Measurement of free glucocorticoids: quantifying corticosteroid-binding globulin binding affinity and its variation within and among mammalian species,” *Conserv. Physiol.*, vol. 3, p. cov020, 2015.
- [268] T. D. Pollard, “A guide to simple and informative binding assays.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 23, pp. 4061–4067, 2010.
- [269] N. Franco-Pons, S. Gea-Sorlí, and D. Closa, “Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis.,” *J. Pathol.*, vol. 221, no. 2, pp. 175–82, Jun. 2010.
- [270] T. Muniraj, S. Dang, and C. S. Pitchumoni, “PANCREATITIS OR NOT? - Elevated lipase and amylase in ICU patients,” *J. Crit. Care*, vol. 30, no. 6, pp. 1370–1375, 2015.
- [271] K. Patel, R. N. Trivedi, C. Durgampudi, P. Noel, R. A. Cline, J. P. Delany, S. Navina, and V. P. Singh, “Lipolysis of visceral adipocyte triglyceride by pancreatic lipases converts mild acute pancreatitis to severe pancreatitis independent of necrosis and inflammation,” *Am. J. Pathol.*, vol. 185, no. 3, pp. 808–819, 2015.

- [272] S. Tenner, J. Baillie, J. DeWitt, S. S. Vege, and G. American College of, “American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis,” *Am J Gastroenterol*, vol. 108, no. 9, p. 1400–15; 1416, 2013.
- [273] C. Yu, M. Merza, L. Luo, and H. Thorlacius, “Inhibition of Ras signalling reduces neutrophil infiltration and tissue damage in severe acute pancreatitis,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 746, pp. 245–251, 2014.
- [274] H. Hartman, E. Wetterholm, H. Thorlacius, and S. Regnér, “Histone Deacetylase Regulates Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Acute Pancreatitis in Mice,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 1, pp. 1284–1289, 2014.
- [275] S. Gea-Sorlí and D. Closa, “In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis,” *BMC Immunol.*, vol. 10, p. 42, 2009.
- [276] I. Buchwalow, V. Samoiloova, W. Boecker, and M. Tiemann, “Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts,” *Sci. Rep.*, vol. 1, pp. 1–6, 2011.
- [277] G. Bussolati and E. Leonardo, “Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 61, pp. 1184–1192, 2008.
- [278] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–82, 2012.
- [279] M. M. Altintas, A. Azad, B. Nayer, G. Contreras, J. Zaias, C. Faul, J. Reiser, and A. Nayer, “Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice,” *J. Lipid Res.*, vol. 52, no. 3, pp. 480–8, Mar. 2011.
- [280] G. W. Thorn, L. L. Engel, and H. Eisenberg, “The effect of corticosterone and related compounds on the renal excretion of electrolytes,” *J. Exp. Med.*, vol. 68, no. 2, pp. 161–71, Jul. 1938.
- [281] William H. Daughaday, “Binding of corticosteroids by plasma proteins. IV. The electrophoretic demonstration of Corticosteroid Binding Globulin,” *J Clin Invest.*, vol. 37, no. 4, pp. 519–523, 1958.
- [282] W. H. Daughaday, “Binding of corticosteroids by plasma proteins. I. Dialysis equilibrium and renal clearance studies,” *J. Clin. Invest.*, vol. 35, no. 12, pp. 1428–1433, Dec. 1956.
- [283] C. M. Mendel, “The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model,” *Endocr. Rev.*, vol. 10, no. 3, pp. 232–74, Aug. 1989.
- [284] J. G. Lewis, C. J. Bagley, P. a Elder, A. W. Bachmann, and D. J. Torpy, “Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 359, no. 1–2, pp. 189–94, Sep. 2005.

- [285] D. J. Hryb, M. S. Khan, N. a Romas, and W. Rosner, "Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 10, pp. 3253–3256, 1986.
- [286] M. Orchinik, N. Hastings, D. Witt, and B. S. McEwen, "High-affinity binding of corticosterone to mammalian neuronal membranes: possible role of corticosteroid binding globulin.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 60, no. 3–4, pp. 229–36, 1997.
- [287] H. Schäfer, V. Gebhart, K. Hertel, and G. Jirikowski, "Expression of Corticosteroid-Binding Globulin CBG in the Human Heart," *Horm. Metab. Res.*, pp. 596–599, 2014.
- [288] T. E. Willnow and A. Nykjaer, "Cellular uptake of steroid carrier proteins-Mechanisms and implications," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, no. 1, pp. 93–102, 2010.
- [289] P. Anagnostis, V. G. Athyros, K. Tziomalos, A. Karagiannis, and D. P. Mikhailidis, "The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: A hypothesis," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, no. 8, pp. 2692–2701, 2009.
- [290] M. del M. Grasa, M. Serrano, J. A. Fernández-López, and M. Alemany, "Corticosterone Inhibits the Lipid-Mobilizing Effects of Oleoyl-Estrone in Adrenalectomized Rats," *Endocrinology*, vol. 148, no. 8, pp. 4056–4063, Aug. 2007.
- [291] L. Devenport, A. Knehans, A. Sundstrom, and T. Thomas, "Corticosterone's dual metabolic actions.," *Life Sci.*, vol. 45, no. 15, pp. 1389–96, 1989.
- [292] J. L. Beaudry, A. M. D'souza, T. Teich, R. Tsushima, and M. C. Riddell, "Exogenous glucocorticoids and a high-fat diet cause severe hyperglycemia and hyperinsulinemia and limit islet glucose responsiveness in young male Sprague-Dawley rats," *Endocrinology*, vol. 154, no. 9, pp. 3197–3208, 2013.
- [293] S. E. la Fleur, "The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats," *Physiol. Behav.*, vol. 89, no. 1, pp. 110–114, Aug. 2006.
- [294] L. A. Hill, T. S. Bodnar, J. Weinberg, and G. L. Hammond, "Corticosteroid-binding globulin is a biomarker of inflammation onset and severity in female rats.," *J. Endocrinol.*, vol. 230, no. 2, pp. 215–25, Aug. 2016.
- [295] G. Wolf, "Glucocorticoids in adipocytes stimulate visceral obesity.," *Nutr. Rev.*, vol. 60, no. 5 Pt 1, pp. 148–51, May 2002.
- [296] S. J. Spencer and A. Tilbrook, "The glucocorticoid contribution to obesity.," *Stress*, vol. 14, no. 3, pp. 233–246, 2011.
- [297] M. I. Lefterova and M. a Lazar, "New developments in adipogenesis.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 107–14, Apr. 2009.
- [298] V. Elgazar-Carmon, A. Rudich, N. Hadad, and R. Levy, "Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding," *J. Lipid Res.*,

- vol. 49, no. 9, pp. 1894–1903, Mar. 2008.
- [299] V. Dam, T. Sikder, and S. Santosa, “From neutrophils to macrophages: differences in regional adipose tissue depots,” *Obes. Rev.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2016.
- [300] S. Talukdar, D. Y. Oh, G. Bandyopadhyay, D. Li, J. Xu, J. McNelis, M. Lu, P. Li, Q. Yan, Y. Zhu, J. Ofrecio, M. Lin, M. B. Brenner, and J. M. Olefsky, “Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase,” *Nat. Med.*, vol. 18, no. 9, pp. 1407–1412, Aug. 2012.
- [301] J. M. Busillo and J. a Cidlowski, “The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore.,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 24, no. 3, pp. 109–19, Mar. 2013.
- [302] E. Joanny, Q. Ding, L. Gong, P. Kong, J. Saklatvala, and A. R. Clark, “Anti-inflammatory effects of selective glucocorticoid receptor modulators are partially dependent on up-regulation of dual specificity phosphatase 1,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, no. 4 B, pp. 1124–1136, 2012.
- [303] P. J. Barnes, “Corticosteroid effects on cell signalling.,” *Eur. Respir. J.*, vol. 27, no. 2, pp. 413–26, Feb. 2006.
- [304] R. G. Baker, M. S. Hayden, and S. Ghosh, “NF- κ B, inflammation, and metabolic disease.,” *Cell Metab.*, vol. 13, no. 1, pp. 11–22, Jan. 2011.
- [305] K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, L. Vermeulen, S. Plaisance, E. Boone, and G. Haegeman, “Glucocorticoids repress NF-kappa B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 3919–3924, Apr. 2000.
- [306] N. a S. Rao, M. T. McCalman, P. Moulos, K.-J. Francoijs, A. Chatziioannou, F. N. Kolisis, M. N. Alexis, D. J. Mitsiou, and H. G. Stunnenberg, “Coactivation of GR and NFkB alters the repertoire of their binding sites and target genes.,” *Genome Res.*, vol. 21, no. 9, pp. 1404–16, Sep. 2011.
- [307] G. Talabér, M. Jondal, and S. Okret, “Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 380, no. 1–2, pp. 89–98, 2013.
- [308] W. Savino, D. A. Mendes-da-Cruz, A. Lepletier, and M. Dardenne, “Hormonal control of T-cell development in health and disease,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. xx, no. 2, p. xxx, 2015.
- [309] J. D. Ashwell, F. W. M. Lu, and M. S. Vacchio, “Glucocorticoids in T Cell Development and Function,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 309–345, Apr. 2000.
- [310] J. R. Seckl, “Prenatal glucocorticoids and long-term programming.,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 151 Suppl, pp. U49–U62, 2004.
- [311] R. Misao, S. Iwagaki, W. S. Sun, J. Fujimoto, M. Saio, T. Takami, and T. Tamaya, “Evidence for the synthesis of corticosteroid-binding globulin in human placenta,”

- Horm. Res.*, vol. 51, no. 4, pp. 162–167, 1999.
- [312] M. T. Zhou, C. S. Chen, B. C. Chen, Q. Y. Zhang, and R. Andersson, “Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: Mechanisms and potential intervention,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 17, pp. 2094–2099, 2010.
- [313] M. Yu, Z. Yang, Y. Zhu, and N. Lu, “Efficacy of glucocorticoids in rodents of severe acute pancreatitis: a meta-analysis,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 7, pp. 3647–61, 2014.
- [314] C. A. Muller, O. Belyaev, M. Vogeser, D. Weyhe, B. Gloor, O. Strobel, J. Werner, A. Borgstrom, M. W. Buchler, and W. Uhl, “Corticosteroid-binding globulin: A possible early predictor of infection in acute necrotizing pancreatitis,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 42, no. 11, pp. 1354–1361, Jan. 2007.
- [315] J. O. Jansson, J. Oscarsson, A. Mode, and E. M. Ritzén, “Plasma growth hormone pattern and androgens influence the levels of corticosteroid-binding globulin in rat serum,” *J. Endocrinol.*, vol. 122, no. 3, pp. 725–32, Sep. 1989.
- [316] A. M. Minni, G. F. de Medeiros, J. C. Helbling, A. Duittoz, N. Marissal-Arvy, A. Foury, V. De Smedt-Peyrusse, V. Pallet, and M. P. Moisan, “Role of corticosteroid binding globulin in emotional reactivity sex differences in mice,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 50, pp. 252–63, Dec. 2014.
- [317] K. H. Su, C. Cuthbertson, and C. Christophi, “Review of experimental animal models of acute pancreatitis,” *HPB (Oxford)*, vol. 8, no. 4, pp. 264–286, 2006.
- [318] A. Armario, C. Restrepo, J. M. Castellanos, and J. Balasch, “Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress,” *Life Sci.*, vol. 36, no. 22, pp. 2085–92, Jun. 1985.
- [319] T. D. Nebesio, J. L. Renbarger, Z. M. Nabhan, S. E. Ross, J. E. Slaven, L. Li, E. C. Walvoord, and E. A. Eugster, “Differential effects of hydrocortisone, prednisone, and dexamethasone on hormonal and pharmacokinetic profiles: a pilot study in children with congenital adrenal hyperplasia,” *Int. J. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 2016, p. 17, 2016.
- [320] A. Hodel, “Effects of Glucocorticoids on Adrenal Chromaffin Cells,” *J. Neuroendocrinol.*, vol. 13, pp. 217–221, 2001.
- [321] R. I. Sharara-Chami, M. Joachim, K. Pacak, and J. A. Majzoub, “Glucocorticoid Treatment-Effect on Adrenal Medullary Catecholamine Production,” *Shock*, vol. 33, no. 2, pp. 213–217, 2010.
- [322] E. V. Sivukhina, G. F. Jirikowski, H. G. Bernstein, J. G. Lewis, and Z. Herbert, “Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 38, no. 4, pp. 253–9, Apr. 2006.
- [323] E. Sivukhina, J.-C. Helbling, A. M. Minni, H. H. Schäfer, V. Pallet, G. F. Jirikowski, and M.-P. Moisan, “Intrinsic expression of transcortin in neural cells of the mouse brain: a histochemical and molecular study,” *J. Exp. Biol.*, vol. 216, no.

Pt 2, pp. 245–52, 2013.

- [324] B. van Steensel, E. P. van Binnendijk, C. D. Hornsby, H. T. van der Voort, Z. S. Krozowski, E. R. de Kloet, and R. van Driel, “Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons.,” *J. Cell Sci.*, pp. 787–92, Apr. 1996.
- [325] N. Sousa, N. V. Lukoyanov, M. D. Madeira, O. F. Almeida, and M. M. Paula-Barbosa, “Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement.,” *Neuroscience*, vol. 97, no. 2, pp. 253–66, 2000.
- [326] T.-Y. Chun and J. H. Pratt, “Aldosterone increases plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in rat cardiomyocytes.,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 239, no. 1–2, pp. 55–61, Jul. 2005.
- [327] R. M. Liu, T. van Groen, A. Katre, D. Cao, I. Kadisha, C. Ballinger, L. Wang, S. L. Carroll, and L. Li, “Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer’s disease,” *Neurobiol. Aging*, vol. 32, no. 6, pp. 1079–1089, 2011.
- [328] S. J. Lupien, M. de Leon, S. de Santi, A. Convit, C. Tarshish, N. P. Nair, M. Thakur, B. S. McEwen, R. L. Hauger, and M. J. Meaney, “Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 1, no. 1, pp. 69–73, May 1998.
- [329] A. M. J. MacLulich, I. J. Deary, J. M. Starr, K. J. Ferguson, J. M. Wardlaw, and J. R. Seckl, “Plasma cortisol levels, brain volumes and cognition in healthy elderly men,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 30, no. 5, pp. 505–515, 2005.
- [330] M. Solas, G. Gerenu, F. J. Gil-Bea, and M. J. Ramírez, “Mineralocorticoid receptor activation induces insulin resistance through c-Jun N-terminal kinases in response to chronic corticosterone: cognitive implications.,” *J. Neuroendocrinol.*, vol. 25, no. 4, pp. 350–6, Apr. 2013.
- [331] A. M. M. Orellana, A. R. Vasconcelos, J. A. Leite, L. de Sá Lima, D. Z. Andreotti, C. D. Munhoz, E. M. Kawamoto, and C. Scavone, “Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3 β and WNT/ β -CATENIN signaling in rat hippocampus.,” *Aging (Albany. NY)*, vol. 7, no. 12, pp. 1094–111, 2015.
- [332] B. Pajak, M. Songin, J. B. Strosznajder, and B. Gajkowska, “Alzheimer’s disease genetic mutation evokes ultrastructural alterations: Correlation to an intracellular A β deposition and the level of GSK-3 β -P(Y216) phosphorylated form,” *Neurotoxicology*, vol. 30, no. 4, pp. 581–588, 2009.
- [333] J. C. Garza, M. Guo, W. Zhang, and X.-Y. Lu, “Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3 β / β -catenin signaling.,” *Mol. Psychiatry*, vol. 17, no. 8, pp. 790–808, 2012.
- [334] J. Detka, A. Kurek, A. Basta-Kaim, M. Kubera, W. Lason, and B. Budziszewska, “Elevated brain glucose and glycogen concentrations in an animal model of

- depression,” *Neuroendocrinology*, vol. 100, pp. 178–190, 2014.
- [335] M. Dobarro, L. Orejana, N. Aguirre, and M. J. Ramírez, “Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid β levels, tau phosphorylation and insulin resistance in response to chronic corticosterone administration.,” *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, vol. 16, no. 6, pp. 1351–60, Jul. 2013.
- [336] A. M. Stranahan, T. V Arumugam, R. G. Cutler, K. Lee, J. M. Egan, and M. P. Mattson, “Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons,” *Nat. Neurosci.*, vol. 11, no. 3, pp. 309–317, 2008.
- [337] J.-F. Tanti and J. Jager, “Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation.,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 9, no. 6, pp. 753–62, Dec. 2009.
- [338] C. R. Weston and R. J. Davis, “The JNK signal transduction pathway.,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, no. 2, pp. 142–9, Apr. 2007.
- [339] C. D. Munhoz, S. F. Sorrells, J. R. Caso, C. Scavone, and R. M. Sapolsky, “Glucocorticoids Exacerbate Lipopolysaccharide-Induced Signaling in the Frontal Cortex and Hippocampus in a Dose-Dependent Manner,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 41, pp. 13690–13698, Oct. 2010.

ANEXO

En este anexo se adjuntan dos trabajos en que el doctorando ha participado, aunque en menor grado, y que no forman parte del grueso de la tesis



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Data related to inflammation and cholesterol deposition triggered by macrophages exposition to modified LDL



Juan Toledo^c, Montserrat Esteve^{a,b}, Mar Grasa^{a,b},
Angelo Ledda^{a,b}, Horacio Garda^c, José Gulfo^{a,b},
Ivo Díaz Ludovico^c, Nahuel Ramella^c, Marina Gonzalez^{c,*}

^a Department of Nutrition and Food Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b CIBER Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

^c INIBIOLP-CONICET, Facultad Cs. Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2016
Received in revised form
13 May 2016
Accepted 20 May 2016
Available online 27 May 2016

Keywords:

Low density lipoprotein
Peroxidative damage
Cell viability
Macrophages

ABSTRACT

This article supports experimental evidence on the time-dependent effect on gene expression related to inflammation and cholesterol deposition in lipid-loaded cells. The cells employed were human monocytes THP1 line transformed into macrophages by treatment with phorbol esters. Macrophages were treated at different times with oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) and then gene expression was measured. We also include data about the different types of oxidized lipoprotein obtained (low, media or high oxidation) for differential exposure with Cu ions. These data include characterization to lipid and protein peroxidative damage and also quantification of cell viability by exposure to native and modified LDL. The present article complements data published in “Decreased OxLDL uptake and cholesterol efflux in THP1 cells elicited by cortisol and by cortisone through 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1” Ledda et al. (in press) [1].

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.020>

* Corresponding author.

E-mail addresses: marinacego@hotmail.com, marinacego@med.unlp.edu.ar (M. Gonzalez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.046>

2352-3409/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Specifications Table

Subject area	Biology
More specific subject area	Biochemistry and Molecular Biology
Type of data	Figures
How data was acquired	Images were obtained at transmission electron microscope JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) and then photographed by an Erlangshen camera ES1000W (Model, 785 Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) Analytical measures were registered in a two-beam spectrophotometer -Cintra-20, Sydney, Australia. RT-PCR reactions were run on ABI PRISM 7900 HT detection system (Applied Biosystems)
Data format	Analyzed
Experimental factors	THP1 cells line from ATCC [®] Number: TIB-202 [™] . LDL as obtained from healthy human donors from Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires, Argentina
Experimental features	Cellular RNA was extracted with Trizol according to the technique supplied by the manufacturer and cDNA synthesis was performed employing iScript cDNA Synthesis Kit. Real-Time PCR was carried out using SYBR Green PCR Master Mix on an ABI PRISM 7900 HT detection system using an annealing temperature of 60 °C.
Data source location	La Plata, Argentina and Barcelona, Spain
Data accessibility	Data are with this article

Value of the data

- These data show the characterization of different types of oxidized LDL that refers to protein and lipid lipoprotein peroxidation. This information could be considered in studies employing Ox-LDL.
- Data presented in this article also show that the degree of LDL oxidation is directly related to damage and viability cell. This result could be potentially important for further investigations related to the initiation of plaques in atherosclerotic lesions.
- Our data show that the expression of genes related to inflammation and lipid accumulation in human macrophages is time-dependent. These data could be helpful for other researchers in the development of experiments related to atherosclerotic diseases.

1. Data

The data presented in this article provide information about the characterization of different types of oxidized LDL as well as how modified LDL alters the gene expression related to inflammation process. Dataset shows the methodology used to obtain different types of oxidized low density lipoproteins (Ox-LDL) in order to produce low (L), medium (M), or high (H) peroxidation degree of LDL. We characterized Ox-LDLs (L, M, and H) using quantitative techniques for lipid determination and protein peroxidation. To perform experiments, we selected medium peroxidation degree LDL (M) based on cell viability. We show data about the time-dependency of gene expression involved in the inflammatory process and cholesterol loading.

2. Experimental design, materials and methods

2.1. Ox-LDL characterization

We have obtained Ox-LDL employing the Cu² oxidation method (see Ref. [21] in [1]). Native human (N-LDL, 3 mg/ml) in a volume of 15 ml was treated with 0.5 ml copper sulfate (3.6 mg/ml) at a final concentration of 5 μM at 37 °C under gentle agitation for 4, 8, or 12 h in order to produce L, M, or H peroxidation degree of LDL. To stop the peroxidation process, each preparation was treated with a solution of butylhydroxytoluene (BHT) in PBS at a final concentration of 0.1 mM and immediately subjected to dialysis against PBS (50 mM, pH 7.40, changed every 8 h) for 24 h to eliminate BHT and Cu ions. Peroxidative damage inflicted to lipid and protein components of the native LDL induced by copper treatment was evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [3], conjugated dienes formation [2] and protein carbonyls (PCs) [4].

TBARS was fluorimetrically determined to estimate the extent of lipid peroxidation in homogenates [3]. An aliquot of cellular homogenates (50–100 μL) was reacted with 200 μL of SDS (8.10%, W/V) and 1.5 mL of acetic acid 10% (V/V) (pH 3, 5). Subsequently, 1.5 mL of thiobarbituric acid (TBA 0.8%) and 600 μL of water were incorporated and the mixture was heated in sealed tubes at 95 °C for 60 min. Under these conditions TBARS (mainly malondialdehyde (MDA) generated by lipid peroxidation) reacted with TBA to yield TBA-MDA adducts which were quantified at 515 nm excitation and 553 nm emission. The concentration of the chromophore was calculated from a calibration curve prepared with fresh tetrametoxiprane (TMP) solutions (TMP was purchased from Sigma Chem. Co., Buenos Aires, Argentina).

PCs were determined by the method of Reznick and Packer [4]. Aliquots of cellular homogenates were incubated with dinitro-phenylhydrazine in HCL 2 N at 37 °C in the dark for 30 min. The corresponding hydrazone-derivatives present in the proteins were revealed after the addition of excess NaOH and measured at 505 nm. The concentration of PCs was calculated from a calibration curve prepared with a stock solution of sodium pyruvate (Sigma Chem. Co., Argentina).

TBARS formation was expressed as *m* moles of malondialdehyde (MDA)/mg protein (first bar) and conjugated dienes as optical density units (ODU)/mg protein (second bar) are shown in.

Fig. 1A Carbonylation of aminoacyl residues in LDL protein after pro-oxidant treatment is shown in Fig. 1B and expressed as *n* moles of pyruvate (Pyr)/mg protein. Degree of peroxidation was denoted by capital letters (N, native LDL; L, light-, M, medium-, and H, high-peroxidized LDL). Each bar represents the mean of three independent experiments assayed in triplicate (mean ± SD).

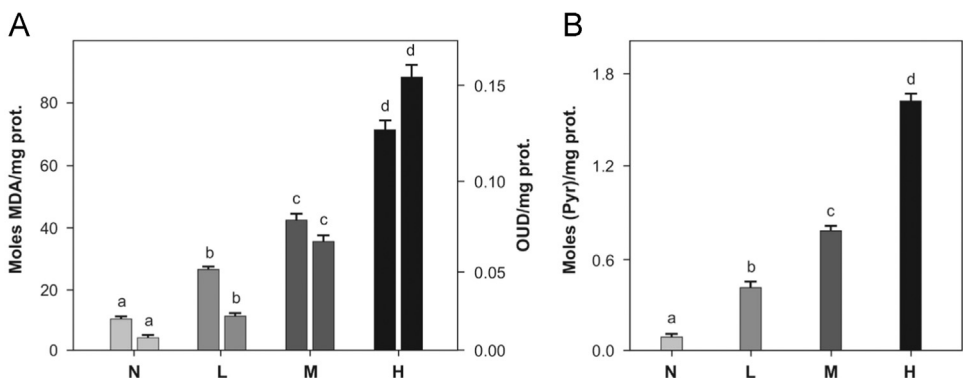


Fig. 1. Peroxidative damage inflicted to lipid and protein components of the native LDL induced by copper treatment. TBARS formation (A) and carbonylation of aminoacyl residues in LDL protein (B). Each bar is the mean of three independent experiments assayed in triplicate (mean ± SD). Statistical differences among data of the same type are indicated with different letters on the top of the bars. Data with distinct letters are statistically different between them at $p < 0.01$ significance level (ANOVA+Turkey test).

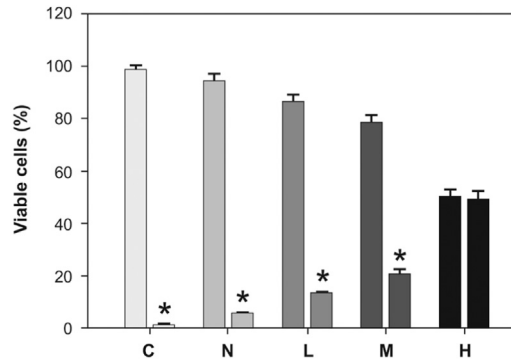


Fig. 2. Cell viability by trypan blue dye (TBD) exclusion test in macrophages treated without (C) or with native (N) or different degree of peroxidized LDL (L, M, or H). First bar corresponds to viable cells and second bar to non-viable cells in each condition. * $p < 0.01$ viable respect non-viable cells.

2.2. Cytotoxic effect of different types of Ox-LDLs (N, L, M and H)

We have evaluated cell viability by trypan blue dye (TBD) exclusion test in macrophages treated with native or peroxidized LDL for 24 h (Fig. 2). The Ox-LDL preparation was diluted 1/10 in culture medium (RPMI). Ox-LDL was added in the culture medium at a final protein concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 2 ml final volume for well. According to the evaluation of peroxidation degree of LDL and cells survival test, we have chosen medium (M) peroxidation degree of the LDL to perform experiments described in the present DiB and in the original research article. Briefly, cells were washed with PBS and treated with 100 μL of 0.1% solution of trypan blue dye (in PBS, pH 7.40). After one-min incubation at room temperature (gentle orbital agitation) they were examined under optical microscopy to determine the percentage of viable cells according to the method described by Jauregui et al. [5]. At least four fields of one hundred cells per field were counted and the results were expressed as the percentage of non-viable cells.

2.3. Gene expression involved in inflammatory processes

We selected medium (M) peroxidation degree of the LDL to evaluate the expression of genes involved in the inflammatory process. Monocytes humans cells (THP1) were grown in RPMI medium containing 10% of serum fetal bovine (SFB) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a 5% CO_2 atmosphere. Later, they were stimulated with phorbol esters (PMA-200 nM) for 24 h and transformed into macrophage type. Then, macrophages THP1 were treated with Ox-LDL for 4, 8, 12, and 24 h at a final concentration of 100 μg protein/ml. The expression level of messenger RNA (mRNA) of different genes was quantified by real-time PCR (RT PCR) (see original research article). As a housekeeping gene, the expression of ribosomal protein L4 (RPL4) was measured. To evaluate the inflammation related to the atherogenic process we determined the expression of the genes: epidermal growth factor like module-containing mucin-like hormone receptor-like1 (EMR1), macrophage mannose receptor (MMR) (Fig. 3A) and tumor necrosis factor α (TNF α) (Fig. 3B panel left). To quantify the TNF α secretion in the medium when the cells were treated with Ox-LDL we used a specific enzyme immunoassay from Becton Dickinson Co. (Durham, USA) according to the manufacturer's instructions. Captured antibody was Anti-Human TNF- α monoclonal antibody, the detection antibody was Biotinylated anti-Human TNF monoclonal antibody and the enzyme reagent was conjugated with streptavidin. Biotin-streptavidin interaction increased significantly affinity and specificity of the assay (Fig. 3B panel right).

For the study of genes involved in cholesterol influx from macrophages and foam cells formation we analyzed fatty acid translocase (FAT/CD36) and acyl-CoA: cholesterol acyl transferase (ACAT) (Fig. 3C).

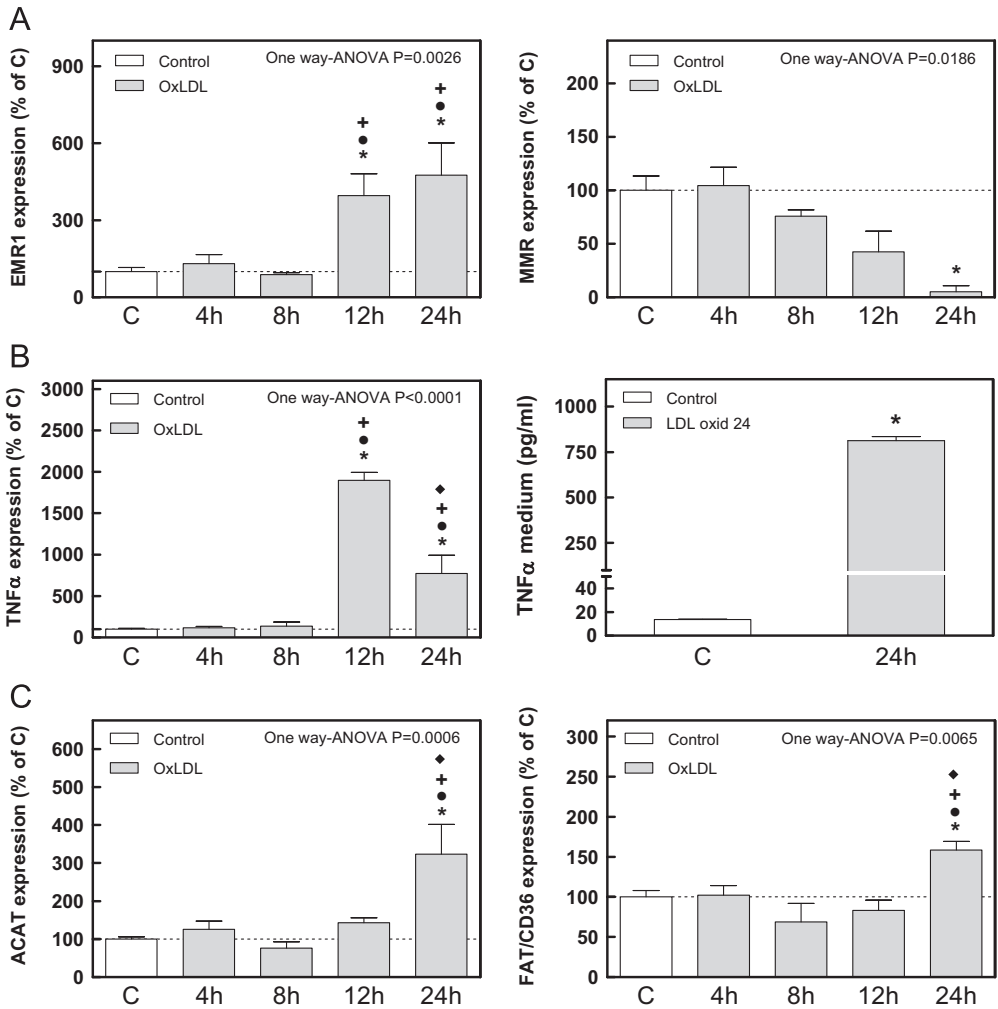


Fig. 3. Gene expression related to inflammatory processes in THP1 cells. A. Expression of EMR1 and macrophage mannose receptor (MMR). B Expression of tumor necrosis factor α (TNF α) (left panel) and TNF α secretion (right panel). C. Expression of fatty acid translocase (FAT/CD36) and acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT). Statistical comparisons were performed by one way-ANOVA and Bonferroni post Test analysis: * $p < 0.05$ vs. C; • $p < 0.05$ vs. 4h; + $p < 0.05$ vs. 8h; ♦ $p < 0.05$ vs. 12h.

2.4. Electron microscopy

The samples treated with or without Ox-LDL were fixed with 2% glutaraldehyde in buffer phosphate (PH 7.2–7.4) for 2 h at 4 °C. Then, cells were centrifuged at 1500 rpm for 10 min. The secondary fixation was performed with osmium tetroxide (1%) for 1 min at 4 °C and then samples were dehydrated with increasing alcohol series and subsequently included in epoxy resin. Ultrathin sections (90 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined in a transmission electron microscope JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) and then photographed by an Erlangshen camera ES1000W (Model, 785 Gatan Inc., Pleasanton, California, USA), Central Electron Microscopy service of the Faculty of Veterinary Science, UNLP (Fig. 4).

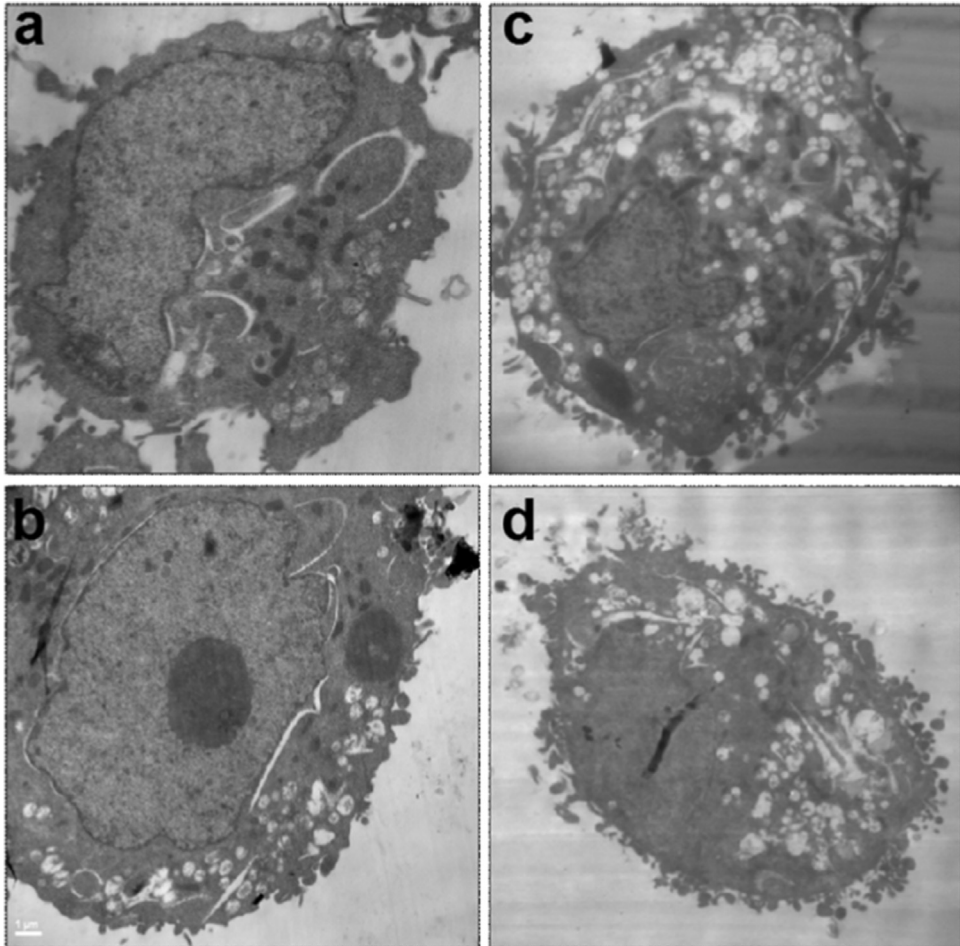


Fig. 4. THP cells electron microscopy. Cells were fixed with glutaraldehyde for electron microscopy, a and b were control without Ox-LDL, c and d were treated with Ox-LDL.

Acknowledgements

This data was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria PI09/00505, Programa Nacional de Internacionalización of Ministerio de Economía y Competitividad of Spain Government PRI-AIBAR-2011-1191 and by grants from the National Council of Scientific and Technical Research, Argentina, PICT 1970/PIP 00648 and The National University of La Plata (UNLP) M 183.

Transparency document. Supplementary Material

Transparency document associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.046>.

References

- [1] A. Ledda, M. Gonzalez, J. Golfo, I. Díaz Ludovico, N. Ramella, J. Toledo, H. Garda, M. Grasa, M. Esteve, Decreased OxLDL uptake and cholesterol efflux in THP1 cells elicited by cortisol and by cortisone through 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Atherosclerosis*. 250 (2016) 84–94.
- [2] Y. Steffen, T. Jung, L.O. Klotz, T. Schewe, T. Grune, H. Sies, Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 955–970.
- [3] J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini-Sarmadi, S. McCarthy, D.J. Betteridge, S.P. Wolf, Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM, *Diabetes* 44 (1995) 1054–1058.
- [4] A.Z. Reznick, L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Method Enzymol.* 233 (1994) 357–363.
- [5] H.O. Jauregui, N.T. Hayner, J.L. Driscoll, R. Williams-Holland, M.H. Lipsky, P.M. Galletti, Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures, *in vitro* 17 (1981) 1100–1110.



Decreased OxLDL uptake and cholesterol efflux in THP1 cells elicited by cortisol and by cortisone through 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1



Angelo Ledda^{a, b}, Marina González^{c, 1}, José Gulfo^{a, b}, Ivo Díaz Ludovico^c, Nahuel Ramella^c, Juan Toledo^c, Horacio Garda^c, Mar Grasa^{a, b, 1}, Montserrat Esteve^{a, b, *, 1}

^a Department of Nutrition and Food Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b CIBER Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

^c INIBIOLP-CONICET, Facultad Cs. Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2015

Received in revised form

4 April 2016

Accepted 24 April 2016

Available online 28 April 2016

Keywords:

Cortisol

Cortisone

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2

THP1 macrophages

Foam cells

ABSTRACT

Background and aims: Data about glucocorticoids role in the development of atherosclerosis are controversial showing different effects in human than in experimental animal models. Atherosclerosis is the result of a chronic inflammatory response to an injured endothelium where an uncontrolled uptake of OxLDL by macrophages triggers the development of foam cells, the main component of fatty streaks in atherosclerotic plaque. There are few data about the direct effect of glucocorticoids in macrophages of atherosclerotic plaque. The aim of the study was to elucidate the role of glucocorticoids in the development of foam cells in atherosclerosis initiation.

Methods: For this purpose we used THP1 cells differentiated to macrophages with phorbol esters and incubated with OxLDL alone or with cortisol or cortisone. THP1 cells were also incubated with cortisone plus an inhibitor of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β HSD1) activity to determine the role of this enzyme on glucocorticoid action in this process.

Results: Ours results showed that cortisol and cortisone decreased significantly the inflammation promoted by OxLDL, and also diminished the expression of genes involved in influx and efflux of cholesterol resulting in a reduced lipid accumulation. Likewise cortisol and cortisone decreased 11 β HSD1 expression in THP1 cells. The presence of the inhibitor of 11 β HSD1 abolished all the effects elicited by cortisone.

Conclusion: Our results indicate a direct effect of glucocorticoids on macrophages braking atherosclerosis initiation, reducing pro-inflammatory markers and OxLDL uptake and cholesterol re-esterification, but also inhibiting cholesterol output. These effects appear to be mediated, at least in part, by 11 β HSD1 activity.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: EMR1, epidermal growth factor like module-containing mucin-like hormone receptor-like1; CD163, Cluster of Differentiation 163; MMR, macrophage mannose receptor; IL-12b, interleukin-12b; IL-6, interleukin-6; TNF α , tumor necrosis factor α ; rIL-10, interleukin-10 receptor; PLA2, phospholipase A2; FAT/CD36, fatty acid translocase; SRA1, Scavenger receptor class A type1; ACAT, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase; NCEH1, neutral cholesterol ester hydrolase1; LXR α , liver X receptor α ; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1, ATP-binding cassette transporter G1; APO E, apoprotein E; 11 β HSD1, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 11 β HSD2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; G6PT1, glucose-6-phosphate translocase 1; H6PDH, hexose-6-phosphate dehydrogenase; RPL4, ribosomal protein L4.

* Corresponding author. Faculty of Biology, Prevosti building, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: mesteve@ub.edu (M. Esteve).

¹ These authors contributed equally to this work and should be considered as senior authors.

1. Introduction

Atherosclerosis is an essential trigger for the development of cardiovascular disease (CVD), which is the main cause of mortality in both developed and developing countries alike [1]. Atherosclerosis occurs as a result of a chronic inflammatory response to an injured vessel wall [2]. One of the main causes of this vessel wall damage is the accumulation of oxidized lipids in low density lipoproteins (OxLDL). As a consequence of lesion, monocytes are recruited to the endothelium, where they polarize to a pro-inflammatory macrophage profile. Then, uncontrolled macrophage uptake of OxLDL leads to the subsequent formation of foam cells, the main components of fatty streaks in atherosclerotic plaque [3].

Thus, macrophages play a pivotal role in the development and progression of atherosclerosis, and the knowledge of the factors that regulate their metabolism is crucial to control the process. A key step in the formation of foam cell macrophages is the internalization of OxLDL through specific scavenger receptors (mainly SRA1 and FAT/CD36), but the degree of lipid accumulation is also dependent of cholesterol esterification (regulated by ACAT and NCEH) and cholesterol efflux that involves the activity of ATP-binding cassette transporters (ABCA1, ABCG1), scavenger receptor class B (SR-BI) and high density lipoproteins (HDL). Consequently, foam cell formation is the result of a disrupted balance between cholesterol influx, esterification and efflux in macrophages, which occurs when macrophages fail to restore their cellular cholesterol homeostasis via regulation of reverse cholesterol transport [4].

Stress and visceral obesity are main risk factors for CVD [5,6]. Stressful situations are known to activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), inducing increased levels of circulating glucocorticoids; however, the role of glucocorticoids in the development of atherosclerosis remains controversial [7,8]. Whereas circulating glucocorticoids correlate positively with CVD in humans [9,10], animal studies (e.g. on rabbits and dogs) suggest an atheroprotective role of both natural and synthetic glucocorticoids [8,11]. An excess of glucocorticoids, as in Cushing's syndrome or with the pharmacological therapy common in autoimmune diseases, is associated with an increase in atherosclerotic and cardiovascular events [12,13]. Normalization of cortisol levels in patients with Cushing's syndrome largely reverses pathophysiological changes in vascular function and structure [14]. However, most atherosclerosis occurs independently of exogenous glucocorticoid administration, and plasma cortisol levels are not normally elevated in atherosclerosis.

Glucocorticoid availability in tissues could differ from circulating levels due to 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 (11β HSD1 and 11β HSD2) activity. In vivo, the 11β HSD1 enzyme predominantly converts inert glucocorticoids (cortisone in humans, 11-dehydrocorticosterone in rodents) into the corresponding active forms (cortisol in humans, corticosterone in rodents). 11β HSD1 is widely expressed, mainly in liver but also at more modest levels in classical glucocorticoid target cells and tissues, e.g. adipose tissue and immune cells [15]. In 11β HSD1 knockout mice, the absence of 11β HSD1 is atheroprotective [16]. Expression of the 11β HSD2 enzyme, which catalyzes the opposite reaction, is restricted to mineralocorticoid target cells or tissues, mainly in kidney but also in skin, lung and adrenal cortex [17]. 11β HSD2 deficient mice show increased atherosclerotic plaque development, probably due to increased activation of mineralocorticoid receptors by glucocorticoids [18].

Few studies have addressed the direct role of glucocorticoids and 11β HSD1 in the control of cholesterol homeostasis on macrophages throughout the atherogenic process. To elucidate it, we studied the changes caused by cortisol and cortisone in THP1 macrophages incubated in the presence of OxLDL (a potent atherogenic stimulus) on internalization of OxLDL, lipid accumulation and cholesterol efflux. In addition, THP1 macrophages were also incubated with an inhibitor of 11β HSD1 activity to unravel its mediating function of glucocorticoid actions in the macrophages involved in the initiation of atherogenic process.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of LDL, preparation of oxidized LDL (OxLDL) and acetylated LDL (AcLDL)

The LDL fraction was isolated from plasma obtained from clinically healthy human volunteers after a 12 h fast. The isolation

method employed is described elsewhere [19], with some modifications. The density of the isolated plasma was adjusted to 1.21 g/mL with NaBr in the presence of EDTA 1%. Throughout purification, the resulting plasma was kept on ice and protected from light. After ultracentrifugation at 55,000 rpm for 36 h, the lipoproteins were separated by gel permeation on a 1 mL Sephacryl S-300 column. The LDL subfraction was dialyzed against TRIS/HCl buffer (10 mM pH 7.40, containing 1 mM EDTA) overnight, and adjusted to a final protein concentration of 3 mg/mL. The pooled preparations were aliquoted after nitrogen bubbling into cryovials at -70°C until use (no more than one month) [20].

To obtain OxLDL, 15 mL of human isolated LDL (3 mg protein/mL) were treated in vitro with 0.5 mL copper sulfate at a final concentration of $5\ \mu\text{M}$ at 37°C under gentle agitation for 8 h in order to produce a medium peroxidation degree of the LDL lipids (about 45 nmol malondialdehyde/mg protein). To stop the peroxidation process, each preparation was treated with a solution of butylhydroxytoluene (BHT; 2,6-di-*t*-butyl-*p*-cresol) in PBS at a final concentration of 0.1 mM [21] and immediately subjected to dialysis against PBS (50 mM, pH 7.40, changed every 8 h) for 24 h to eliminate BHT and Cu ions. Cu elimination was tested by atomic absorption spectrometry as described elsewhere [22]. In brief, the samples were diluted with ultrapure water (18 m Ω cm, Carlo Erba) and ultrafiltered using a 0.22 μm Millipore membrane (Milli-Q Purification System, Millipore). Ultrafiltered dissolutions were directly aspirated into the flame 1100 B Spectrophotometer equipped with a cathode lamp (Perkin-Elmer) at a spectral width of 1 nm. Calibrations were performed with a standard solution of $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ in HNO_3 0.5 N (Tritrisol from Merck Co.) and 18 Ω cm water ultrafiltered through a Millipore membrane. All measurements were performed in peak height mode (324.7 nm line). The intra- $[(\text{SD}/\xi).100]$ and inter- $[\Delta\text{SD}/\Delta\xi].100]$ assay coefficients of variations were 15.5 and 6.0%, respectively. We routinely obtained a similar equation for the calibration curve ($\text{IR} = 0.00055 + 0.04788 [\text{Cu}, \text{mg/L}]$) and statistical analyses routinely demonstrated a correlation coefficient of between 0.956 and 0.991.

The LDL were acetylated by the Fraenkel-Conrat method [23]. Firstly, 5 mL of human isolated LDL (3 mg protein/mL) were added to a 5 mL of a saturated solution of sodium acetate with continuous stirring in an ice water bath. Then acetic anhydride was added in multiple small aliquots (2 μL) over 1 h with continuous stirring. After the addition of a total mass of acetic anhydride equal to 1.5 times the mass of protein used, the mixture was stirred for an additional 30 min without further additions. Then the reaction solution was dialyzed for 24 h at 4°C against a buffer containing 150 mM NaCl and 0.3 mM EDTA, pH 7.4. Preparations of OxLDL and AcLDL were then sterilized by ultrafiltration under vacuum using a 0.22 μm membranes (milli-Q purification System, Millipore), fractioned into small aliquots, stored under nitrogen atmosphere at 4°C (for no more than 2 weeks), and used for the experimental protocols.

2.2. Cell culture and treatment

About 1×10^6 human monocytes (THP1) were seeded on 6-well plates and incubated for 1 day with 2 mL of RPMI medium supplemented with penicillin/streptomycin (100 units/mL) and 10% FBS at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Phorbol esters at 200 nM (PMA) were added to the medium for 24 h to transform monocytes into macrophage type cells.

THP1 macrophages were seeded and grown for 24 h in disposable culture dishes (Falcon) in a humidified atmosphere with PMA. Then, the medium was collected and remaining cells were used for the different experiments. The experiments conducted in presence of OxLDL or AcLDL were carried out at a final concentration in the medium of 100 μg protein/mL in a total volume for well of 2 mL.

Cells were treated for 24 h with OxLDL and increasing concentrations of cortisol, cortisone or cortisone plus 100 μ M of BTV.2733 (cat. n° 1756, Axon Medchem) to inhibit 11 β HSD1 activity [24]. Cortisol and corticosterone concentrations ranging from physiological to pharmacological were used (from 0.1 to 1000 nM). In addition, a set of cells were treated for 24 h with AcLDL or AcLDL plus 1000 nM of cortisol. The glucocorticoids were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and immediately diluted in the culture medium (RPMI). The final concentration of DMSO was 0.1% in the culture medium, and control culture dishes were also supplemented with an equivalent aliquot of DMSO. After the corresponding treatment, the medium was collected and frozen at -80°C . The cell monolayers were washed three times with cold sterile PBS (5 mL), and Trizol (Invitrogen) reagent was added for RNA extraction.

2.3. Trypan blue dye (TBD) assay test

Cell viability was assessed for each experimental condition. Attached cells were washed with PBS and incubated with 100 μ L of a 0.1% solution of trypan blue dye (in PBS, pH 7.4). The cells were examined under optical microscopy to determine viability according to the method previously described [25]. At least four fields of one hundred cells per field were counted and the results were expressed as the percentage of non-viable cells.

2.4. Quantitative real-time PCR

Total RNA (1 μ g) was used to generate cDNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Real-time PCR (RT-PCR) amplification was carried out using 10 μ L of amplification mixture containing SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), 10 ng of cDNA and 300 nM of primers. The primers used are shown in Table 2 (supplemental material). Reactions were run on an ABI PRISM 7900 HT detection system (Applied Biosystems) using an annealing temperature of 60°C . To determine amplification sensitivity and efficiency, PCR linear ranges were previously established for each gene pair of primers and cells cDNA. To evaluate inflammation related to the atherogenic process, we determined the expression of epidermal growth factor like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (EMR1), Cluster of Differentiation 163 (CD163), interleukin-12b (IL-12b), macrophage mannose receptor (MMR), interleukine-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin-10 receptor (rIL-10) and phospholipase A2 (PLA2). For the study of genes involved in cholesterol influx and efflux from macrophages we analyzed fatty acid translocase (FAT/CD36), scavenger receptor class A type 1 (SRA1), liver X receptor α (LXR α), ATP-binding cassette transporters A1 and G1 (ABCA1, ABCG1) and apoprotein E (APO E). To evaluate the cholesterol esterification and hydrolysis of cholesterol esters we determined the expression of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase ACAT) and neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH1) respectively. To investigate the availability of glucocorticoid in cells, we determined the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 (11 β HSD1, 11 β HSD2), glucose-6-phosphate translocase 1 (G6PT1) and hexose-6-phosphate dehydrogenase (H6PDH). As a housekeeping gene, the expression of ribosomal protein L4 (RPL4) was measured. Ct values were obtained using an automatically calculated threshold and the relative expression of target genes to RPL4 was calculated using the $\Delta\text{C}(t)$ formula. Data were expressed as the % with respect to OxLDL-THP1 cells without hormone.

2.5. Oil-red staining

Cells were fixed to glass plates by covering them with 10%

formaldehyde in PBS overnight at room temperature. Oil red O working solution was prepared from a stock solution (0.5 g Oil Red O in 100 mL isopropanol, Sigma HT50-1-640) by adding 6 mL of stock to 4 mL of bidistilled water. After mixing, it was filtered through Whatman 1 filter paper. Subsequently removing fixing buffer carefully, cells were covered with fresh Oil Red O working solution at least one hour at room temperature. Then cells were rinsed several times, carefully with bidistilled water and were allowed to air dry [26]. The macrophages were visualized under optical microscope (Olympus BX-51), and image stacks were captured (Olympus DP-70). Lipid droplets areas were analyzed using the Fiji ImageJ [27].

2.6. TNF α quantification

Determination of TNF α in the cells medium was performed by Human TNF ELISA set (BD Biosciences) following supplier instructions.

2.7. Statistical analysis

The data were analyzed using the GraphPad software program version 5.0 and were expressed as the mean \pm SEM. Statistical comparisons for different concentrations of cortisol, cortisone or cortisone plus BT2733 were made by one-way ANOVA and Bonferroni post Test. The Student's *t*-test was used to compare Control with OxLDL and discrete concentration points of cortisol and cortisone or cortisone and cortisone plus BTV.2733. P values <0.05 were considered.

3. Results

The viability of cultured cells treated with OxLDL in all conditions was expressed as percentage of dead cells (Fig. 1) and did not exceed 7–8% of total cells, confirming that our results were not affected by the addition of DMSO, hormones or the inhibitor BTV.2733.

Gene expression of macrophage and inflammation mediator markers as a response to incubation of THP1 cells with OxLDL and cortisol, cortisone and cortisone plus BTV.2733 is given in Table 1. The presence of OxLDL increased the expression of macrophage marker EMR1 and of pro-inflammatory interleukins IL-6, IL-12b

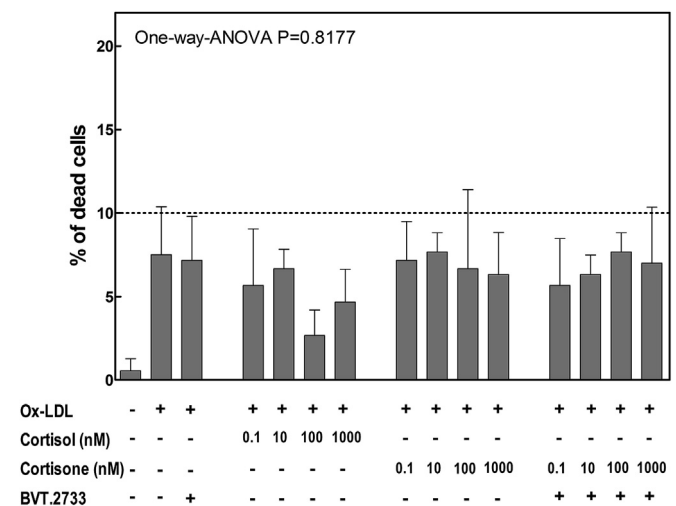


Fig. 1. Viability of cultured THP1 macrophages for all conditions tested expressed as dead cells versus total cells (%). The One way ANOVA significance is shown in the graphic. Bonferroni post Test analysis was not significant in any case.

Table 1
Expression of inflammatory markers in THP1 macrophages treated with OxLDL and glucocorticoids during 24 h.

	Control		With OxLDL		With OxLDL + Cortisol (%OxLDL)		Cortisone (%OxLDL)		Cortisone plus BVT.2733 (%OxLDL)		One way ANOVA						
					Cortisol (%OxLDL)		Cortisone (%OxLDL)		Cortisone plus BVT.2733 (%OxLDL)								
	0.1 nM	10 nM	0.1 nM	10 nM	0.1 nM	10 nM	0.1 nM	10 nM	0.1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	Cortisol	Cortisone	Cortisone plus BVT.2733		
EMR1	2.3 ± 0.7*	100 ± 15	45.5 ± 6.7 ⁺	44.5 ± 5.9 ⁺	18.4 ± 0.7	94.3 ± 7.6	98.9 ± 11.7	88.9 ± 11.9	30.3 ± 7.5	95.2 ± 16.2	99.8 ± 15.2	137 ± 15	124 ± 15	<0.0001	0.0004	0.3885	
TNFα	5.9 ± 1.6*	100 ± 12	112 ± 9	47.2 ± 5.8 ⁺	25.8 ± 5.8 ⁺	5.9 ± 0.9	104 ± 13	108 ± 10	72.2 ± 16.8	7.6 ± 1.3	104 ± 11	54.3 ± 16.5	71.1 ± 1.3	63.9 ± 9.3	<0.0001	<0.0001	0.2751
IL-12b	34.6 ± 3.0*	100 ± 10	97.8 ± 10.2	110 ± 17	62.4 ± 12.4	30.1 ± 6.7 ⁺	129 ± 13	132 ± 14	133 ± 4	76.7 ± 4.7	139 ± 8	111 ± 6	134 ± 55	77.0 ± 7.3	0.0011	0.6331	0.5973
IL-6	0.9 ± 0.0*	100 ± 2	67.1 ± 8.3	20.2 ± 2.8 ⁺	23.8 ± 5.7 ⁺	7.0 ± 0.7 ⁺	65.6 ± 5.9	89.7 ± 8.3	60.2 ± 10.7	19.3 ± 3.6	47.2 ± 10.4	86.1 ± 12.8	91.1 ± 13.5	61.1 ± 15.9	<0.0001	<0.0001	0.0525
MMR	4080 ± 88*	100 ± 20	74.0 ± 27.9	96.8 ± 18.6	490 ± 65 ⁺	1605 ± 138 ⁺	206 ± 97	191 ± 65	155 ± 59	88.6 ± 46.6	203 ± 95	65.7 ± 21.4	105 ± 44	108 ± 22	<0.0001	0.7556	0.3760
CD163	39.8 ± 4.2*	100 ± 12	78.1 ± 1.1	66.7 ± 7.2 ⁺	310 ± 2 ⁺	269 ± 17	78.3 ± 9.4	125 ± 6.8	159 ± 6	323 ± 84	52.0 ± 2.5	80.4 ± 3.5	109 ± 13.1	157 ± 4	<0.0001	<0.0001	<0.0001
rIL-10	10.0 ± 1.8*	100 ± 6	75.4 ± 1.6 ⁺	52.4 ± 6.1 ⁺	76.9 ± 10.3	32.8 ± 1.3	96.7 ± 5.6	90.6 ± 6.8	81.5 ± 11.0	22.5 ± 5.9	142 ± 14	95.7 ± 26.4	112 ± 26	127 ± 18	<0.0001	<0.0001	0.5277

The data are the mean ± sem. Statistical significance performed by One Way Anova is shown in the last columns of the table. Student's t-test is denoted by symbols: *P < 0.05 control vs OxLDL; +P < 0.05 cortisol vs cortisone; ● P < 0.05 cortisone vs cortisone plus BVT.2733.

and TNFα. In addition, OxLDL strongly decreased the expression of anti-inflammatory marker MMR but increased the expression of rIL-10 and CD163 also related to M2 macrophage profile. Cortisol markedly decreased the expression of EMR1 and pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL12b and TNFα when added together with OxLDL. Consistently with this, cortisol promoted an increase in the expression of MMR and CD163, markers for the alternative pathway (M2) of macrophage differentiation. We observed a significant dose-response effect for cortisol in all cases. Cortisol also diminished the expression rIL-10 but to a lesser extent than for the pro-inflammatory markers mentioned above. At the highest concentration tested, cortisone completely mimicked the effects of cortisol on the expression of EMR1, TNFα, CD163 and rIL-10, but only partially for IL-6. In the case of MMR, and IL12b cortisone had no effect on its expression. The presence of BTV.2733 blocked the effect of cortisone in all cases. In addition, levels of TNFα were measured in culture medium of cells treated with OxLDL or AcLDL and a similar increase was found for both modified LDL, of about 100 fold compared to the control without modified LDL. Cortisol decreased TNFα production in the medium in a 42% and 66% respectively.

To check if PLA2 was involved in the anti-inflammatory effect of cortisol we determined its expression. The OxLDL increased PLA2 expression 7 fold that found in unstimulated THP1 macrophages (14.2 ± 1.3% in control and 100.0 ± 7.6% in OxLDL treated). Cortisol strongly decreased PLA2 expression only at 1000 nM to a 12.5 ± 0.8% and cortisone showed no effect.

Fig. 2 shows the expression of genes coding for proteins involved in macrophage modified LDL uptake (FAT/CD36 and SRA1), esterification of cholesterol (ACAT) and hydrolysis of cholesterol esters (NCEH1). The expression of FAT/CD36, SRA1 and ACAT, was strongly increased by OxLDL. The expression of NCEH1 was also significantly increased by OxLDL to a lesser extent. Cortisol reduced the expression of FAT/CD36, SRA1 and ACAT in a dose-dependent manner, but had no effect on NCEH1. Cortisone at the highest dose exerted the same effect that cortisol, blunted by the addition of the 11βHSD1 inhibitor. The expression of genes that encode for the key transporters involved on efflux of cholesterol (ABCA, ABCG1), as well as LXRα, that up regulates their expression, and ApoE is shown in Fig. 3. ABCA1, ABCG1, LXRα and ApoE expression were increased by OxLDL effect. Cortisol reduced the expression of all genes studied in a dose-dependent manner. In all cases, the effect of cortisol at the highest dose tested was to reduce the expression of these genes to below 50% compared to cells incubated with OxLDL. The weakest effect exerted by cortisol was on ApoE, and the strongest effect was on LXR, with a decrease in expression to 57% and 81%, respectively. Cortisone only mimicked the effect of cortisol at the highest dose, and the presence of BVT2733 abolished this effect. In summary, it is observed a decreased expression of genes involved in OxLDL uptake and cholesterol esterification, but also of those involved in cholesterol efflux without effect in the expression of the main enzyme involved in hydrolysis of cholesterol esters.

Intracellular lipids droplets, measured by oil-red staining (Fig. 4A and B), were increased 3.3 fold by effect of OxLDL, whereas when cortisol and cortisone were also present the increase was lower, about 1.7 and 2.4 fold respectively. Thus, the presence of glucocorticoids caused a significant decrease of cell cholesterol accumulation induced by OxLDL. The presence of BTV.2733 blocked the effect of cortisone. The effect of AcLDL on the charge of lipids was also evaluated (Fig. 4C). In our hands, AcLDL promoted an increase of 3.1 fold compared to that found in control macrophages without AcLDL. Cortisol reduce the lipids charge but to a lesser extents that found under OxLDL incubation.

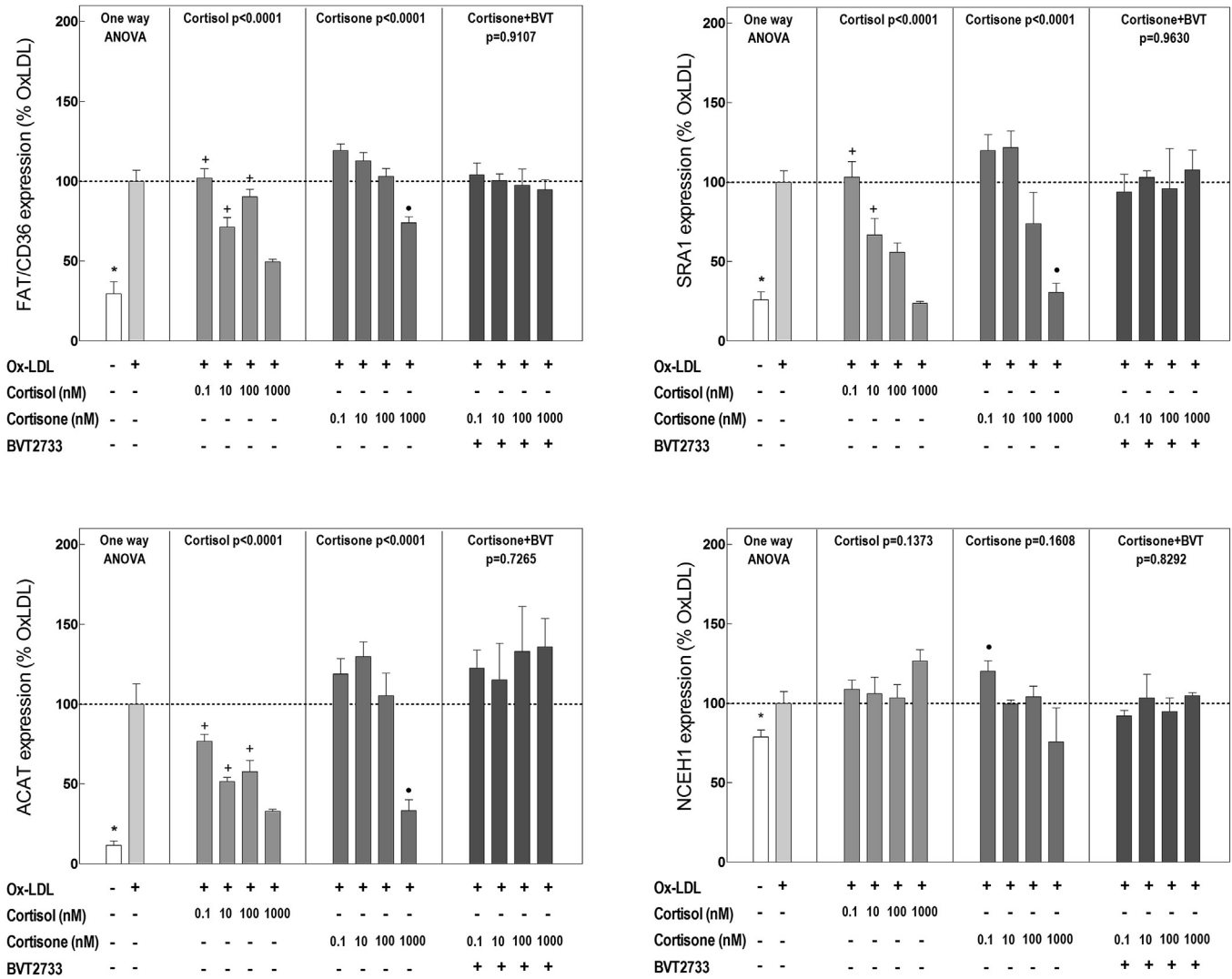


Fig. 2. Expression of genes involved on influx of OxLDL, esterification of cholesterol and hydrolysis of cholesterol esters in THP1 macrophages incubated with OxLDL or with OxLDL plus cortisol or cortisone or cortisone with BVT.2733. Data are expressed as percentage of the expression found in cells incubated only with OxLDL. Fatty acid translocase (FAT/CD36), Scavenger receptor class A type 1 (SRA1), acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) and neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH1). One way Anova significance for each group of hormone treatment is shown in the graph. Student's *t*-test for discrete points was used. Symbols denote significance between: * without OxLDL vs with OxLDL; + Cortisol vs Cortisone; ● Cortisone vs Cortisone with BVT.2733. P values <0.05 were considered significant.

The expression of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 is shown in Fig. 5. Interestingly, the expression of both was increased by OxLDL. Cortisol blocked the increased expression of 11 β HSD1 elicited by OxLDL in a dose-dependent manner. The expression of 11 β HSD2 was unaffected by cortisol at the lowest dose, but was inhibited at a concentration of 10 nM; in contrast, 100 and 1000 nM of cortisol promoted an increase in this expression proportional to the hormone concentration. In addition, the expression of G6PT1 and H6PDH, which are important to supply reduced substrate (NADH + H) for the 11 β HSD1 reaction, was decreased by cortisol. The effect of cortisone on 11 β HSD1 expression was similar to that of cortisol but weaker, except at 0.1 nM, when it was the same. Cortisone had no effect on the expression of 11 β HSD2 with respect to cells incubated with OxLDL alone. Cortisone increased the expression of G6PT1 at 0.1 nM with respect to the same concentration of cortisol or with OxLDL alone; however, increasing doses of cortisone induced inhibition of G6PT1 expression. Cortisone had the same effect as cortisol on the expression of H6PDH.

4. Discussion

The aim of this study was to elucidate the direct effect of glucocorticoids on the macrophages in the atherogenic process. For this purpose we used THP1 macrophages incubated with OxLDL to promote the accumulation of lipids. Our results highlight that cortisol, and to a lesser extent cortisone, arrested the progression of inflammation in a dose-dependent manner, assessed by the reduction in EMR1, TNF α , IL-12b and IL-6 whereas the anti-inflammatory macrophage profile M2 markers as MMR and CD163 [28–30] were increased by cortisol, but only at high doses. It is well established that glucocorticoids exert an anti-inflammatory effect [31] and activate the alternative pathway of macrophage differentiation. Glucocorticoids and IL-10 activate the alternative differentiation to specific M2 macrophages which express several scavenger receptors such as SRA1 and CD163. The increased expression of SRA1 and CD163 contributes to M2 macrophage functions such as apoptotic cell clearance [32]. These subset of specialized M2 macrophages are the cells involved in foam cell

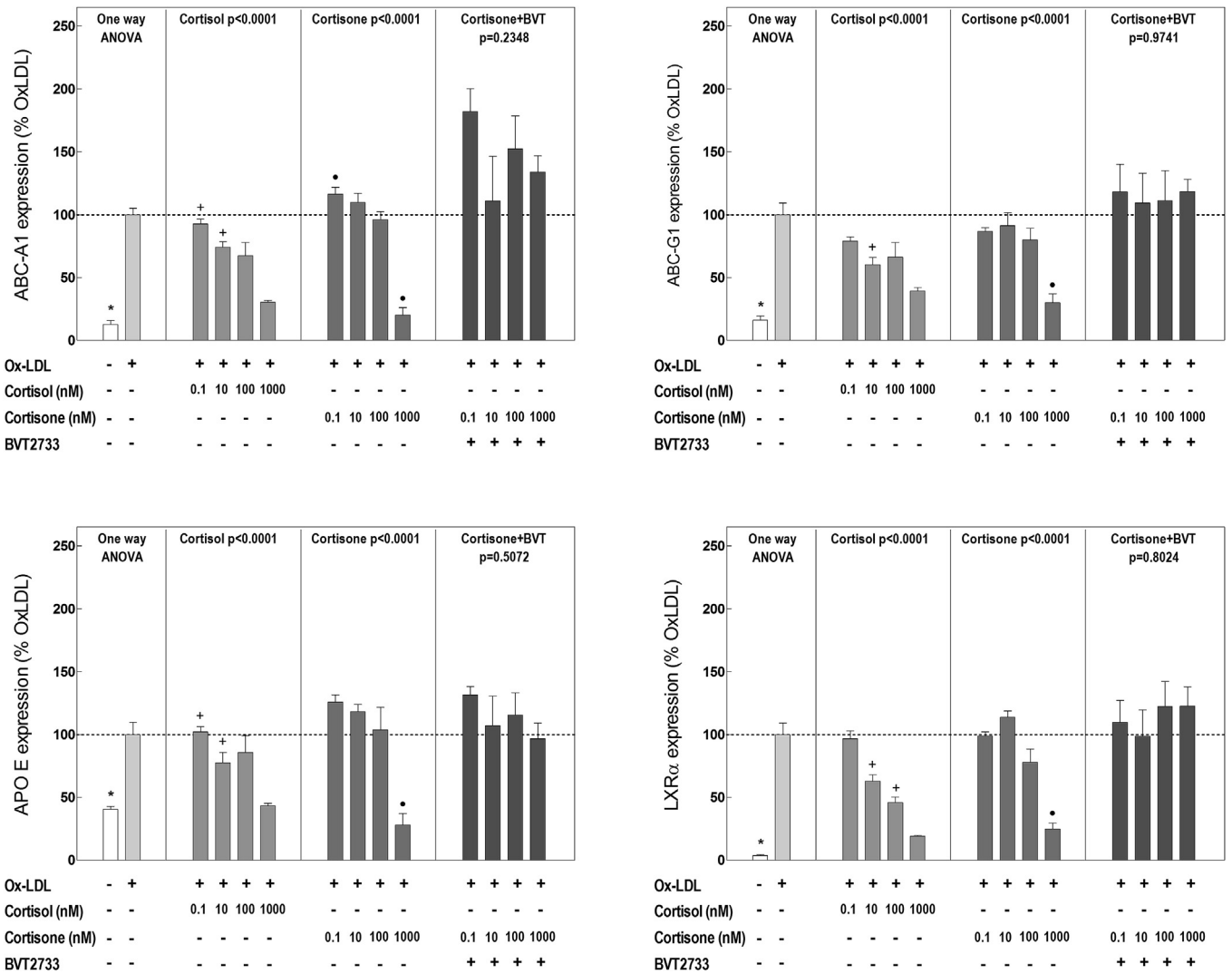


Fig. 3. Expression of genes involved on efflux of cholesterol in THP1 macrophages incubated with OxLDL or with OxLDL plus cortisol or cortisone or cortisone with BVT.2733. Data are expressed as percentage of the expression found in cells incubated only with OxLDL. ATP-binding cassette transporters A1 and G1 (ABC-A1, ABC-G1), apoprotein E (APO E) and liver X receptor a (LXRα). One way Anova significance for each group of hormone treatment is shown in the graph. Student's *t*-test for discrete points was used. Symbols denote significance between: * without OxLDL vs with OxLDL; + Cortisol vs Cortisone; ● Cortisone vs Cortisone with BVT.2733. P values <0.05 were considered significant.

formation as a pathological consequence of a normal anti-inflammatory response [32].

In the present study, OxLDL promoted the uptake of cholesterol and its esterification in THP1 macrophages through increased gene expression of CD36 and SRA1, the main pathways of cholesterol uptake in macrophages [33], and of ACAT, which re-esterifies cholesterol inside macrophages [34]. Cortisol inhibited the expression of CD36, SRA1 and ACAT, thus limiting the influx of cholesterol. ATP-binding cassette transporters, specifically ABCA1 and ABCG1, are responsible for most cholesterol efflux from macrophages [35] and to a lesser extent scavenger receptor-BI [36]. In addition, increased apoE secretion could be linked to an augmented cholesterol efflux through ABCA1/ABCG1 in macrophages [37]. Our data show that OxLDL increased gene expression of ABCA1, ABCG1, apoE and LXRα, the transcription factor that regulate its expression [38]. Nevertheless, the presence of the active glucocorticoid cortisol in the culture medium inhibited the expression of genes involved in cholesterol efflux, probably through a reduction in LXRα expression. Cortisone had a more attenuated effect compared with cortisol, which was abolished by the presence of the inhibitor of

11βHSD1 (BVT.2733) due the impossibility of activating cortisone to cortisol. A recent study [39] showed that cortisol decreased cholesterol efflux in THP1 macrophages, in agreement with our results, but the authors also reported a higher influx. Our results indicate that glucocorticoids have the capacity to inhibit the expression of genes related to the influx and the efflux of cholesterol in macrophages, resulting in a reduction of their net lipid content.

The mechanism of action of cortisol is probably multi-factorial, because glucocorticoids can act through multiple systems. First, the reduced efflux could be partially consequence of a minor lipid content inside the cell due to reduced influx, in addition of a direct glucocorticoid action on gene expression supported by the finding of negative glucocorticoid response elements in the promoter region of some of the genes involved, such as ABCA1 that in liver is repressed by glucocorticoid through a direct action [40]. Second, it is known that glucocorticoids mediate their anti-inflammatory action, clearly observed in our data, through transrepression of the NF-κβ transcription factor, which also has a role in foam cell development [41]. It has been described that macrophages from

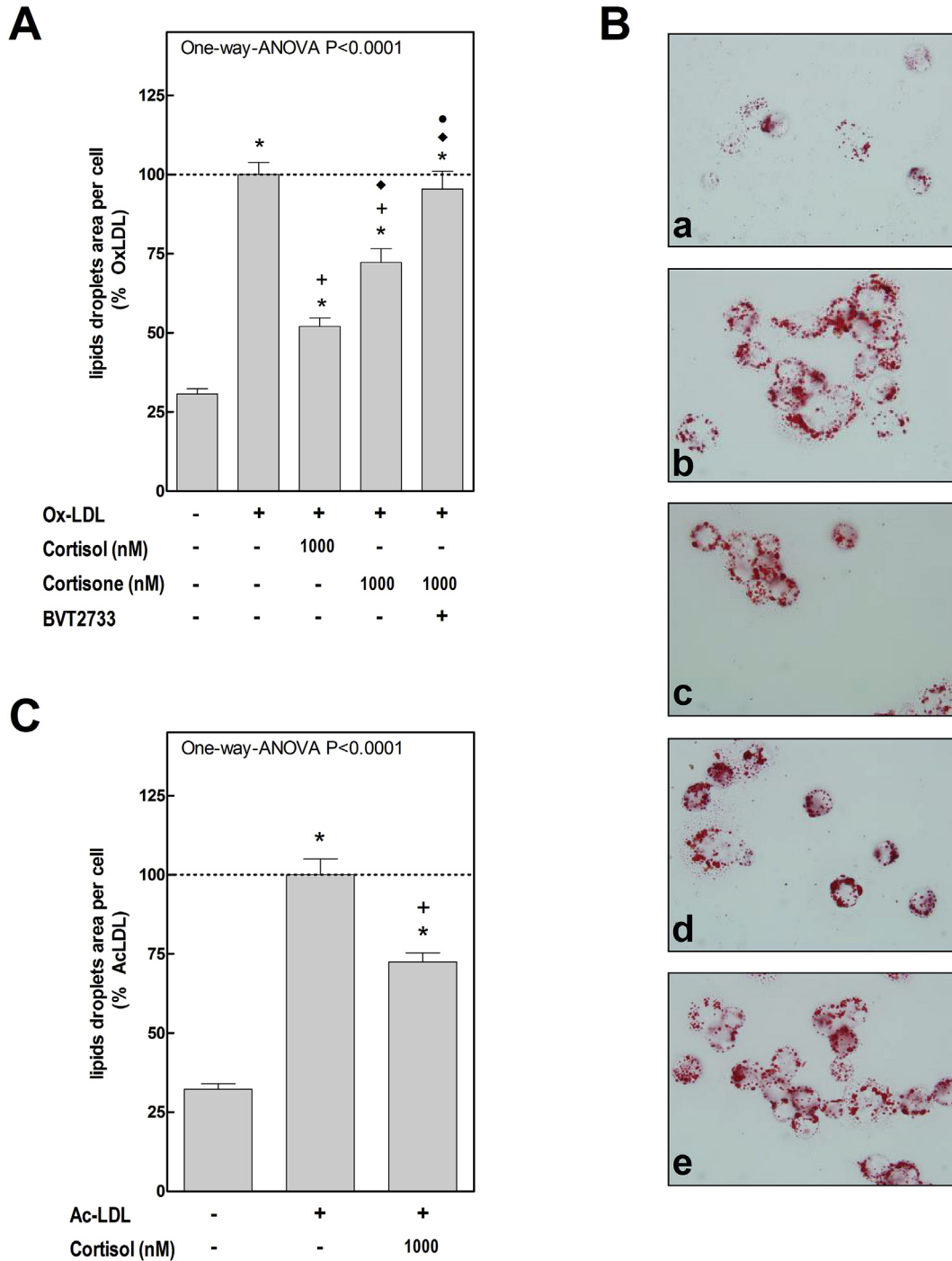


Fig. 4. Intracellular lipids droplets, measured by oil-red staining of THP1 macrophages. A) Lipid droplets deposition in THP1 macrophages incubated without OxLDL, with OxLDL and with OxLDL plus cortisol or cortisone and BTV.2733. B) Representative pictures of THP1 macrophages stained with oil-red at 100X. a) THP1 cultured without OxLDL, b) THP1 cultured with OxLDL, c) THP1 cultured with OxLDL plus cortisol, d) THP1 cultured with OxLDL plus cortisone and e) THP1 cultured with OxLDL plus cortisone and BVT.2733. C) Lipid droplets deposition in THP1 macrophages incubated without AcLDL, with AcLDL and with AcLDL plus cortisol. In all cases cortisol and cortisone were used at 1000 nM. One way Anova significancy and Bonferroni post Test analysis are included in the graph: *p < 0.05 vs without OxLDL or AcLDL; + p < 0.05 vs with OxLDL or AcLDL; ◆ p < 0.05 vs OxLDL plus cortisol and ● p < 0.05 vs with OxLDL plus cortisone.

p50-KO mice (without transcriptional activity of NF- κ B) show, in agreement with our data, reduced SRA1 expression [42]. In addition, ACAT can be upregulated through activation of NF- κ B [42]. In consequence, NF- κ B repression would result in a reduced ACAT expression. However, data on NF- κ B role on foam cell development is conflicting. Mice overexpressing p65 (with increased transcriptional activity of NF- κ B) show reduced expression of FAT/CD36 and

a limited foam cell development [43]. A third option would be that cortisol effects occur through PPAR γ . PPAR inhibition would result in the decrease of FAT/CD36, LXR α , ABCA1 and ABCG1 [44]. Finally, ACAT is upregulated also through MAPK which in turn is inhibited by glucocorticoids [41,44].

The concentration of active glucocorticoids, i.e. cortisol or corticosterone, in tissue depends on 11 β HSD1 and 11 β HSD2

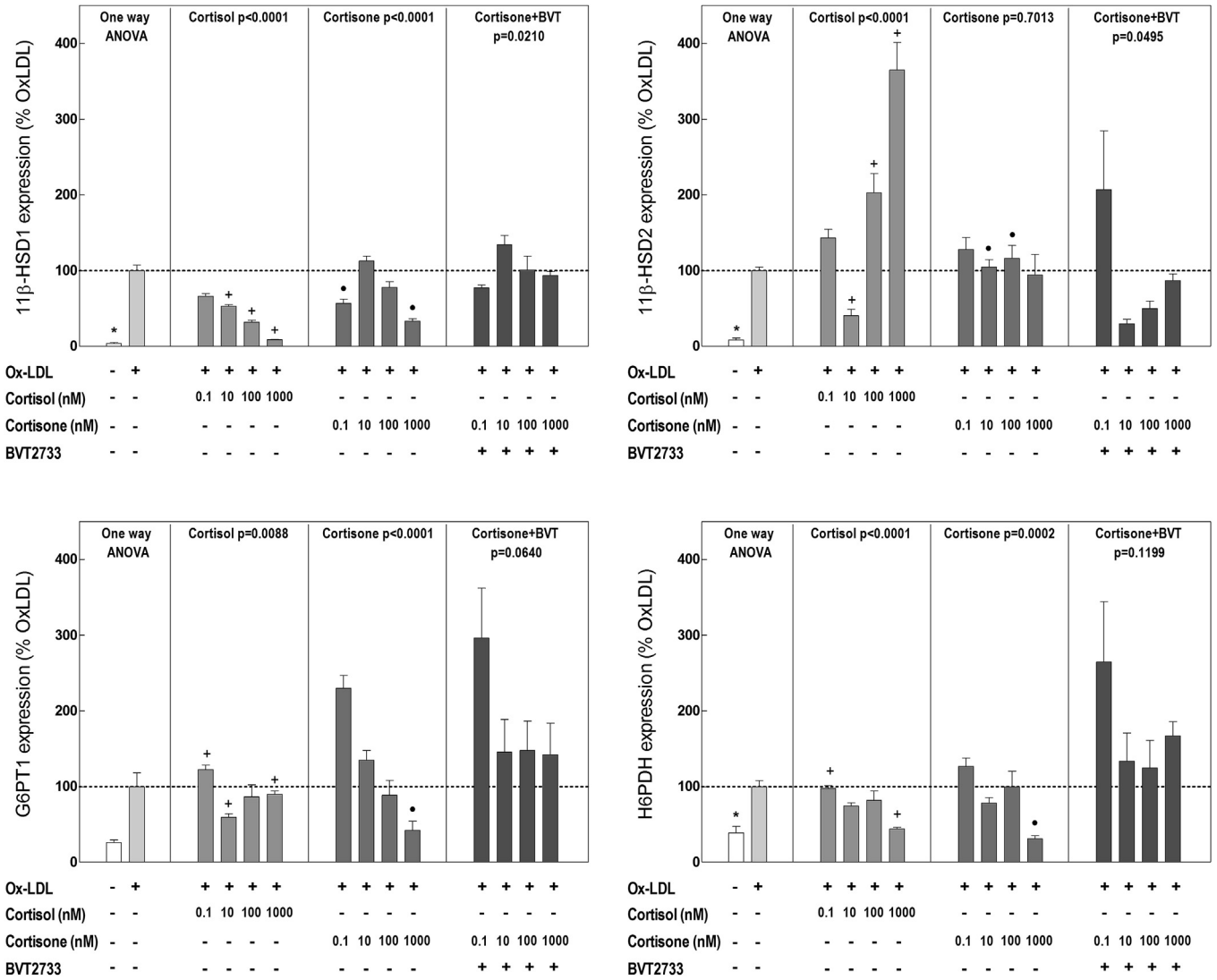


Fig. 5. Expression of genes involved in glucocorticoid availability in THP1 macrophages incubated with OxLDL or with OxLDL plus cortisol or cortisone or cortisone with BVT.2733: 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 (11βHSD1, 11βHSD2), glucose-6-phosphate translocase 1 (G6T1), hexose-6-phosphate dehydrogenase (H6PDH). Data are expressed as percentage of expression in cells incubated with OxLDL. One way Anova significance for each group of hormone treatment is shown in the graph. Student's *t*-test for discrete points was used. Symbols denote significance between: * without OxLDL vs with OxLDL; + Cortisol vs Cortisone; ● Cortisone vs Cortisone with BVT.2733. P values <0.05 were considered significant.

activity, and it has been reported that 11βHSD1 deficiency/inhibition in the organism is atheroprotective whereas 11βHSD2 deficiency/inhibition accelerates atherosclerosis [45]. However, 11βHSD1 and 11βHSD2 expression in macrophages, and their contribution to the development of foam cells and progression of atherosclerosis, remain unclear. The expression of 11βHSD1 in macrophages is dependent on their activation state [46]. Thus, M1 polarization of native macrophages by lipopolysaccharides induces 11βHSD1 expression; in contrast, polarization to M2 by IL4/IL13 has little effect on 11βHSD1 expression. However, if monocytes are differentiated to macrophages in presence of IL4/IL13, the activity of 11βHSD1 is even higher than in M1 macrophages [47]. Here, we found an increase in both isozyme expression elicited by OxLDL but to a greater extent in 11βHSD1. This increase in 11βHSD1 is concordant with the observed elevated expression of TNFα, which is a potent inducer of 11βHSD1 expression [48,49]. On the other hand, the expression of 11βHSD2 in immune cells has only been described in some human diseases, for example synovial macrophage expression [50] and transient expression in peripheral blood

mononuclear cells [51] of patients with arthritis rheumatoid. The synovial macrophages in rheumatoid arthritis could reflect an adaptation to enable an altered proliferation and differentiation in a chronically inflamed environment [52] as in the formation of atherosclerotic plaque.

Our results show that cortisol has an inhibitory effect on 11βHSD1 expression and a dual effect on 11βHSD2. Low concentrations did not affect or inhibited 11βHSD2 expression, but the highest cortisol concentration strongly induced its expression. This profile is coherent with a protective response to excessive cortisol levels; thus, when the concentration of cortisol increases, cells tend to reduce its levels through repressing 11βHSD1 and increasing 11βHSD2. Interestingly, cortisone had a different effect. It did not affect 11βHSD2 expression, and the inhibition of 11βHSD1 expression was more attenuated, since cortisone must be activated to cortisol by 11βHSD1 activity. It could be expected cortisone inhibiting 11βHSD2 expression due to an excess of product, but we did not find any effect.

In conclusion, our results indicate a direct effect of

glucocorticoids on macrophages in atherosclerosis progression limiting the accumulation of lipids. Thus, in presence of OxLDL, cortisol reduce the expression of genes involved in OxLDL uptake and cholesterol re-esterification, but also inhibited those involved in cholesterol output perhaps as a consequence of a minor influx (Fig. 6). In addition, cortisone can mimic all the effects of cortisol and the inhibition of 11 β HSD1 activity blocked the cortisone action

in macrophages. All the facts would indicate a key role of 11 β HSD1 modulating the availability and local action of glucocorticoids in atherogenic progression. Our observations point to a direct anti-atherogenic role of glucocorticoids on THP1 macrophages. The molecular mechanisms mediating those effects on cholesterol homeostasis deserve further research.

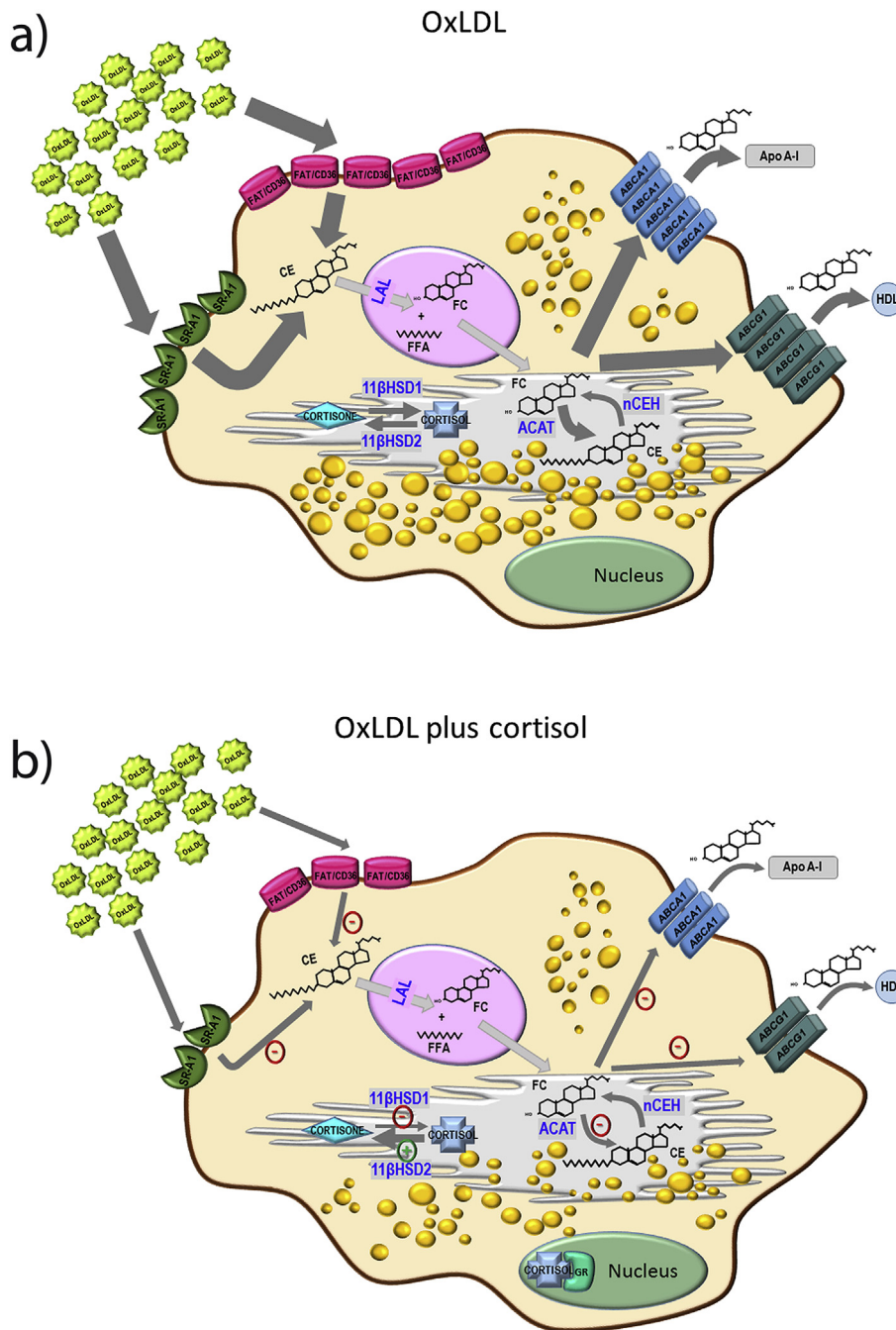


Fig. 6. Schematic representation of the effects caused by OxLDL(a) and OxLDL plus cortisol (b) in THP1 macrophages. The arrows thickness indicates the intensity of the pathway. In b), the pathways are marked in red (-) when cortisol inhibits them and in green (+) when cortisol activates them. Cortisol decreased the influx of OxLDL, reducing SRA1 and FAT/CD36 expression, decreased cholesterol esterification by ACAT and finally diminished the efflux of cholesterol through ABCA1 and ABCG1 resulting in a minor lipid accumulation inside cells. FAT/CD36 = fatty acid translocase; SRA1 = Scavenger receptor class A type 1; ACAT = acyl-CoA:cholesterol acyltransferase; nCEH = neutral cholesterol ester hydrolase 1; ABCA1 = ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1 = ATP-binding cassette transporter G; 11 β HSD1 = 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 11 β HSD2 = 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; FC= Free cholesterol; CE= Cholesterol esters; FFA= Free fatty acids; LAL= Lysosomal acid lipase; Apo A-I: Apolipoprotein A1; HDL= High density lipoprotein.

- [50] R. Hardy, E.H. Rabbitt, A. Filer, et al., Local and systemic glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 67 (9) (2008) 1204–1210.
- [51] N. Olsen, T. Sokka, C.L. Seehorn, et al., A gene expression signature for recent onset rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells, *Ann. Rheum. Dis.* 63 (11) (2004) 1387–1392.
- [52] K. Chapman, M. Holmes, J. Seckl, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action, *Physiol. Rev.* 93 (3) (2013) 1139–1206.