



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA
Y TUMORES HORMONODEPENDIENTES**

**ESTRÓGENOS AMBIENTALES Y FERTILIDAD:
EFECTO DE XENOESTRÓGENOS SOBRE EL EJE
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL**

**CONSECUENCIAS DE LA EXPOSICIÓN
NEONATAL TEMPRANA SOBRE EL SISTEMA
LÍMBICO**

Autor: Lic. Lucas Monje

Director: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Co-Director: Dra. Jorgelina Varayoud

Santa Fe

2009

***A Ana, por su enorme apoyo y comprensión. Por su inmensa generosidad
y por darme tanto amor y felicidad.***

***A mis padres, Laura y Rubén, por ser mi orgullo y ejemplos. Por
incentivarme en cada paso, mi eterno agradecimiento.***

***A mis queridos hermanos, Fati, Coco y Fer por acompañarme
incondicionalmente siempre.***

Agradecimientos

A mis directores, el Dr. Guillermo Ramos y la Dra. Jorgelina Varayoud quienes me brindaron todo el apoyo y la confianza necesarios para poder crecer, por sus consejos y por hacer que cada día en el laboratorio valga la pena.

A los directores del LETH, el Dr. Enrique Luque y la Dra. Mónica Muñoz de Toro, quienes generosamente me abrieron las puertas de sus laboratorios.

A mis amigos y compañeros del LETH con quienes tuve el placer de compartir estos años, Marce, Juanca, Adriana, Laurita, Florencia, Guille M., Maricel, Cora, Horacio, German, Verónica, Milena, Melina, Marianela, Virginia, Tania, Pablo, Sonia, Juan.

A toda mi familia, a los que están y a los que se han ido.

A la familia Fariña por su gran apoyo durante estos años.

A los infatigables compañeros de eventos lúdico-deportivos que hicieron los viernes un poquito más duros, especialmente a quienes gozaron de una asistencia casi perfecta: Carlos F., Gaucho, Carlos Gruñón, Cesar, Daniel, Cocó, Pablo M.

A mis compañeros y amigos de todos mis años de facultad.

A los involuntarios protagonistas de esta tesis, perdón y gracias.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por brindarme los medios para realizar este trabajo de tesis.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral, por haber hecho posible la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron en esta etapa de mi vida.

LISTADO DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis han sido publicados y presentados en congresos.

Publicaciones

- **Monje L**, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque E H, Ramos J G. Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nucleus controlling estrous cyclicity. **Reproductive Toxicology** 2009, en evaluación.
- **Monje L**, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque E H, Ramos J G. Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. **Reproductive Toxicology** 2009 Dic 28(4): 435-442.
- **Monje L**, Varayoud J, Luque E H, Ramos J G. Neonatal exposure to bisphenol A (BPA) modifies the abundance of estrogen receptor alpha (ERa) transcripts with alternative 5' untranslated regions in the female rat preoptic area. **Journal of Endocrinology** 2007 Jul 194(1): 201-212.
- Ramos J G, Varayoud J, **Monje L**, Moreno-Piovano G, Muñoz-de-Toro M, Luque E H. Diethylstilbestrol alters the population dynamic of neural precursor cells in the neonatal male rat dentate gyrus. **Brain Research Bulletin** 2007 Mar 71(6): 619-627.

Presentaciones a Congresos

- **Monje Lucas**, Varayoud Jorgelina, Muñoz de Toro Mónica, Luque Enrique H., Ramos Jorge Guillermo. “¿Puede el Bisfenol A (BPA) alterar la conducta sexual? Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre genes moduladores de la respuesta sexual en la rata hembra adulta”. **LIII Reunión Anual de la SAIC y la SAFIS**, Mar del Plata,

Argentina, Noviembre de 2008.

- **Monje Lucas**, Varayoud Jorgelina, Muñoz de Toro Mónica, Luque Enrique H., Ramos J. Guillermo. “La exposición neonatal a Bisfenol A (BPA) altera la expresión y maduración del mensajero de LHRH en el hipotálamo de la rata adulta”. **LII Reunión Anual de la SAIC**, Mar del Plata, Argentina, Noviembre de 2007.
- **Monje Lucas**, Varayoud Jorgelina, Muñoz de Toro Mónica, Luque Enrique H., Ramos J. Guillermo. “¿Por qué los perturbadores endocrinos pueden producir efectos contrarios de acuerdo a la dosis? Acción del Bisfenol A sobre la transcripción del receptor de estrógeno alfa hipotalámico”. **LI Reunión Anual de la SAIC**, Mar del Plata, Argentina, Noviembre de 2006.
- **Monje Lucas**, Varayoud Jorgelina, Muñoz de Toro Mónica, Luque Enrique H., Ramos J. Guillermo. “Mecanismos moleculares de la diferenciación sexual del hipotálamo: Acción del dietilstilbestrol sobre la transcripción del receptor de estrógeno alfa (REa)”. **LI Reunión Anual de la SAIC**, Mar del Plata, Argentina, Noviembre de 2006.
- **Monje Lucas**, Varayoud Jorgelina, Muñoz de Toro Mónica, Luque Enrique H., Ramos J. Guillermo. “La exposición a bisfenol A (BPA) durante el período postnatal temprano altera la expresión de los receptores de estrógeno alfa (REa) y beta (REb) en el hipotálamo de la rata hembra”. **50º Reunión Anual de la SAIC**, Mar del Plata, Argentina, Noviembre de 2005.
- **Monje Lucas**, Moreno Guillermo, Ramos Guillermo, Varayoud Jorgelina, Muñoz de Toro Mónica, Luque Enrique. “Efectos de la exposición a estrógenos durante el período postnatal temprano sobre la generación de nuevas neuronas en el hipocampo de la rata”. **III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de**

Comunicaciones Técnico Científicas, Santa Fe, Junio de 2005.

- Ramos J. Guillermo, Varayoud Jorgelina, **Monje Lucas**, Muñoz de Toro Mónica, Luque Enrique H. “La exposición a dietilstilbestrol (DES) durante el período postnatal temprano, disminuye la proliferación de progenitores neuronales del hipocampo pero aumenta la supervivencia neuronal”. **Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas**, Mar del Plata, Argentina, Noviembre de 2004.

INDICE GENERAL

Abreviaturas utilizadas	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1- Estructura y función del sistema límbico	2
1.2- Evolución del sistema límbico en mamíferos	4
1.3- Diferenciación sexual del cerebro en mamíferos	4
1.4- Mecanismos de acción de los estrógenos	6
1.5- Mecanismos moleculares encargados de regular la neurofisiología reproductiva y el comportamiento sexual de la rata hembra adulta	14
1.6- Estrógenos y neurogénesis en estructuras hipocampales	18
1.7- Perturbadores endocrinos	22
2- OBJETIVOS	28
2.1- Objetivo General	29
2.2- Objetivos Particulares	29
3- MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1- Hormonas y xenoestrógenos utilizados	32
3.2- Animales utilizados y modelo de exposición neonatal a xenoestrógenos	32
3.3- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la diferenciación sexual del hipotálamo	33
3.3.1- Obtención de las muestras	33
3.3.2- Transcripción reversa y análisis de la expresión de ER α y sus	34

<i>promotores transcripcionales mediante PCR en tiempo real</i>	
<i>3.3.3- Extracción de ADN genómico y modificación mediante bisulfitación</i>	36
<i>3.3.4- Análisis combinado de bisulfitación restricción (COBRA)</i>	37
<i>3.3.5- Detección de la expresión hipotalámica de ERα mediante inmunohistoquímica</i>	40
<i>3.3.6- Cuantificación de la expresión de ERα en el área preóptica mediante análisis de imágenes</i>	41
<i>3.3.7- Niveles séricos de 17β-estradiol en ratas prepuberales</i>	41
<i>3.3.8- Análisis estadístico</i>	42
<i>3.4- Desarrollo de un anticuerpo policlonal específico para la detección mediante inmunohistoquímica del represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA)</i>	42
<i>3.4.1- Diseño bioinformático, amplificación y clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión del antígeno de REA</i>	42
<i>3.4.2- Expresión y purificación del antígeno de REA</i>	44
<i>3.4.3- Generación y purificación del anticuerpo policlonal específico para la detección de REA</i>	44
<i>3.4.4- Caracterización de los anticuerpos para la detección de REA</i>	45
<i>3.4.4.1- Western blot</i>	45
<i>3.4.4.2- Inmunohistoquímica</i>	46
<i>3.4.4.3- Doble inmunofluorescencia</i>	47
<i>3.5- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la respuesta hipotalámica a los estrógenos en hembras adultas</i>	47
<i>3.5.1- Obtención de las muestras</i>	47

3.5.2- Citología vaginal	48
3.5.3- Estudio piloto de la inducción estrogénica del pico de LH en ratas ovariectomizadas	48
3.5.4- Inducción estrogénica del pico de LH en ratas ovariectomizadas neonatalmente expuestas a BPA	49
3.5.5- Transcripción reversa y análisis de la expresión del ARNm de LHRH mediante PCR en tiempo real	50
3.5.6- Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica	51
3.5.7- Cuantificación de la expresión hipotalámica de proteínas mediante análisis de imágenes	52
3.5.8- Análisis de la expresión de las isoformas de PR mediante western blot	52
3.5.9- Evaluación de la conducta sexual	53
3.5.10- Niveles séricos de LH	54
3.5.11- Análisis estadístico	54
3.6- Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo	55
3.6.1- Obtención de las muestras	55
3.6.2- Expresión de proteínas en el hipocampo de ratas macho expuestas posnatalmente a DES	55
3.6.3- Caracterización del fenotipo de CPN en estado inactivo o de proliferación	56
3.6.4- Detección de apoptosis in situ	57
3.6.5- Morfometría	57
3.6.6- Análisis de la expresión hipocámpica de los mensajeros de VEGF y BDNF mediante PCR en tiempo real	59

3.6.7- <i>Análisis estadístico</i>	61
4- RESULTADOS	62
4.1- <i>Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la diferenciación sexual del hipotálamo</i>	63
4.1.1- <i>Efectos de la exposición a dosis altas y bajas de BPA sobre la expresión del ARNm de ERα en el área preóptica hipotalámica de ratas hembra prepuberales</i>	63
4.1.2- <i>La exposición neonatal a BPA altera la abundancia relativa de los transcriptos de ERα provenientes de distintas secuencias promotoras</i>	64
4.1.3- <i>Estado de metilación de los promotores transcripcionales de ERα en ratas hembra prepuberales</i>	67
4.1.4- <i>Expresión diferencial de la proteína de ERα en el núcleo AvPv de crías de rata y ratas prepúberes</i>	68
4.1.5- <i>Niveles séricos de 17β-estradiol en hembras prepuberales</i>	70
4.2- <i>Desarrollo de un anticuerpo policlonal específico para la detección del represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA)</i>	70
4.2.1- <i>Diseño y obtención de un polipéptido específico</i>	70
4.2.2- <i>Generación y caracterización del anticuerpo policlonal anti-REA</i>	73
4.3- <i>Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre los mecanismos hipotalámicos que controlan el ciclo estral y el pico preovulatorio de LH</i>	75
4.3.1- <i>Estudio de los patrones de ciclado de ratas adultas expuestas neonatalmente a una dosis baja de BPA</i>	75
4.3.2- <i>Horario de inducción del pico de LH y patrones temporales del procesado del pre-ARNm de LHRH (estudio piloto)</i>	76
4.3.3- <i>La exposición neonatal a BPA altera el procesado hipotalámico del pre-ARNm de LHRH en hembras adultas</i>	77

<i>4.3.4- La exposición neonatal a BPA altera la expresión de ERα y PR en los núcleos AvPv y Arc</i>	78
<i>4.3.5- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de los cofactores de transcripción SRC-1 y REA en los núcleos AvPv y Arc de hembras adultas</i>	79
<i>4.3.6- Inducción estrogénica del pico de LH en ratas neonatalmente expuestas a BPA</i>	82
<i>4.4- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre mecanismos hipotalámicos estrógeno-dependientes encargados de controlar la conducta sexual</i>	83
<i>4.4.1- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de ERα y PR en los núcleos MPN y VMHvl</i>	83
<i>4.4.2- Isoformas de PR presentes en el hipotálamo de hembras expuestas a BPA</i>	84
<i>4.4.3- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de los factores de transcripción SRC-1 y REA en los núcleos MPN y VMHvl</i>	85
<i>4.4.4- Estudio de la conducta sexual en hembras expuestas neonatalmente a BPA</i>	86
<i>4.5- Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo</i>	88
<i>4.5.1- La exposición neonatal a xenoestrógenos altera la dinámica poblacional de las CPN</i>	88
<i>4.5.1.1- Proliferación y Apoptosis de las CPN en DPN8</i>	88
<i>4.5.1.2- Supervivencia de las CPN en DPN21</i>	92
<i>4.5.1.3- Proliferación de las CPN en DPN21</i>	92
<i>4.5.1.4- Expresión de ERα en las CPN</i>	95
<i>4.5.1.5- Volumen de la CCG y la ZSG</i>	95

4.5.2- <i>La expresión hipocampal de los genes VEGF y BDNF es afectada por el tratamiento neonatal con DES</i>	95
5- DISCUSIÓN	97
5.1- <i>La exposición neonatal a BPA altera la diferenciación sexual del área preóptica hipotalámica de la rata hembra</i>	98
5.2- <i>La exposición neonatal a BPA altera el procesado hipotalámico del pre-ARNm de LHRH y la respuesta estrógeno-dependiente de núcleos neuronales encargados de controlar el ciclo estral en la rata adulta</i>	104
5.3- <i>La exposición neonatal a BPA altera los mecanismos estrógeno-dependientes encargados de regir la conducta sexual en la rata hembra adulta</i>	111
5.5- <i>La exposición a DES altera la dinámica poblacional de las células precursoras neurales en el giro dentado de ratas macho</i>	116
6- CONCLUSIONES	125
7- RESUMEN	129
8- ABSTRACT	140
9- BIBLIOGRAFÍA	150

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AR	Receptor de andrógenos
Arc	Núcleo neuronal arcuato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AvPv	Núcleo neuronal anteroventral periventricular
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BPA	Bisfenol A
BrdU	Bromo-deoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
CCG	Capa de células granulares
CL	Coeficiente de lordosis
CPN	Células progenitoras neuronales
C _t	Ciclo umbral
DES	Dietilstilbestrol
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
DPN	Día posnatal
EB	Benzoato de estradiol
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
ER	Receptor de estrógenos
ER α	Receptor de estrógenos alfa
ER β	Receptor de estrógenos beta
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína verde fluorescente
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
h	Horas
IHQ	Inmunohistoquímica
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
LH	Hormona luteinizante

LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante
LOAEL	Nivel más bajo de efectos adversos observados
L19	Proteína ribosomal L19
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimol
MPN	Núcleo neuronal medial preóptico
nmoles	Nano mol
OVX	Ovariectomía
P	Progesterona
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salino
pmoles	Picomoles
PR	Receptor de progesterona
p/v	Peso en volumen
REA	Represor de la acción de los receptores de estrógeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa luego de una transcripción reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
seg	Segundos
E.E.M.	Error estándar de la media
SRC-1	Coactivador de los receptores esteroides 1
TL	Tasa de lordosis
TTBS	Buffer de Tris salino con Tween-20
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VMHvl	Núcleo neuronal ventromedial hipotalámico, región ventrolateral
v/v	Volumen en volumen
ZSG	Zona subgranular
°C	Grados Celsius
µm	Micrometro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
18sRNA	Subunidad ribosomal 18s
5'UTR	Región no traducida ubicada en dirección 5'

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real del estudio de los efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la diferenciación sexual del hipotálamo.	35
TABLA 2. Cebadores utilizados en los experimentos de COBRA del estudio de los efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la diferenciación sexual del hipotálamo.	39
TABLA 3. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real del estudio de los efectos de la exposición neonatal a DES sobre la neurogénesis en el hipocampo.	60
TABLA 4. Análisis cuantitativo de los efectos de la exposición neonatal a DES sobre los volúmenes de CCG y ZSG.	95

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema representativo de la organización tridimensional del sistema límbico en el cerebro de la rata.	3
Figura 2 Mecanismos de acción postulados para los receptores de estrógeno.	7
Figura 3 Comparación de las regiones promotoras del ER α humano, de ratón y de rata.	10
Figura 4 Reclutamiento de coactivadores y corepresores por el receptor nuclear.	12
Figura 5 Mecanismos de acción de los corepresores de ER.	13
Figura 6 Niveles hormonales de progesterona, prolactina, estradiol, hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante durante el ciclo estral de la rata.	15
Figura 7 Organización genómica de la región codificante del LHRH de rata.	16
Figura 8 Corte histológico en el plano coronal representativo de la región hipocámpica estudiada coloreado con la tinción de Nissl.	18
Figura 9 Identificación de células progenitoras neuronales en la zona subgranular del hipocampo de ratones transgénicos portando el gen de la proteína verde fluorescente bajo el dominio del promotor de nestina.	19
Figura 10 Estructura molecular de algunas hormonas esteroides y xenoestrógenos.	24
Figura 11 Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la histoarquitectura de la glándula mamaria y de la próstata de rata.	26
Figura 12 Diagrama de los procedimientos de PCR en tiempo real para los promotores de ER α y el análisis combinado de bisulfitación-restricción (COBRA).	38
Figura 13 Plásmido pGEX4T-3 y estrategia de clonado direccional utilizados para la expresión del antígeno de REA como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-REA).	43

Figura 14 Esquema representativo del área hipocámpica evaluada.	58
Figura 15 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión del ARNm de ER α en el área preóptica de ratas hembra de DPN8 y DPN21.	63
Figura 16 Promotores del gen ER α utilizados en el área preóptica de la rata.	65
Figura 17 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la abundancia relativa de los transcritos provenientes de los distintos exones 5'UTR del gen de ER α en el área preóptica de ratas de DPN8 y DPN21.	66
Figura 18 Análisis bioinformático de las islas CpG presentes en la región promotora del gen de ER α .	67
Figura 19 Determinación del estatus de metilación de las islas CpG del promotor ER α -OT.	68
Figura 20 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la traducción del gen de ER α en el núcleo AvPv del área preóptica.	69
Figura 21 Niveles de estradiol sérico en animales prepuberales.	70
Figura 22 Selección de un fragmento de la secuencia del gen de REA para ser utilizado como antígeno para la producción de un anticuerpo policlonal específico.	71
Figura 23 Purificación del antígeno GST-REA mediante cromatografía de afinidad.	72
Figura 24 Western blot para los anticuerpos anti-REA obtenidos y purificados de los conejos 1 y 2.	73
Figura 25 Análisis mediante inmunohistoquímica del anticuerpo anti-REA obtenido del conejo 2.	74
Figura 26 Ensayo de doble inmunofluorescencia para REA/NeuN en hipotálamo de rata hembra adulta.	75
Figura 27 Patrones de ciclicidad estral en hembras neonatalmente expuestas a BPA.05.	76
Figura 28 Horario de inducción del pico de LH y patrones temporales del	77

procesado del pre-ARNm de LHRH.

- Figura 29** Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión citoplasmática del ARNm maduro de LHRH y el ARN de LHRH sin procesar conteniendo el intron A. 78
- Figura 30** Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de ER α y PR en los núcleos hipotalámicos AvPv y Arc de hembras adultas. 79
- Figura 31** Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de los cofactores de transcripción SRC-1 y REA en los núcleos hipotalámicos AvPv y Arc de hembras adultas. 80
- Figura 32** Fotomicrografías representativas de la detección mediante inmunohistoquímica de ER α , PR y SRC-1 en el núcleo AvPv de ratas hembra control, BPA20 y BPA.05. 81
- Figura 33** Fotomicrografías representativas de la detección mediante inmunohistoquímica de ER α , PR y SRC-1 en el núcleo Arc de ratas hembra control, BPA20 y BPA.05. 82
- Figura 34** Inducción estrogénica mediante implantes del pico vespertino de LH en ratas adultas ovariectomizadas neonatalmente expuestas a BPA. 83
- Figura 35** Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión de ER α y PR en los núcleos MPN y VMHvl de ratas hembra adultas. 84
- Figura 36** Fotografía representativa del análisis mediante western blot de la expresión hipotalámica de las isoformas de PR en los animales experimentales. 85
- Figura 37** Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión de cofactores de transcripción SRC-1 y REA en los núcleos MPN y VMHvl de ratas hembra adultas. 85
- Figura 38** Fotomicrografías representativas de la detección mediante inmunohistoquímica de ER α , PR, REA y SRC-1 en el núcleo VMHvl de ratas hembra control, BPA20 y BPA.05. 86
- Figura 39** Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la conducta 87

sexual.

Figura 40 Secuencias de fotogramas representativos de los parámetros de conducta sexual evaluados.	88
Figura 41 Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la dinámica poblacional de las CPN en crías macho de DPN8.	90
Figura 42 Cuantificación de los resultados obtenidos mediante la técnica de TUNEL y mediante inmunohistoquímica simple y doble en el giro dentado de animales de DPN8.	91
Figura 43 Supervivencia de células BrdU (+) en el giro dentado de machos expuestos neonatalmente a DES.	93
Figura 44 Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la proliferación y apoptosis de CPN en DPN21.	94
Figura 45 Efectos de la exposición neonatal a DES sobre los niveles de expresión del ARNm de VEGF y BDNF en el giro dentado de ratas de DPN8 y DPN21.	96

1- Introducción

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Estructura y función del sistema límbico

El sistema límbico está conformado por varias estructuras cerebrales interconectadas ubicadas alrededor del tálamo y debajo de la corteza cerebral. En los mamíferos este conjunto de estructuras es el encargado de gestionar respuestas fisiológicas adecuadas ante estímulos medioambientales específicos y de integrar la información ambiental a través del aprendizaje. En el año 1878 el médico francés Paul Broca fue el primero en utilizar el término “*le grand lobe limbique*” para referirse a esta zona particular del cerebro (Broca, 1878) y medio siglo después, James Papez fue el encargado de describir las interconexiones existentes entre las distintas estructuras de este sistema en lo que actualmente se conoce como el “Circuito de Papez” (revisado en Papez, 1995). Entre las estructuras más importantes que conforman el sistema límbico se destacan el hipotálamo y el hipocampo (Fig.1). El hipotálamo juega un papel crítico en la coordinación de la expresión de conductas reproductivas y respuestas fisiológicas ante estímulos ambientales. Su proximidad anatómica y fisiológica con la hipófisis lo convierte en un medio efectivo para coordinar diversos procesos homeostáticos a través de la regulación neuroendocrina de la secreción de hormonas. Las interconexiones del hipotálamo con el resto del sistema límbico le permiten también coordinar de manera efectiva respuestas neuroendocrinas con estímulos ambientales, los cuales regulan el comportamiento motivado. Por su parte, el hipocampo se ha asociado desde hace tiempo a la ejecución de funciones cognitivas y a los procesos de consolidación de la memoria, mientras que la pérdida de su funcionalidad se ha relacionado con la aparición de demencias y patologías neurodegenerativas.

La principal función del hipocampo es codificar la nueva memoria, creando patrones espacio-temporales en una memoria inicial que eventualmente se envía a la corteza cerebral para su almacenamiento a largo plazo. Según este concepto el hipocampo no actúa como una estructura de almacenamiento, sino que participa activamente en la construcción de nuevas memorias y en procesos cognitivos particulares tales como la toma de decisiones, planificación y aprendizaje (Maguire y col., 2000).

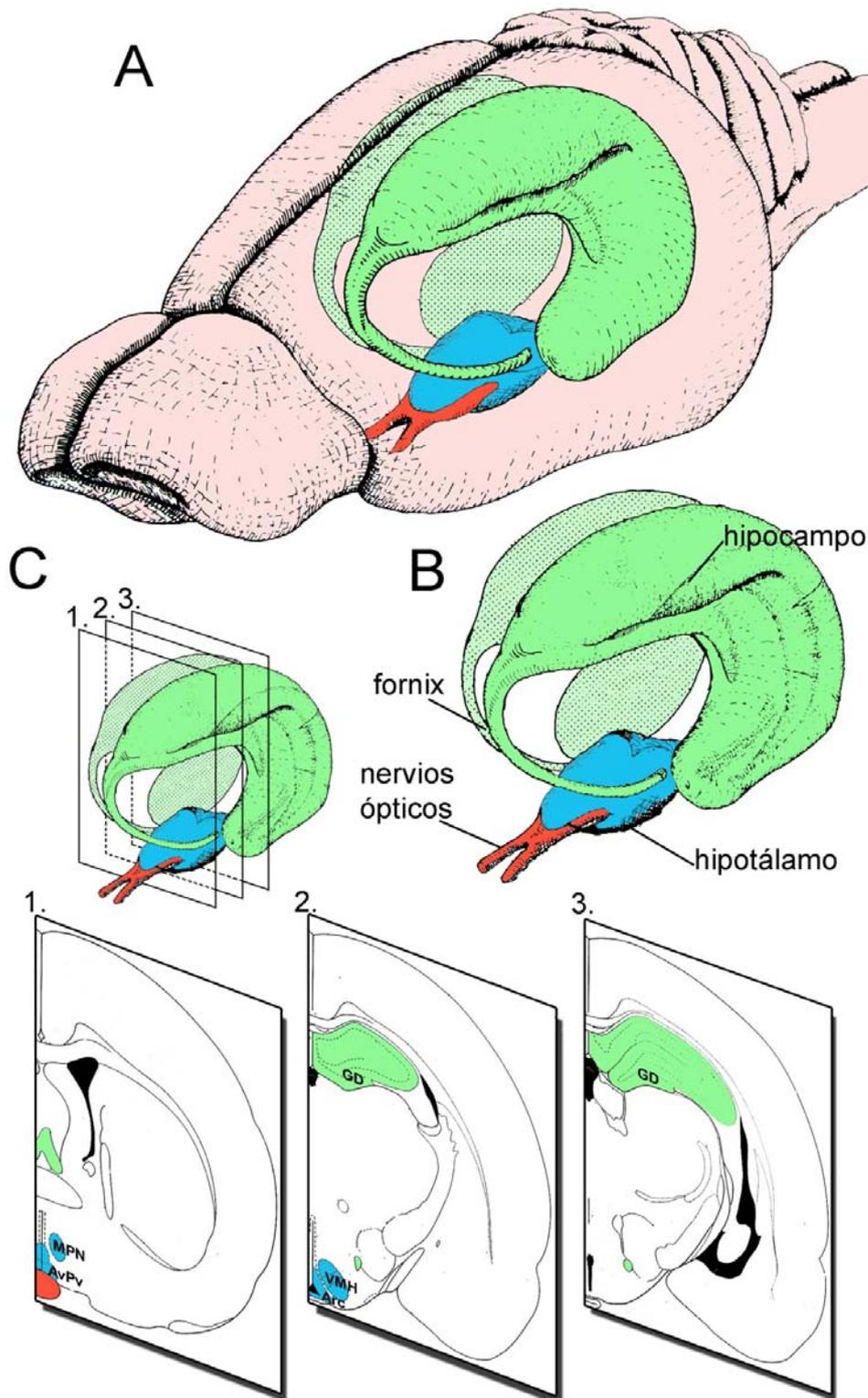


Figura 1 Esquema representativo de la organización tridimensional del sistema límbico en el cerebro de la ratona. **(A)** Ubicación espacial de los principales componentes del sistema límbico en el cerebro de la ratona. **(B)** En verde pueden observarse el fornix y el hipocampo, en rojo los nervios ópticos y en azul el hipotálamo. **(C)** Ubicación rostro-caudal de los cortes 1, 2 y 3 en el plano coronal. 1. Hipotálamo anterior. AvPv, núcleo anteroventral periventricular; MPN, núcleo medial preóptico. 2. Hipotálamo medio-basal y principio de la formación hipocámpica. Arc, núcleo arcuato; VMH, núcleo ventromediano; GD, giro dentado. 3. Región medial del hipocampo. Modificado de Paxinos y Watson 2005.

1.2- Evolución del sistema límbico en mamíferos

Una de las principales consecuencias de la evolución del cerebro fue la de producir una arquitectura neuronal que integre la información proveniente del ambiente externo con señales del medio interno, reflejando aspectos importantes del estado fisiológico del individuo. Esta integración permitió la elaboración de conductas adaptativas y respuestas fisiológicas que son esenciales tanto para la supervivencia del individuo, como así también para la propagación de la especie. Desde una perspectiva evolutiva, las respuestas fisiológicas más adaptativas son aquellas que aseguran una reproducción exitosa. Cabe destacar que los beneficios de dichas conductas adaptativas serían intrascendentes si el individuo careciera de la salud reproductiva necesaria para legar a su prole su información genética. Asimismo, la coordinación de eventos fisiológicos-reproductivos con una conducta sexual adecuada en el individuo es un prerequisite fundamental para una reproducción exitosa. Es por esto que resulta beneficioso para numerosas especies de mamíferos que sus hembras exhiban conductas de sollicitación apropiadas en coordinación con el control neuroendocrino de la ovulación. Del mismo modo, los machos también presentan requisitos similares de coordinación fisiológica; un individuo con esperma maduro y listo para fecundar una hembra no tendría chance de hacerlo si exhibiera conductas de combate o lucha. Por consiguiente, el futuro de una especie depende, al menos en parte, de la habilidad de sus miembros para coordinar conductas sexuales y procesos fisiológicos reproductivos en respuesta a estímulos específicos. Esta coordinación entre la conducta y la fisiología debe también ser fidedigna, lo cual depende en gran parte de cuan consistentemente se construyen y regulan los circuitos neurales que subyacen la integración neuroendocrina (Simerly, 2002).

1.3- Diferenciación sexual del cerebro en mamíferos

En los mamíferos, machos y hembras de una misma especie presentan diferentes patrones de conducta sexual y diferente fisiología neuroendocrina

(Gorski y Jacobson, 1981; Gerall y Givon, 1992). Estas diferencias son tan vitales para la continuidad de la especie que distintos mecanismos de diferenciación han evolucionado para producir sistemas neurales diferentes pero a la vez complementarios, que aseguren la expresión coordinada de las funciones reproductivas de machos y hembras. El principio central de la diferenciación sexual en numerosos mamíferos es que el cerebro es “*bipotencial*” y se desarrolla de forma diferente en machos y hembras bajo la influencia de hormonas esteroides sexuales durante el período perinatal. En ratas macho la secreción perinatal de andrógenos por parte de los testículos diferenciados produce dos picos en la concentración plasmática de testosterona, el primero de estos máximos ocurre alrededor del día 18 de gestación, y el segundo se observa aproximadamente 2 horas después del nacimiento (Weisz y Ward, 1980). La exposición del cerebro en desarrollo a estos altos niveles circulantes de testosterona, convertida luego en estradiol intracerebralmente mediante la enzima P450-aromatasa, causa cambios estructurales y funcionales que se mantienen a lo largo de toda la vida del individuo. Por lo tanto, el ambiente hormonal en el período perinatal determina qué tipo de conducta sexual expresará el individuo (conducta de macho o hembra), o si la hipófisis será capaz de provocar un pico preovulatorio de gonadotropinas en respuesta a los estrógenos y la progesterona. Una importante región diana de dichos cambios es el hipotálamo, el cual juega un papel fundamental en la coordinación entre el comportamiento sexual y la fisiología del animal en respuesta a estímulos medioambientales. Estos cambios hormono-dependientes son específicos de ciertas áreas del cerebro en las cuales se observa una gran densidad de receptores de esteroides (Simerly, 2002). El dimorfismo sexual hormono-dependiente del cerebro fue reportado inicialmente como núcleos neuronales de mayor tamaño presentes en los machos, en comparación a hembras y a machos neonatalmente castrados (Pfaff, 1966). Subsecuentemente, Raisman y Field (Raisman y Field, 1971) demostraron que el área preóptica dorsal de las hembras posee un mayor número de espinas dendríticas comparado con los machos y, Gorski y *col.* (Gorski y *col.*, 1978) demostraron que el área preóptica de los machos es de cuatro a seis veces más grande que en las hembras, pudiendo este

dimorfismo sexual ser revertido mediante la exposición perinatal de las hembras a testosterona. Estos resultados fueron los primeros en demostrar que el rol de los esteroides sexuales en el desarrollo y en el comportamiento sexual tiene una base estructural.

1.4- Mecanismos de acción de los estrógenos

Los estrógenos llevan a cabo sus funciones biológicas a través de los receptores de estrógeno (ER, del inglés *Estrogen Receptor*), que incluyen principalmente a el receptor clásico ER α y el más reciente ER β (Kuiper y col., 1996). Ambos receptores tienen una alta expresión en estructuras límbicas (Laflamme y col., 1998) y entre estos dos receptores se han demostrado importantes diferencias en su acción biológica tales como su afinidad por compuestos estrogénicos (Kuiper y col., 1997), las secuencias específicas de ADN reconocidas (Paech y col., 1997; Cowley y Parker, 1999) y los patrones tisulares de expresión (Kuiper y col., 1997). Actualmente se postula que las acciones del estradiol no estarían mediadas solamente por los receptores ER α y ER β , ya que el silenciamiento de la expresión de estos receptores no elimina todos los efectos de los estrógenos. Cabe destacar que en muchos sistemas precisamente eso es lo que se observa. Por ejemplo; en el control de la reproducción, tanto la conducta sexual como la regulación de la ovulación son totalmente eliminadas en los animales en los que el ER α fue silenciado (Ogawa y col., 1996; Rissman y col., 1997a; Rissman y col., 1997b; Micevych y col., 2003; Wintermantel y col., 2006). Por otro lado, la discriminación social estaría severamente comprometida en animales con los receptores ER α y ER β silenciados (Choleris y col., 2006), como también lo estarían la neuroprotección en el cortex (Dubal y col., 2001) y la alimentación (Thammacharoen y col., 2008). Sin embargo, la remoción de los receptores clásicos de estrógeno (ER α y ER β) no elimina por completo la captación de estradiol en ciertas regiones del cerebro. En el hipotálamo y amígdala de ratones dobles knockout para ER α /ER β se observó captación de estradiol radiactivo, lo cual sugiere la existencia de otras proteínas capaces de unir estrógeno (Shughrue y col., 2002). Para explicar estos resultados otras proteínas capaces de unir

estrógeno fueron propuestas (Razandi y *col.*, 1999; Toran-Allerand y *col.*, 2002; Li y *col.*, 2003a; Qiu y *col.*, 2003; Thomas y *col.*, 2005; Kelly y Ronnekleiv, 2008). Una de dichas proteínas es el ER-X, un ER de membrana recientemente descrito en neocortex, útero y pulmón (Pappas y *col.*, 1995; Toran-Allerand y *col.*, 2002; Toran-Allerand, 2005). Cabe destacar que el perfil de expresión del ER-X durante el desarrollo y su respuesta al estradiol sugieren fuertemente que este receptor no estaría mediando las funciones que son afectadas por la gonadectomía, como lo son las funciones reproductivas (Toran-Allerand y *col.*, 2002).

Actualmente se postulan cuatro mecanismos de acción principales de los receptores de estrógenos (Hall y *col.*, 2001): ligando dependiente, ligando independiente, independiente de unión directa a elementos de respuesta específicos y de señalización de superficie celular (no genómica).

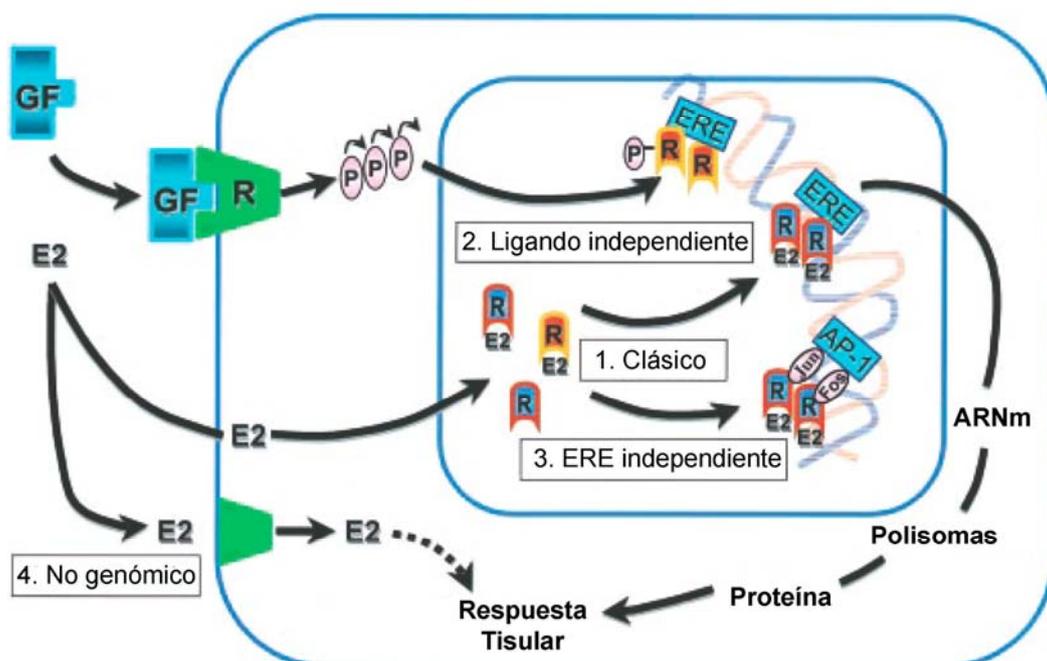


Figura 2 Mecanismos de acción postulados para los receptores de estrógeno. E2, estradiol; GF, factor de crecimiento; R, receptor; P, fosforilación; ERE, elemento de respuesta a estrógenos. Modificado de Hall y *col.* 2001.

El mecanismo ligando dependiente, o mecanismo clásico de acción de los estrógenos, es el elemento que define a los miembros Clase I de la superfamilia de receptores nucleares esteroide/tiroide, de la cual ER α y ER β

son miembros. Este modelo establece que en ausencia de la hormona, el receptor es captado por un complejo inhibitorio multiproteína ubicado en el núcleo de las células blanco (Fig.2). La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor, promoviendo la dimerización y otorgando una alta afinidad hacia el ADN de respuesta específico (ERE, del inglés *Estrogen Response Element*), el cual es un activador que actúa en *cis*, localizado dentro de las regiones reguladoras de los genes blanco. Los receptores de estrógeno unidos al ADN contactan con el aparato general de transcripción tanto en forma directa como indirecta vía cofactores proteicos, de los cuales varios han sido identificados, incluyendo SRC-1, CBP/p300 entre otros (revisado en Rosenfeld y Glass, 2001). Las interacciones entre estos coactivadores y el ER estabilizan la formación de un complejo de preiniciación de la transcripción y facilitan la perturbación necesaria de la cromatina en la secuencia de ADN reconocida. Dependiendo del tipo de célula y del contexto del promotor, el receptor unido al ADN ejerce un efecto, ya sea positivo o negativo, sobre la expresión del gen ubicado corriente abajo.

En el mecanismo de acción independiente de unión a ligando, las funciones del ER α son moduladas mediante señales extracelulares en la ausencia de estradiol (Fig.2). Este mecanismo se basa principalmente en la característica que poseen los factores de crecimiento polipeptídicos, tales como el factor de crecimiento epidermal EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*) y el factor de crecimiento tipo-insulina IGF-1 (del inglés, *Insuline-like Growth Factor*), de activar al ER α e incrementar la expresión de los genes blanco de los mismos (Smith, 1998).

Los mecanismos de acción hasta aquí descritos proveen una explicación acerca de la regulación de genes que presentan un elemento de respuesta a los estrógenos funcional (ERE) dentro de la región promotora. No obstante, distintos estudios han reportado inducción del tipo ER-estradiol en genes en los cuales ninguna secuencia del tipo ERE ha sido descrita (Fig.2), constituyendo un mecanismo de acción independiente de la unión del complejo activado a secuencias ERE (Kushner y *col.*, 2000). Es de destacar que la activación del IGF-1 y la expresión de la colagenasa vía ER α es mediada a través de la

interacción del receptor con los factores *Fos* y *Jun* en sitios de unión AP-1 (Kushner y col., 2000).

Además de su inmunoreactividad nuclear y citoplasmática, se ha demostrado que el ER α y el ER β estarían asociados a las membranas plasmáticas (Milner y col., 2001; Adams y col., 2002; Kalita y col., 2005; Milner y col., 2005; Hart y col., 2007), lo cual explicaría el rápido efecto biológico del estradiol observado en hueso, mama, sistema vascular y en sistema nervioso, sugiriendo que los estrógenos podrían también producir respuestas del tipo no genómico (Fig.2). Actualmente se sabe que los ER y la vía de la tirosin quinasa asociada a membrana están íntegramente ligadas (Simoncini y col., 2000), y se ha demostrado que el estradiol es capaz de activar la vía de señalización de la MAPK (del inglés, *Mitogen Activated Protein Kinase*) en ciertos tipos celulares. En conjunto la evidencia bioquímica, molecular y farmacológica (Gu y Moss, 1996; Razandi y col., 1999; Razandi y col., 2003) refuerza la hipótesis de que los ER de membrana serían principalmente el ER α y el ER β , pero todavía no está completamente dilucidado como los ERs serían dirigidos hacia la membrana para promover los efectos no-genómicos. Se postula que tanto ER α como ER β serían modificados postranscripcionalmente para permitir su inserción en la membrana (Acconcia y col., 2005; Marino y Ascenzi, 2006; Boulware y col., 2007).

A las diferencias mencionadas y a los mecanismos descritos hay que sumar el hecho de que cada uno de estos receptores posee múltiples promotores transcripcionales que regulan la expresión de estos genes en forma compleja y aún desconocida (Fig.3). Estudios comparativos entre las secuencias de ADNc del ER α humano con el de gallina (Krust y col., 1986), el de rata (Koike y col., 1987) y el de ratón (White y col., 1987) han demostrado que existe un alto grado de conservación en las secuencias codificantes del ER α de estas especies, sin embargo no ocurre lo mismo con sus extremos 5' (Fig.3), los cuales parecen no ser demasiado similares (revisado en Kos y col., 2001). Evidencia proveniente del análisis de otros miembros de la familia de receptores nucleares, estaría indicando que la presencia de múltiples

promotores podría ser un rasgo característico de estos receptores (Reid y *col.*, 2002).

Trabajos recientes han demostrado que estos promotores son capaces de ser activados o inhibidos en situaciones fisiológicas particulares o mediante la acción de compuestos con actividad estrogénica (Grandien y *col.*, 1995; Hamada y *col.*, 2005).

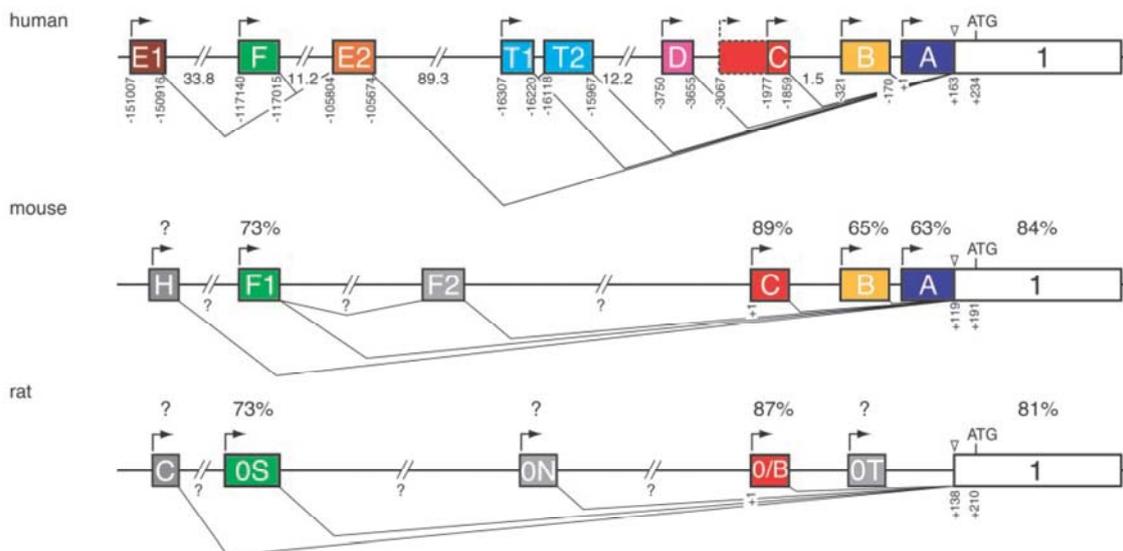


Figura 3 Comparación de las regiones promotoras del ER α humano, de ratón y de rata. Los exones conservados entre las distintas especies se muestran del mismo color, y la homología con la secuencia del ER α humano en forma de porcentaje de identidad se muestra sobre cada exon. Modificado de Kos y *col.* 2001.

El gen del ER α humano contiene al menos siete secuencias promotoras ubicadas corriente arriba capaces de iniciar la transcripción (Fig.3) (Kos y *col.*, 2001). Los promotores A y C se expresan en tejido mamario normal y canceroso, y en el útero (Grandien y *col.*, 1993; Grandien y *col.*, 1995; Weigel y *col.*, 1995). Los promotores E1/E2 son utilizados en el hígado (Flouriot y *col.*, 1998; Grandien, 1996) y el promotor F es utilizado para activar la expresión del ER α en los osteoblastos (Penolazzi y *col.*, 2004). En el cerebro, patrones de expresión definidos de los distintos promotores fueron detectados mediante hibridación in situ (Osterlund y *col.*, 2000). El promotor A está asociado con áreas del cerebro humano que expresan niveles bajos, constitutivos de ARNm de ER α incluyendo al núcleo supraoptico, la banda diagonal de Broca,

amígdala e hipocampo (CA3 y giro dentado). El promotor B es utilizado en áreas limitadas del cerebro donde el ARNm del ER α es expresado en niveles mayores incluyendo el núcleo arcuato del hipotálamo. Adicionalmente, bajos niveles del promotor B fueron detectados en la capa V del cortex temporal de humanos.

En el gen que codifica el ER α de rata, se han localizado al menos cinco exones situados corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Siguiendo la nomenclatura vigente se los conoce como promotores O (también llamado O/B), OS, ON,OT y el promotor específico de hígado C (Koike y *col.*, 1987; Hirata y *col.*, 1996a; Hirata y *col.*, 1996b; Osada y *col.*, 2001). El promotor O es equivalente al promotor C en humanos (Fig.3) y es expresado en la hipófisis anterior, hipotálamo, amígdala, y también en útero y ovario. Freyschuss y Grandien (Freyschuss y Grandien, 1996) reportaron que el promotor C es utilizado específicamente en hígado y que no existe en el gen de ER α de rata promotor equivalente al promotor A de humano. En ratas transgénicas diseñadas para expresar la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés **Green Fluorescent Protein**) bajo el control del promotor O, se observó expresión en el área preóptica, núcleo del lecho de la estría terminal, núcleo arcuato y en amígdala (Hamada y *col.*, 2005). La expresión mediada por el promotor O también fue detectada en cortex e hipocampo. En el cortex de crías de rata los promotores O y OS son utilizados (Kato y *col.*, 1998). Actualmente, el mecanismo de regulación molecular de estos promotores transcripcionales y su participación en diferentes procesos fisiológico-reproductivos no han sido completamente dilucidados.

Los mecanismos de acción de los receptores de esteroides implican un repertorio tripartito, incluyendo los receptores, sus ligandos, y sus proteínas coreguladoras (Fig.4) (Horwitz y *col.*, 1996; Katzenellenbogen y *col.*, 1996). Dependiendo del efecto de los coreguladores sobre el resultado de la expresión génica, ellos pueden ser divididos en coactivadores que promueven la activación de la transcripción mediada por receptores nucleares y corepresores que disminuyen la expresión de genes dependientes de receptores nucleares (Fig.4) (Wu y *col.*, 2005).

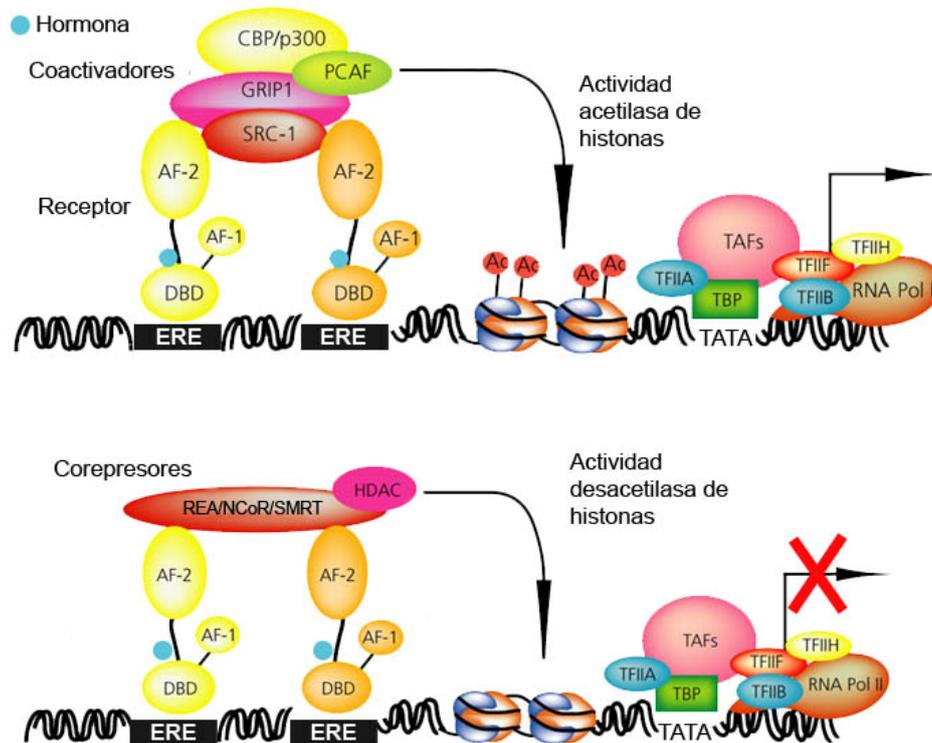


Figura 4 Reclutamiento de coactivadores y corepresores por el receptor nuclear. El complejo receptor-coactivador activa acetiltransferasas de histonas, de esta forma las histonas acetiladas se disocian de la cromatina y permiten que el complejo de la maquinaria de transcripción de genes. Cuando el receptor se asocia con corepresores estos reprimen la transcripción mediante la actividad histona desacetilasa del complejo. Esta actividad mantiene firme la unión entre las histonas desacetiladas y la cromatina resultando en la represión de la transcripción. Modificado de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center>.

Dos cofactores nucleares clave asociados al ER α y al receptor de progesterona (PR, del inglés *Progesterone Receptor*) son el coactivador de receptores esteroideos 1 (SRC-1, del inglés *Steroid Receptor Coactivator*) y el represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA, del inglés *Repressor of Estrogen receptor Action*). El SRC-1 fue el primer coactivador de receptores esteroideos en ser identificado y clonado; este coactivador aumenta la actividad transcripcional de ER α y de PR *in vitro* (Onate y col., 1995; Wong y col., 2001) y es expresado en una variedad de tejidos sensibles a hormonas, inclusive en el cerebro (Meijer y col., 2000; Molenda y col., 2002). Por otro lado, el REA es un corepresor que interacciona específicamente con los ER, suprimiendo su actividad transcripcional (Montano y col., 1999; Delage-Mourroux y col., 2000). Se ha demostrado también que el REA compite con el SRC-1 por la unión a los

ER, presentando de este modo funciones de anti-coactivador además de su actividad de represor (Montano y *col.*, 1999; Delage-Mourroux y *col.*, 2000).

En general, los corepresores pueden llevar a cabo su acción biológica a través de diversos mecanismos (Fig.5), como ser:

- Remodelación de la cromatina mediante el reclutamiento de diferentes complejos de proteínas con actividad desacetilasa de histonas.
- Interacción con la maquinaria de transcripción basal.
- Competición con los coactivadores por la unión a los receptores.
- Interferencia con la dimerización del receptor o con la unión al ADN.
- Secuestro del receptor en el citoplasma.
- Modificación del procesamiento del ARN.

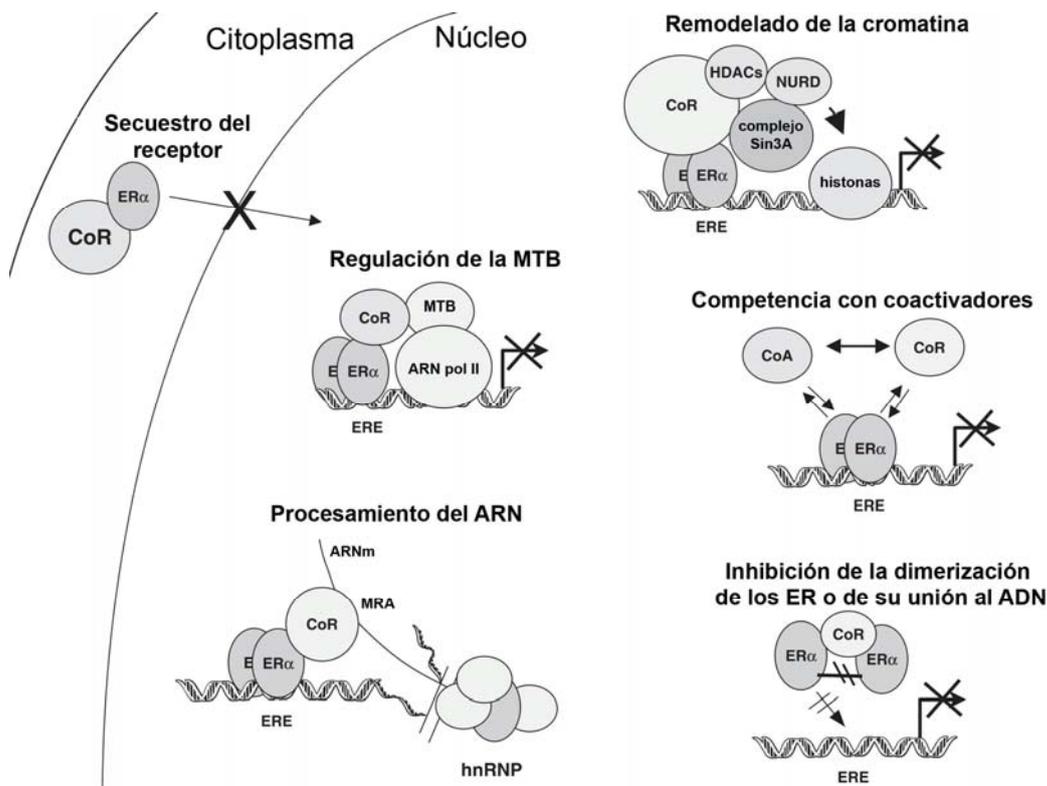


Figura 5 Mecanismos de acción de los corepresores de ER. Los mismos corepresores pueden potencialmente utilizar más de un mecanismo para llevar a cabo sus funciones. CoR, corepresor; CoA, coactivador; MRR, motivo de reconocimiento del ARN; MTB, maquinaria de transcripción basal; ARN pol II, ARN polimerasa II; NURD, desacetilación de histonas y remodelación de nucleosomas. Modificado de Dobrzycka y *col.* 2003.

La mayoría de los corepresores pueden controlar la actividad de los receptores por más de un mecanismo y es posible que la sinergia entre diferentes mecanismos cooperen en la inhibición de la actividad transcripcional (Dobrzycka y col., 2003).

1.5- Mecanismos moleculares encargados de regular la neurofisiología reproductiva y el comportamiento sexual de la rata hembra adulta

El entorno hormonal en el que se desarrolla el feto durante el período perinatal es crucial para la correcta organización de los circuitos neuroendocrinos que coordinan la fisiología y el comportamiento específico de cada sexo (Arnold y Gorski, 1984). En la rata hembra adulta con ciclos estrales normales (Fig.6), un pico espontáneo en la concentración sérica de hormona luteinizante (LH, del inglés *Luteinizing Hormone*) ocurre en la tarde del día del proestro (Smith y col., 1975), el cual también puede ser inducido en ratas ovariectomizadas mediante la administración de estrógeno exógeno y de estrógeno junto con progesterona (Herath y col., 2001). La liberación de este pico espontáneo preovulatorio de LH es provocado por la neurosecreción de la hormona liberadora de LH (LHRH, del inglés *LH-Releasing Hormone*), también conocida como hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, del inglés *Gonadotropin-Releasing Hormone*), la cual a su vez depende de dos importantes eventos neuroendocrinos: las acciones de la retroalimentación estrogénica positiva y la señal generada por el reloj neural de 24 h (Levine, 1997).

La mayor parte de las neuronas encargadas de secretar LHRH están localizadas en el área preóptica hipotalámica y estudios de la estructura del gen de LHRH indican que el mismo consta de cuatro exones cortos (denominados 1, 2, 3 y 4; Fig.7) intercalados por tres intrones (denominados A, B y C) (Bond y col., 1989). El sitio de inicio de la traducción del gen de LHRH está localizado en el exon 2, el cual codifica el péptido señal, el decapeptido de LHRH, y parte del péptido asociado a LHRH (Fig.7). Los exones 3 y 4 codifican

el resto del péptido asociado a LHRH y la región 3' no traducida (Adelman y *col.*, 1986).

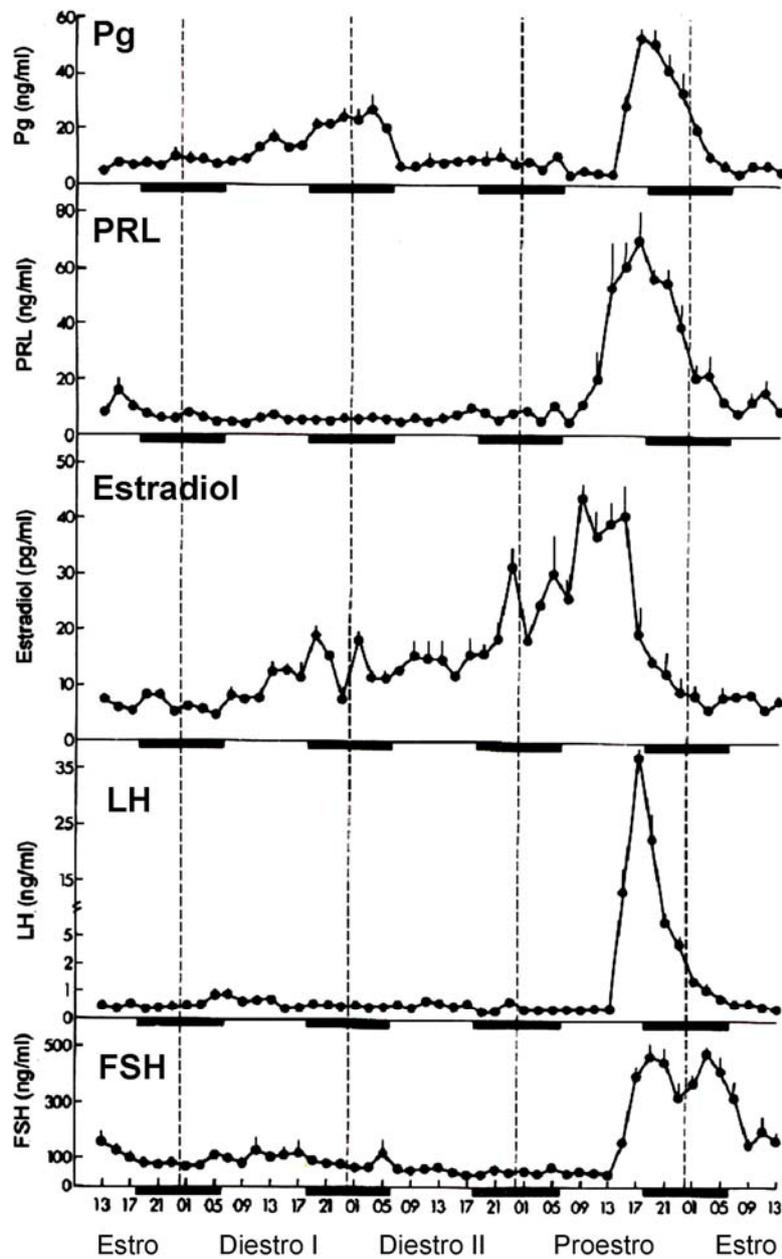


Figura 6 Niveles hormonales de progesterona (Pg), prolactina (PRL), estradiol (E2), hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) durante el ciclo estral de la rata. Los números sobre el eje X representan distintos momentos del día considerando 24 hs de reloj. Las barras en negro representan el periodo de oscuridad. Las líneas de puntos verticales señalan la medianoche. Modificado de Smith y *col.* 1975.

En neuronas productoras de LHRH, los tres intrones son eficientemente removidos del transcrito primario del gen, dando como resultado el ARNm maduro de LHRH (Yeo y *col.*, 1996; Gore y Roberts, 1997).

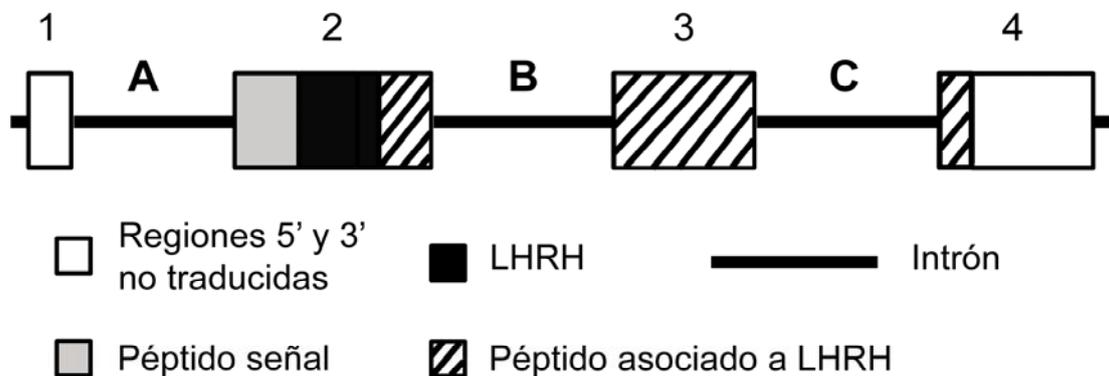


Figura 7 Organización genómica de la región codificante del LHRH de rata. En la figura pueden observarse los cuatro exones que componen este gen (**cajas 1, 2, 3 y 4**) con sus tres intrones característicos intercalados (**líneas A, B y C**). Con distintos motivos se destacan los elementos codificados en cada uno de los exones del gen de LHRH.

Transcriptos de LHRH también han sido detectados en áreas extrahipotalámicas del cerebro y en varios tejidos periféricos de la rata hembra. De forma interesante y en comparación con el hipotálamo, en estos tejidos una mayor parte de los transcriptos de LHRH conservan en su secuencia el intron A (Seong y *col.*, 1999). Estudios *in vitro* han demostrado que, al contrario de lo observado para el intron A, los intrones B y C son fácilmente removidos del transcrito primario de LHRH (Seong y *col.*, 1999; Han y *col.*, 2001). Un trabajo reciente reveló que la remoción precisa y eficiente del intron A, pero no de los intrones B o C, es un paso regulatorio clave en la regulación postranscripcional de la biosíntesis de LHRH (Son y *col.*, 2003).

Para lograr un pico normal de LH es necesaria también la activación de receptores de esteroides en las neuronas de regiones hipotalámicas específicas como el núcleo anteroventral periventricular (AvPv, Fig.1 C1) y el núcleo arcuato (Arc, Fig.1 C2). Trabajos previos han demostrado que la expresión del ER α , pero no la del ER β , en el AvPv es necesaria para generar la

retroalimentación estrogénica positiva hacia las neuronas secretoras de LHRH (Wintermantel y col., 2006). Además, la expresión del PR en este mismo núcleo también es un evento necesario en la estimulación estrogénica del pico de LHRH (Chappell y Levine, 2000). Por otro lado, proyecciones sensibles a los esteroides originadas en el núcleo Arc y dirigidas hacia el área preóptica medial estarían involucradas en el control de la secreción de LH mediante retroalimentación estrogénica negativa (Smith y col., 2005b), siendo indispensable para la regulación de este mecanismo la expresión de ER α (Couse y col., 2003).

En coordinación con el pico vespertino preovulatorio de LH, la rata hembra adulta exhibe un repertorio de conductas sexuales denominadas conducta receptiva y conducta proceptiva. La conducta receptiva está caracterizada por el reflejo de lordosis (Barfield y Chen, 1977; Pleim y col., 1989), el cual es una postura asumida por la hembra en respuesta a la monta por parte del macho y consiste en un pronunciado arqueado cervical, con elevación de la cabeza y los cuartos traseros, extensión de las patas traseras y desvío de la cola hacia un costado. La finalidad de esta conducta sería exponer la vagina para permitir una intromisión exitosa del macho. Por su parte, la conducta proceptiva está caracterizada por el movimiento de las orejas, y por saltos y corridas característicos (Erskine, 1989; Ogawa y col., 1994); siendo su finalidad la de diferenciarse de hembras no receptivas “comunicando” al macho su estado fisiológico. En ratas hembra ovariectomizadas el estradiol es necesario para inducir la conducta sexual receptiva (Pleim y col., 1989), mientras que estradiol seguido de progesterona sería necesario para la expresión del repertorio completo de la respuesta sexual (Edwards y Pfeifle, 1983; Erskine, 1989), el cual incluye la conducta proceptiva. Estas conductas de la rata hembra son en parte reguladas mediante la activación hormonal del ER α y el PR en regiones hipotalámicas específicas como el área medial preóptica (MPN, Fig.1 C1) y la región ventrolateral del núcleo ventromedial hipotalámico (VMHvl, Fig.1 C2) (Ogawa y col., 1998; Musatov y col., 2006; Mani y col., 2006). La red neural encargada de regular el reflejo de lordosis involucra proyecciones que parten desde el VMH, siguen por la formación medular reticular y alcanzan los músculos directamente responsables de este reflejo (Pfaff, 1999). Estudios

realizados utilizando la técnica de ARN de interferencia han demostrado que silenciando la expresión del ER α en el VMH se bloquea la inducción de la conducta sexual en ratones (Musatov y *col.*, 2006).

1.6- Estrógenos y neurogénesis en estructuras hipocámpicas

En los mamíferos, el hombre inclusive, la neurogénesis ocurre a lo largo de toda la vida (Kaplan y Hinds, 1977; Eriksson y *col.*, 1998). Las células precursoras neurales (CPN), localizadas en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (Fig.8), proliferan y se integran en circuitos hipocámpicos y podrían estar involucradas en ciertas formas de aprendizaje dependiente del hipocampo (Hastings y Gould, 1999; Shors y *col.*, 2002).

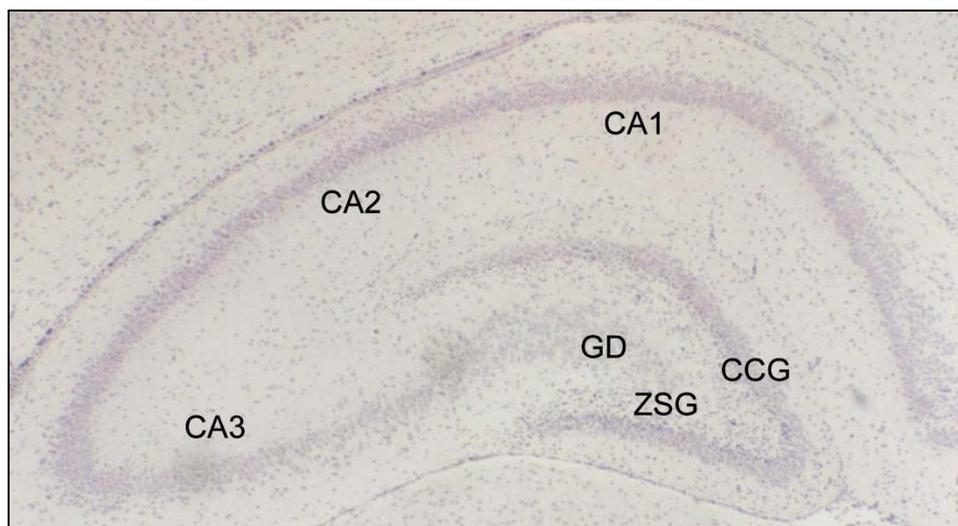


Figura 8 Corte histológico en el plano coronal representativo de la región hipocámpica estudiada coloreado con la tinción de Nissl. GD, giro dentado; ZSG, zona subgranular; CCG, capa de células granulares; CA1-3, campos de neuronas piramidales empaquetadas.

Dos subtipos de CPN (tipo-I y tipo-II) han sido previamente caracterizados utilizando ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente bajo el dominio del promotor de nestina, un filamento intermedio presente en las células progenitoras (Filippov y *col.*, 2003). Los dos subtipos celulares expresan nestina y pueden ser distinguidos uno del otro mediante criterios morfológicos (Filippov y *col.*, 2003; Emsley y *col.*, 2005). Las CPN tipo-I poseen proyecciones largas que van a través de la capa de células granulares (CCG)

del giro dentado (Fig.9) y alcanzan la porción interior de la zona molecular mientras que las CPN tipo-II carecen de estas largas proyecciones y están caracterizadas por extensiones citoplasmáticas cortas tangencialmente orientadas hacia la CCG (Fig.9) (Filippov y *col.*, 2003).

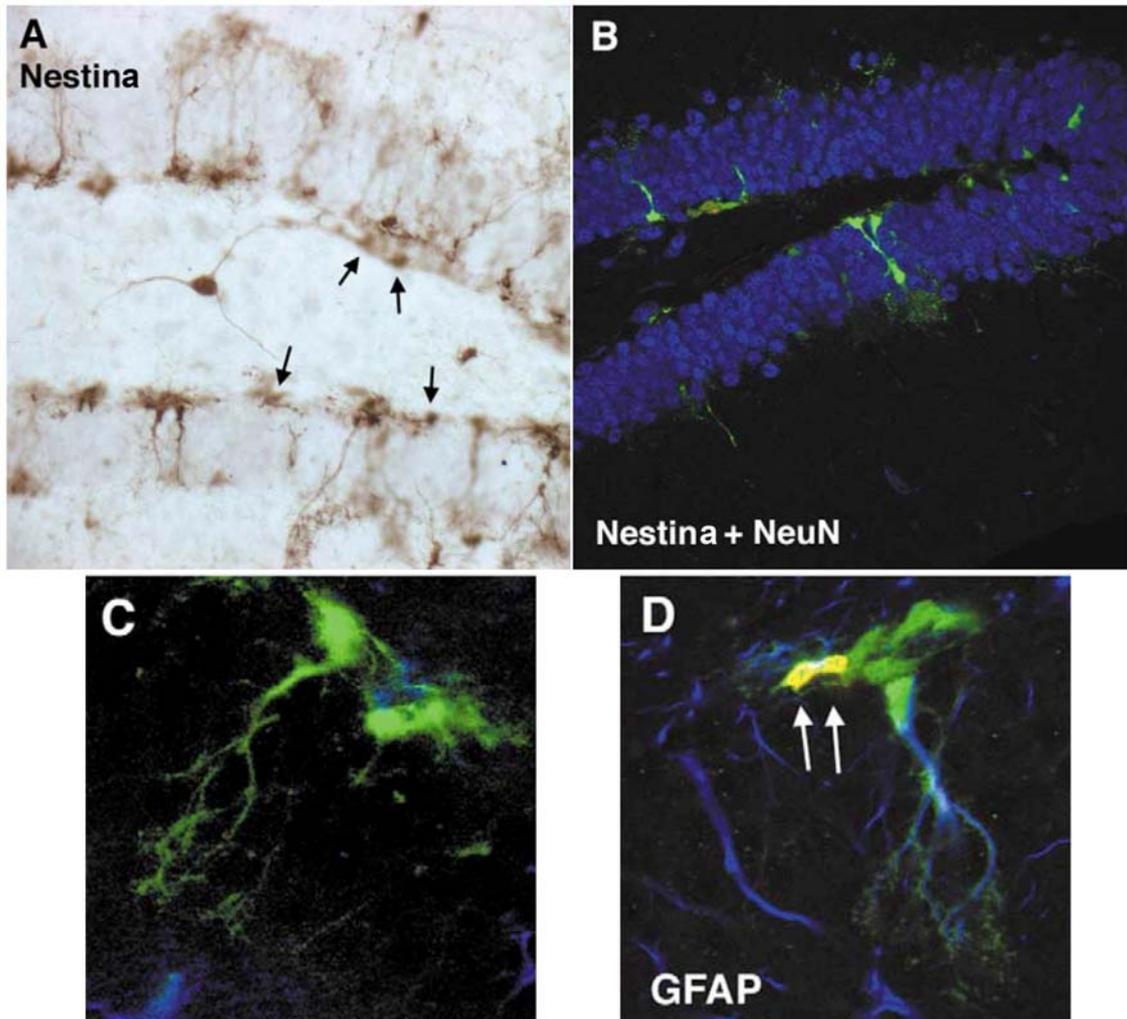


Figura 9 Identificación de células progenitoras neuronales (CPN) en la zona subgranular (ZSG) del hipocampo de ratones transgénicos portando el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el dominio del promotor de nestina. **(A)** Microscopía de campo claro de células nestina-GFP-(+) en la ZSG. Las células tipo I poseen procesos que se extiende hacia la capa de células granulosas externa y hacia la capa molecular interna. Las células tipo II no presentan los procesos mencionados (**flechas**) y son menos frecuentes que las células tipo I. En el hilus puede observarse una célula nestina-GFP-(+) con su núcleo triangular característico y finos procesos. **(B)** Imagen de microscopía confocal ilustrando como las células nestina-GFP-(+) están distribuidas entre la ZSG y la capa de células de la granulosa (CCG). Las neuronas maduras se encuentran marcadas con el anticuerpo anti-NeuN (azul). **(C)** Imagen a mayor aumento de una célula tipo I. **(D)** Triple marcación de células nestina-GFP-(+) (verdes) con BrdU (rojo) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) marcadora de astrocitos (azul). En la imagen pueden observarse dos células tipo II BrdU-(+) localizadas junto a una célula tipo I GFAP-(+). Las células tipo II no expresan el marcador GFAP. Modificado de Filippov y *col.* 2003.

Bajo condiciones de reposo, las CPN tipo-II son las que más activamente se dividen, y la estimulación fisiológica de la mitosis parece afectar principalmente este tipo de precursores tempranos. Las células tipo-I raramente se dividen, y su proliferación no ha podido ser inducida mediante las manipulaciones experimentales estudiadas hasta el momento (Kronenberg y *col.*, 2003; Emsley y *col.*, 2005). Estudios previos han identificado factores endocrinos, neurales y experienciales que regulan la producción y supervivencia de neuronas generadas tardíamente en el hipocampo de la rata (Lie y *col.*, 2004; Naylor y *col.*, 2005). Estos incluyen moduladores negativos, tales como los glucocorticoides y la interleuquina-6 (Montaron y *col.*, 1999; Vallieres y *col.*, 2002), y moduladores positivos, tales como la serotonina, los antagonistas del receptor de N-metil-aspartato y la dehidroepiandrosterona (Banar y *col.*, 2001; Karishma y Herbert, 2002).

Los estrógenos han sido descritos como reguladores de la plasticidad sináptica, funciones cognitivas, memoria, humor y comportamiento (McEwen y Alves, 1999); sin embargo, su rol en el control de la proliferación y diferenciación neuronal y glial no está completamente dilucidado todavía. Trabajos recientes han reportado que el estradiol es capaz de inducir la producción celular en la formación hipocampal del adulto (Perez-Martin y *col.*, 2005; Tanapat y *col.*, 2005). Una sola dosis de estradiol (10 µg/rata) es capaz de incrementar la proliferación de las CPN en la ZSG de ratas hembra adultas ovariectomizadas (Tanapat y *col.*, 1999). En contraste, otros estudios han demostrado que la densidad de células nuevas está negativamente correlacionada con los niveles de estradiol plasmático en ratones silvestres hembra y ratas de laboratorio adultas (Ormerod y Galea, 2001; Ormerod y *col.*, 2003). Esta aparente contradicción sobre el control hormonal de la proliferación de las CPN podría ser explicada por una acción dependiente del tiempo y por la dosis de estrógenos utilizada (Ormerod y Galea, 2001; Ormerod y *col.*, 2003; Tanapat y *col.*, 2005). Además, la acción negativa o positiva de los estrógenos sobre la proliferación celular en el hipocampo durante la adultez podría estar mediada por los esteroides adrenales y sus receptores (Ormerod y *col.*, 2003).

Hasta la fecha varios intentos se han realizado para dilucidar posibles mecanismos y mediadores moleculares subyacentes a la proliferación y diferenciación de las CPN. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) fue propuesto como una molécula clave en la regulación de la neurogénesis, mediando los efectos del ambiente en la plasticidad del hipocampo durante la adultez (Cao y *col.*, 2004). Por otro lado el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), es una neurotrofina involucrada en la plasticidad sináptica y la neuroprotección, cuya expresión se encuentra regulada por los estrógenos (McAllister y *col.*, 1999; Solum y Handa, 2002). Se ha demostrado que esta molécula es capaz de regular sistemas de neurotransmisión, modular la transmisión sináptica y promover la sinaptogénesis (McAllister, 1999). La mayoría de las investigaciones de los efectos de los estrógenos sobre la neurogénesis han sido realizadas en roedores hembra adultos, y por ende, poco se sabe acerca de las consecuencias de la exposición a estrógenos sobre la proliferación de las CPN hipocampales en el cerebro de machos neonatos. Existe en la literatura mucha evidencia que señala al periodo perinatal como crítico en la formación de los circuitos hipocampales (Kuhn y *col.*, 1996). Se ha demostrado que el tratamiento con estrógenos durante el desarrollo afecta el volumen de las regiones hipocampales CA1 y CA3, la navegación espacial (Isgor y Sengelaub, 1998), la fuerza de la potenciación hipocampal a largo plazo (Woolley y McEwen, 1992; Cordoba Montoya y Carrer, 1997), y el aprendizaje dependiente del hipocampo (Luine y *col.*, 1998). La CCG del giro dentado del hipocampo de roedores y humanos ha sido caracterizada como una región de proliferación continua pero dependiente de la edad (Wasterlain y Plum, 1973; Eriksson y *col.*, 1998). Estudios de marcado del ADN realizados en rata demostraron que la proliferación de las CPN en la ZSG del giro dentado es intensa durante la primera semana posnatal, declinando a partir de la segunda semana posnatal hasta la etapa adulta (Sapolsky y Meaney, 1986; Gould y Tanapat, 1999).

1.7- Perturbadores endocrinos

El descubrimiento de sustancias químicas con actividad agonista/antagonista de hormonas endógenas presentes en el medioambiente (perturbadores endocrinos) ha despertado el interés en conocer su relación con patologías reproductivas y del desarrollo en animales salvajes, especies de interés zootécnico y seres humanos (Soto y col., 1995). A pesar de que estos compuestos no poseen una estructura química similar a las hormonas esteroides naturales (Fig.10) son capaces de interactuar con los miembros de la superfamilia de receptores nucleares *in vivo*. Esta característica ha alertado sobre la posibilidad de que estas sustancias interfieran negativamente en la homeostasis endocrina del organismo. La diversidad de origen de estas sustancias (naturales y sintéticas), el incremento de su utilización como pesticidas, herbicidas, suplementos dietarios y derivados plásticos, ha aumentado la exposición de los animales silvestres y del hombre. Los xenoestrógenos son un grupo particular de perturbadores endocrinos que poseen la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos y de alterar la respuesta endocrina inducida por estas hormonas.

El bisfenol A (BPA; 2,2-bis[4-hidroxifenil]propano; Fig.10) constituye un notable ejemplo de xenoestrógeno debido a su masiva utilización y distribución. Este compuesto es ampliamente utilizado en la manufactura de plásticos usados en contenedores de comidas y bebidas, tapas de botellas, recubrimientos interiores de latas de conservas, cañerías de agua, sellantes odontológicos, etc. Este contaminante se encuentra considerablemente distribuido en el medioambiente y actualmente se asume que la vía más común de exposición humana a BPA es a través de la dieta (Melnick y col., 2002). Estudios recientes han detectado la presencia de BPA en más del 92% de las muestras de orina analizadas provenientes de personas en los Estados Unidos (Calafat y col., 2008) y también en muestras de orina, sangre y tejido adiposo provenientes de personas de Europa y Asia (Moors y col., 2007; Murakami y col., 2007; Fernandez y col., 2007). Estudios recientes reportan que la vida media del BPA sería más larga de la esperada, pudiendo esto deberse a la bioacumulación de este compuesto en algún tejido corporal, posiblemente en el tejido adiposo

(Stahlhut y col., 2009). En este contexto, se ha reportado una exposición significativa de fetos humanos a este compuesto debido a su presencia en sangre materna, tejido placentario y sangre proveniente del cordón umbilical (Takahashi y Oishi, 2000; Schonfelder y col., 2002; Tan y Ali, 2003; Engel y col., 2006; Padmanabhan y col., 2008). La posible exposición de los recién nacidos no estaría restringida solamente al período de gestación sino que el período de lactancia también sería una posible vía de exposición a BPA, ya que la presencia de este compuesto fue detectada en la leche materna de madres durante la lactancia (Ye y col., 2006; Kuruto-Niwa y col., 2007) y en leches maternizadas comerciales (Kuo y Ding, 2004). Además, trabajos previos reportan que los animales jóvenes metabolizan el BPA de forma menos eficiente que los adultos (Matsumoto y col., 2002; Domoradzki y col., 2004), lo cual resulta en niveles de BPA circulante más altos. Además esto implica que la administración oral y no-oral de BPA durante la etapa neonatal daría como resultado la misma dosis interna activa (Taylor y col., 2008). Asimismo, la Unión Europea estimó que la exposición oral a BPA se encuentra en un rango de 35-50 $\mu\text{g}/\text{día}$ en infantes de 1-12 meses de edad y de hasta 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ en niños de 1.5-4.5 años de edad (European-Union, 2003). En concordancia con lo estimado por la Unión Europea, recientemente el Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos reportó que *“existe cierta preocupación por los efectos sobre el cerebro, la conducta y la próstata de fetos, infantes y niños a los niveles actuales de BPA a los que estamos expuestos los humanos”* (NTP-CERHR Report, 2008). Por otro lado, el dietilstilbestrol (DES, Fig.10) es un estrógeno sintético que fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas durante los años 1950 y 1960 administrándose para evitar abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. En 1971, se dejó de recetar DES debido a que se encontró que las mujeres expuestas *in utero* a DES (hijas de madres tratadas con DES) exhibían anomalías en el tracto reproductor, mayor predisposición a padecer cáncer e infertilidad (Herbst y col., 1971). El modelo de exposición neonatal a DES constituye un modelo farmacológico de desarrollo de patologías oncológicas y reproductivas transgeneracional, permitiendo el estudio de las consecuencias patológicas que surgen en adultos expuestos en su etapa temprana de vida a sustancias hormonalmente activas y

en su descendencia (Mericskay y col., 2005). A partir de la utilización de DES se comenzó a aplicar el concepto de efecto “organizacional”, y de “período crítico de exposición” con una merma en el peso del concepto de mutagénesis como causa absoluta del cáncer, ya que no existe evidencia alguna de mutaciones genéticas permanentes en respuesta a la exposición a DES. En cambio, perturbaciones transientes en la normal expresión de ciertos genes ocurren durante períodos críticos impactando en el subsecuente normal desarrollo. Los genes del tipo *Hox* poseen la particularidad de ser genes de “doble vida”, siendo esenciales tanto durante el período embrionario para la diferenciación organogénica como durante la etapa adulta para la diferenciación funcional del tracto reproductor (Satokata y col., 1995; Hsieh-Li y col., 1995; Bagot y col., 2000).

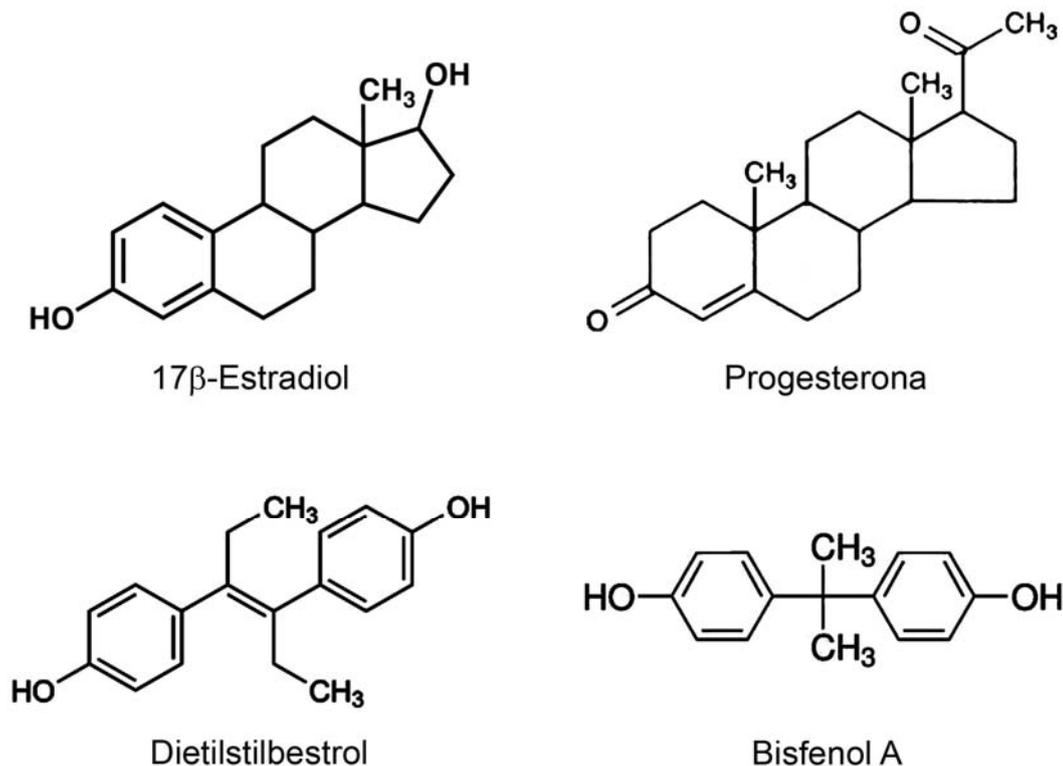


Figura 10 Estructura molecular de algunas hormonas esteroideas y xenoestrógenos. En la figura pueden observarse las estructuras de las hormonas 17β-estradiol y progesterona, junto a los xenoestrógenos dietilstilbestrol y bisfenol A.

Se ha demostrado que el DES reprime fuertemente la expresión de varios genes del tipo *Hox* y *Wnt* (Miller y col., 1998; Varayoud y col., 2008b), sin embargo estos efectos no fueron observados en animales en los cuales el gen

de ER α fue silenciado sugiriendo que la perturbación de estos compuestos hormonalmente activos requieren de una vía ER α -dependiente intacta (Couse y col., 2001). El descubrimiento de alteraciones en los patrones de metilación de los promotores de genes regulados por la vía estrogénica proveen evidencia acerca de los mecanismos epigenéticos mediante los cuales el DES altera permanentemente la expresión de ciertos genes (Li y col., 2003b). Por otro lado, este compuesto es frecuentemente utilizado en experimentos de estrogenización neonatal del cerebro debido a que no es capturado por la alfa-fetoproteína y puede de esta forma penetrar la barrera hematoencefálica (Savu y col., 1979; DonCarlos y col., 1995).

Nuestro laboratorio ha realizado estudios microanatómicos sobre próstata ventral de ratas tratadas *in utero* con dosis bajas de BPA. Demostramos que ratas de 30 días de edad, tratadas con BPA, presentan una menor función secretora epitelial y alteraciones en el fenotipo del estroma periductal de la próstata (Fig.11C; Ramos y col., 2001). En ratones hembras tratadas *in utero* con BPA, demostramos alteraciones en el desarrollo de la mama, que en la edad adulta son semejantes a procesos preneoplásicos (Fig.11A,B; Markey y col., 2001; Munoz-De-Toro y col., 2005).

Estos trabajos demuestran que la exposición a xenoestrógenos durante períodos críticos del desarrollo embrionario y fetal, en concentraciones encontradas en el medio ambiente, producen efectos biológicos que perduran en el tiempo y se manifiestan durante la edad adulta. Estos efectos biológicos del BPA no se limitan a tejidos periféricos ya que se han encontrado alteraciones en el sistema nervioso central y en circuitos neuroendocrinos. El tratamiento postnatal de ratas con dosis altas de BPA produce un aumento de prolactina y de la expresión de ER en el hipotálamo medio basal (Khurana y col., 2000). Algunas estructuras del cerebro anterior de la rata, como el núcleo intersticial de la estría terminal y el área preóptica medial, presentan dimorfismo sexual en la expresión de receptores de andrógenos y ER (McAbee y DonCarlos, 1999b). Se ha propuesto que dicho dimorfismo se alteraría si en períodos críticos del desarrollo fetal los animales se exponen a estrógenos o xenoestrógenos (McAbee y DonCarlos, 1999a).

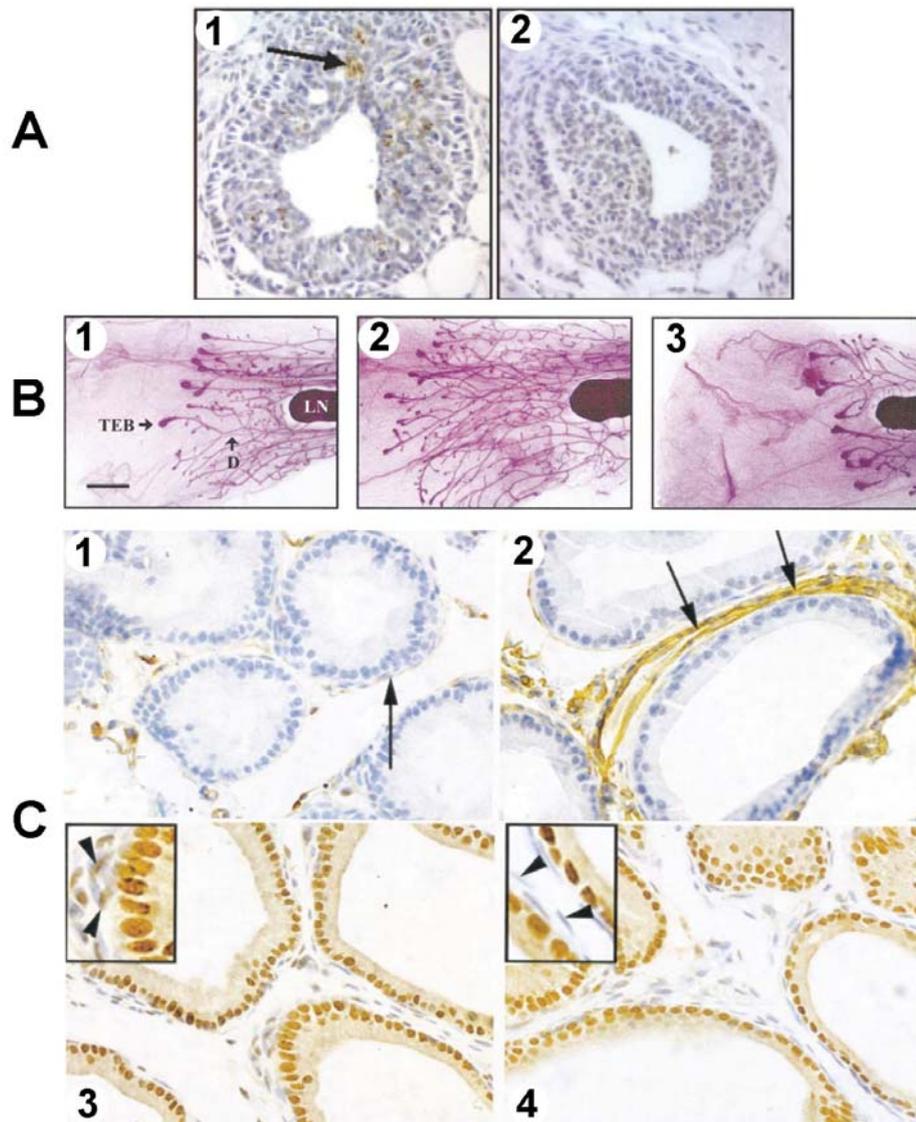


Figura 11 Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la histoarquitectura de la glándula mamaria y de la próstata de rata. **(A)** Detección de células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL en glándulas mamarias de ratones tratados perinatalmente con vehículo (1) o BPA (2). En la fotomicrografía puede observarse la disminución del número de células apoptóticas en los animales expuestos a BPA. La flecha señala un agrupamiento de células en apoptosis. **(B)** Cambios en la extensión de los ductos (D), a través de invasión estromal de los botones terminales (TEB), en la glandula mamaria de animales control (1), y expuestos a 25 µg/kg BPA (2) y 250 µg/kg BPA (3). **(C)** Cambios en el fenotipo de las células epiteliales y del estroma periductal de la próstata ventral de ratas expuestas a BPA. En los animales control el patrón de inmunotinción de vimentina fue discontinuo (1, flecha), mientras que en los animales expuestos a BPA el patrón de inmunotinción de vimentina formó un grueso halo alrededor del ducto (2, flechas). En el estroma periductal del grupo control un mayor número de células expresó el receptor de andrógenos (3, cabezas de flecha en recuadro) en comparación con los animales expuestos a BPA (4). Modificado de **(A)** Muñoz de Toro y col. 2005, **(B)** Markey y col. 2001, **(C)** Ramos y col. 2001.

Se ha demostrado también que la exposición a DES durante las etapas del desarrollo claramente influencia la sinaptogénesis y la vulnerabilidad neuronal (Sato y *col.*, 2002). Trabajos previos señalan que la exposición neonatal a xenoestrógenos inhibe la diferenciación sexual de comportamientos no-reproductivos, incluyendo tareas dependientes del hipocampo, como lo son el aprendizaje de laberintos y la localización espacial (Farabollini y *col.*, 2002; Carr y *col.*, 2003).

Estas posibles alteraciones en la maduración de estructuras prosencefálicas, podrían modificar los patrones de secreción de hormonas hipofisarias y gonadales, predisponer al desarrollo de trastornos proliferativos hormonodependientes (carcinoma de próstata, carcinoma de mama, *etc.*), alterar las conductas sexuales reguladas hormonalmente y provocar deterioros en el aprendizaje dependiente del hipocampo en la edad adulta.

2- Objetivos

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo General

Evaluar la influencia de la exposición neonatal temprana a xenoestrógenos sobre el desarrollo del sistema límbico en ratas.

2.2- Objetivos Particulares

Estudiar los efectos de la exposición posnatal temprana a xenoestrógenos sobre estructuras hipotalámicas implicadas en la diferenciación sexual del cerebro.

- ✓ En crías recién nacidas y en animales pre-puberales evaluar los efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre los mecanismos de diferenciación sexual del hipotálamo.
- ✓ Desarrollar un anticuerpo policlonal específico para evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión hipotalámica del recientemente descrito represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA).
- ✓ En ratas hembra adultas evaluar los efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre los mecanismos sexualmente dimórficos encargados de regular la neuroendocrinología del ciclo estral y la conducta sexual.

Estudiar los efectos de la exposición posnatal temprana a xenoestrógenos sobre la neurogénesis hipocampal.

- ✓ Evaluar los efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la dinámica poblacional de las células progenitoras neuronales en el giro dentado de animales jóvenes.

- ✓ En machos jóvenes evaluar los efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión hipocámpica de factores de crecimiento estrógeno-dependientes.

3- Materiales y Métodos

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Hormonas y xenoestrógenos utilizados

Los reactivos: BPA, DES, 17 β -estradiol, benzoato de estradiol y progesterona utilizados en este trabajo fueron obtenidos de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

3.2- Animales utilizados y modelo de exposición neonatal a xenoestrógenos

Las crías utilizadas fueron obtenidas de ratas Wistar mantenidas en un ambiente controlado (22 \pm 2°C, luces desde las 06:00 hasta 20:00 h) con libre acceso a alimento balanceado (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua de bebida. Los animales fueron manejados de acuerdo con los principios y procedimientos enunciados por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos y todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética de la FBCB-UNL. La concentración de fitoestrógenos en la dieta no fue evaluada; sin embargo, debido a que el consumo de alimento fue equivalente entre los animales controles y experimentales (Varayoud y *col.*, 2008b) asumimos que todos los animales fueron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos. Con el fin de minimizar exposiciones adicionales a compuestos químicos con actividad de perturbadores endócrinos, los animales fueron mantenidos en jaulas de acero inoxidable con camas de viruta de madera y el agua fue suministrada en botellas de vidrio con tapones de goma rodeados por un aro de metal. Las crías de rata utilizadas para cada grupo experimental se obtuvieron a partir de hembras preñadas de forma sincronizada. Luego del parto (día postnatal 0, DPN0), las crías fueron sexadas de acuerdo a la distancia ano-genital, distribuidas entre distintas madres y estas nuevas camadas fueron ajustadas a diez crías por madre. Esto nos permitió minimizar el uso de hermanos en el mismo grupo para evitar potenciales efectos dependientes de la camada. Cada nueva camada fue asignada a uno de cuatro grupos experimentales: crías tratadas con el vehículo aceite de maíz (hembras control y machos control), DES (crías inyectadas con 0,02 mg/kg de dietilstilbestrol), BPA20 (crías inyectadas con 20 mg/kg de BPA) y BPA.05 (crías inyectadas con 0,05 mg/kg de BPA). Todas las crías recibieron

inyecciones subcutáneas cada 48 h desde el DPN1 hasta el DPN7, de 40 µl de aceite de maíz solo o 40 µl de aceite de maíz conteniendo la cantidad apropiada de DES o BPA. Basados en las estimaciones de la Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos (EPA EEUU), el nivel más bajo de efectos adversos observados (dosis LOAEL, del inglés *Lowest Observed Adverse Effect Level*) para la exposición oral a BPA en ratas es de 50 mg/kg/día (Integrated Risk Information System, 1993). Por otra parte, expertos del Programa Nacional de Toxicología de EEUU (NTP EEUU) sugirieron una dosis límite de 5 mg/kg/día de BPA para la clasificación de efectos de dosis bajas, sin importar la vía de administración, duración de la exposición, o la edad a la cual ocurre la exposición (Melnick y col., 2002). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la dosis alta de BPA utilizada en este trabajo es cuatro veces más grande que la dosis límite propuesta por los expertos del NTP de EEUU y 2,5 veces menor a la dosis LOAEL de la EPA de EEUU; mientras que, la dosis baja de BPA utilizada en este trabajo es 100 veces más pequeña que la dosis límite propuesta por los expertos del NTP de EEUU e igual a la ingesta diaria aceptable (LOAEL/1000) establecida por la EPA de EEUU (Integrated Risk Information System, 1993; Melnick y col., 2002). En el transcurso de este trabajo no se observaron signos de toxicidad aguda o crónica, y tampoco se registraron durante el experimento diferencias significativas en la ganancia de peso y distancia ano-genital entre crías controles y tratadas (datos no mostrados). La conducta maternal de las madres adoptivas de los distintos grupos experimentales fue la misma con todas las crías (propias y adoptivas). Luego de completado el tratamiento los animales fueron asignados a las distintas edades de estudio: DPN8, DPN21 y DPN85.

3.3- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la diferenciación sexual del hipotálamo

3.3.1- Obtención de las muestras

En esta primer etapa del trabajo se utilizaron animales hembras y machos control, y hembras expuestas a DES, BPA20 y BPA.05, y se estudiaron las

edades de DPN8 y DPN21. Los animales fueron sacrificados por decapitación 24 h luego de la última inyección (DPN8) o en DPN21, y las muestras de cada grupo fueron asignadas al azar a las distintas técnicas utilizadas. Para el análisis de hormonas se recogió la sangre troncal y el suero se guardó a -80°C hasta su utilización. Para inmunohistoquímica (n=5 DPN8 y n=5 DPN21 por grupo), los cerebros fueron micro-diseccionados y fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 24 h a 4-8°C. El tejido fijado fue deshidratado en series de etanol de graduación ascendente, clarificados en xilol y embebidos en parafina. Series de cortes consecutivos de 5 µm de espesor abarcando el área preóptica medial en el plano coronal (Paxinos y Watson, 2005) fueron montados en portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltrióxido de silano (Sigma-Aldrich) y secados a 37°C durante 24 h. Para la extracción de ácidos nucleicos (n=8 DPN8 y n=6 DPN21 por grupo), bloques de tejido conteniendo el área preóptica hipotalámica fueron micro-diseccionados bajo un microscopio de disección (Leica Corp., Buffalo, NY, USA). El área preóptica hipotalámica fue disecada, delimitada rostralmente por la porción anterior de la comisura anterior, caudalmente por el inicio del ascenso de los tractos ópticos, dorsalmente por la porción ventral de la comisura anterior, y lateralmente por una línea virtual proyectada desde la cápsula interna hasta el límite exterior de los tractos ópticos (Paxinos y Watson, 2005). Luego de la micro-disección, las muestras de tejido fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C hasta su utilización.

3.3.2- Transcripción reversa y análisis de la expresión de ERα y sus promotores transcripcionales mediante PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo optimizado de RT-PCR para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de ERα y de los transcritos de ERα conteniendo los exones no-traducidos OS, ON, O, OT, y E1 (ver Fig.12A y Tabla 1). Cuatro pools de dos bloques de tejido de DPN8 cada uno (n=4) o, seis bloques de tejido de DPN21 (n=6) de cada grupo experimental fueron homogenizados en reactivo TRIzol y el ARN total fue extraído de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina). La concentración de

ARN fue medida en espectrofotómetro utilizando el cociente A_{260}/A_{280} , utilizándose solamente aquellas muestras con un cociente A_{260}/A_{280} mayor a 1,9 las cuales fueron guardadas a -80°C hasta su utilización.

TABLA 1. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real

Gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplicon (pb)	Número de Genbank
ER α	Sentido: AATTCTGACAATCGACGCCAG Antisentido: GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC	345	NM_012689
18sRNA	Sentido: CAACTTTTCGATGGTAGTCGC Antisentido: CGCTATTGGAGCTGGAATTAC	285	M11188
ER α -E1	Sentido: TTTAACCTCGGGCTCTACTC	247	X98236.1
ER α -0	Sentido: GACTTCTACAAACCCATGGA	272	NM_012689
ER α -OT	Sentido: CAGCAGGTTTTCGATGTCTAA	275	X98236.1
ER α -ON	Sentido: CTGGGGCATCTCCTTCAATATG	304	NW_047550.1
ER α -OS	Sentido: CCGAAAACACAAGGCTCCATGCT	336	NW_047550.1
exon 1	Antisentido: GGGCTTGCTGTTGTCCACGTAC	--	NM_012689

Cantidades equivalentes de ARN (4 μg) fueron retro-transcriptas a ADN copia (ADNc) con transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (300 U; Promega, Madison, WI) usando 200 pmoles de hexanucleótidos al azar (Promega). Veinte unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNAout; Invitrogen) y 100 nmoles de una mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) fueron agregados a cada tubo de reacción en un volumen final de 30 μl de buffer de transcriptasa reversa 1 \times . La transcripción se realizó a 42°C durante 90 min y la reacción fue finalizada mediante calentamiento a 97°C durante 5 min y posterior enfriamiento en hielo. El ADNc obtenido se llevó a un volumen final de 60 μl con agua libre de ribonucleasas. Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por triplicado y se incluyó una muestra sin transcriptasa reversa para detectar contaminación por ADN genómico. Los pares de cebadores utilizados para la amplificación del ARNm de ER α , 18sARN y de los ADNc de los promotores de ER α se muestran en la Tabla 1. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el sistema Real-Time DNA Engine Opticon (Bio-Rad Laboratories, Inc., Waltham, MA) y

colorante SYBR Green I (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ). Para la amplificación de los ADNc, 5 µl de cada ADNc fueron combinados con una mezcla conteniendo 2,5 U de polimerasa de ADN Taq (Invitrogen), Cl₂Mg 2 mM (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP (Promega), y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen) en un volumen final de 25 µl de buffer 1 × de SYBR Green I PCR Taq. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación consistente. El cambio en los niveles de expresión fue determinado mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Higuchi y col., 1993). El ciclo umbral (C_t) de cada muestra fue calculado utilizando el programa de análisis Opticon Monitor (MJ Research, Waltham, MA). No se observaron diferencias significativas en los valores de C_t de 18sARN entre los grupos experimentales.

3.3.3- Extracción de ADN genómico y modificación mediante bisulfitación

El ADN fue extraído de mezclas realizadas con tres bloques de tejido de cada grupo experimental utilizando el kit de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se disolvieron 2 µg de ADN en 50 µl de NaOH y se desnaturalizaron durante 20 min a 37°C. Luego, se agregaron 30 µl de hidroquinona (Sigma-Aldrich) y 520 µl de bisulfito de sodio 3 M pH 5, ambos recién preparados, mezclando bien con las muestras y cubriendo con una capa de aceite mineral para incubar luego la mezcla a 55°C durante 16 h. El ADN químicamente modificado fue purificado mediante el uso del kit Wizard DNA Purification Resin de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega) y se eluyó con 50 µl de agua precalentada a 65°C. La modificación se completó mediante el tratamiento con NaOH durante 15 min a 37°C seguida de una precipitación con etanol durante toda la noche. El ADN precipitado fue resuspendido en 20 µl de agua libre de nucleasas y fue guardado a -20°C hasta su utilización.

3.3.4- *Análisis combinado de bisulfitación restricción (COBRA)*

La metilación es una modificación química mediada por enzimas que adicionan grupos metilos (-CH₃) en sitios específicos de proteínas, ADN y ARN. En humanos y la mayoría de los mamíferos sólo se conoce la modificación del ADN, y afecta únicamente a la base citosina (C) cuando esta seguida de una guanosina (G), de manera que la metilación ocurre en sitios CpG (donde “p” se refiere al enlace fosfodiéster que une a C y G) (Tajima y Suetake, 1998). La frecuencia de secuencias CG repetitivas a lo largo del genoma es muy baja, excepto en regiones específicas (por lo general de un tamaño que oscila entre 300 a 3000 pb) donde la periodicidad de CpG es mayor a la esperada. Estas regiones se denominan *islas CpG* y están presentes en aproximadamente el 40% de los promotores de los genes conocidos de mamíferos (Antequera y Bird, 1993). La mayor o menor metilación de los sitios CpG ubicados en regiones promotoras de un gen está asociado con el nivel de transcripción que presenta dicho gen. Por ejemplo, los sitios CpG en las islas CpG están demetilados si los genes presentan altos niveles de transcripción (Clark y Melki, 2002). Esta observación conlleva a la hipótesis de que la metilación de los sitios CpG en los promotores de los genes puede inhibir la expresión de un gen (silenciarlo). El mecanismo de silenciamiento de genes por metilación se encuentra todavía en discusión, pero se postula que esta modificación provoca una remodelación física de la cromatina, impidiendo el ingreso de diversos factores de transcripción al área afectada (Herman y Baylin, 2003).

Para el análisis de los niveles de metilación de las secuencias promotoras de ER α se utilizó la técnica de COBRA. En este análisis (Xiong y Laird, 1997), la digestión del ADN con enzimas de restricción es utilizada para revelar diferencias en la secuencia de ADN dependientes de metilación (Fig.12B), en ADN genómico tratado con bisulfito y luego amplificado por PCR. Esta combinación de tratamiento con bisulfito y amplificación por PCR resulta en la conversión de residuos de citosina no metilados a timina, en tanto que las citosinas metiladas permanecen sin alteración. La modificación de la secuencia del ADN puede conducir a la creación o eliminación de sitios de restricción

preexistentes tales como *Bst*UI (secuencia reconocida: CGCG) o *Taq*I (secuencia reconocida: TCGA, Fig.12B).

Los cebadores de PCR utilizados en la reacción de PCR (templado de ADN bisulfitado) no contienen dinucleótidos CpG en su secuencia a fin de que el paso de amplificación no discrimine entre los alelos metilados y no metilados, dicha discriminación se realiza únicamente con el análisis de restricción.

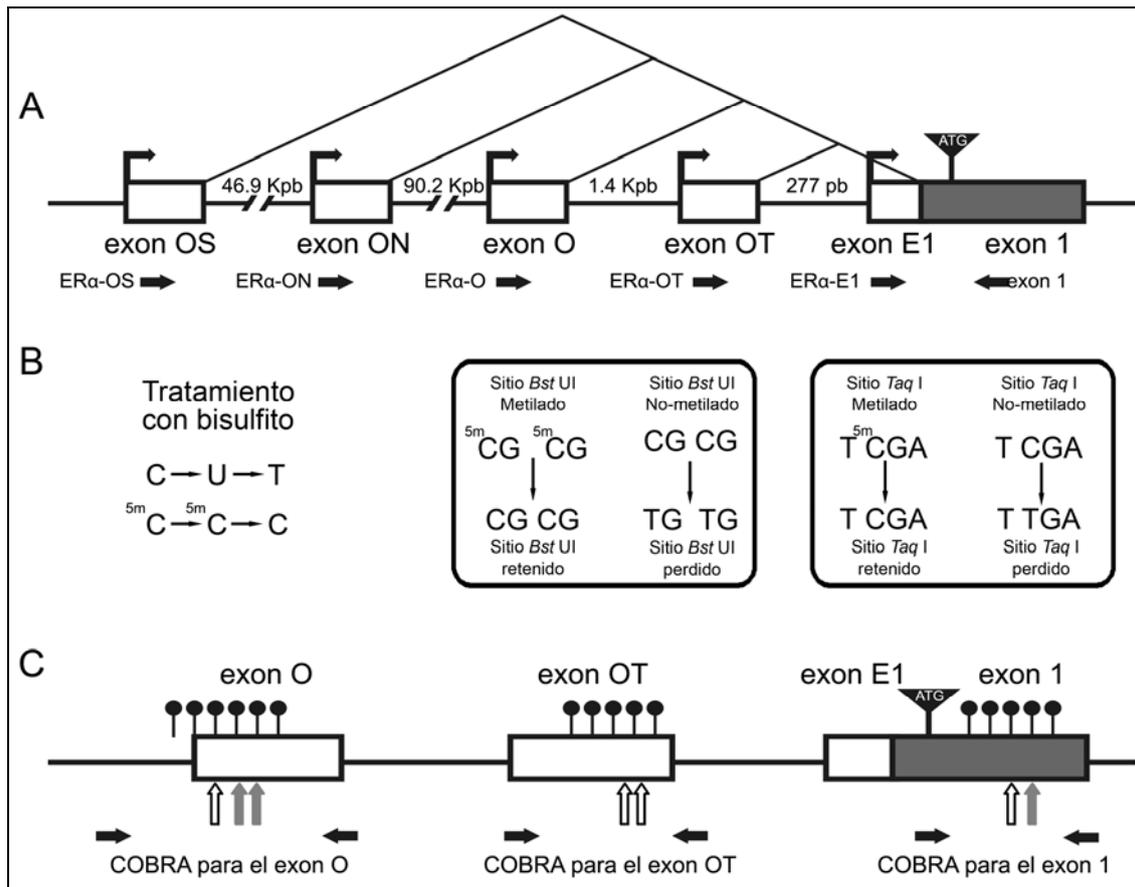


Figura 12 Diagrama de los procedimientos de PCR en tiempo real para los promotores de ERα y el análisis combinado de bisulfitación-restricción (COBRA). **(A)** Organización genómica de la región promotora del gen de ERα. La posición relativa y la orientación de los cebadores específicos diseñados para ser utilizados en las PCR en tiempo real específica de los promotores se indican con **flechas negras**. La región común a todos los exones 5'UTR se indica con una caja gris. **(B)** En el procedimiento de COBRA, el bisulfito convierte las citosinas no-metiladas (C) a uracilo dejando intactas las citosinas metiladas (^{5m}C). En la figura se ilustran los cambios esperables en los sitios de restricción luego de la reacción del ADN genómico con bisulfito. **(C)** La posición y orientación de los cebadores específicos utilizados para COBRA se indica con **flechas negras**. Las islas CpG se ilustran con **signos tipo paleta** y los sitios de restricción de *Bst*UI y *Taq*I se indican con **flechas blancas y grises** respectivamente.

Utilizando el programa bioinformático CpGPlot del EBI (European Bioinformatics Institute) disponible online (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>), identificamos

fragmentos ricos en el dinucleótido CpG (islas CpG) en la secuencia de los promotores de ER α activos en esta edad en el área preóptica (promotores O y OT) y en el exón 1 del gen de ER α (Fig.12C, también ver sección *Resultados*, pag.67). No identificamos islas CpG en la secuencia del promotor E1 como tampoco en los promotores inactivos OS y ON. Para los fines de ser utilizados en la técnica de COBRA, se constató que las islas CpG identificadas contuvieran al menos un sitio de restricción que fuese reconocido por las enzimas *Bst*UI y/o *Taq*I (Fig.12C). Para amplificar las islas CpG, se diseñaron cebadores de PCR complementarios a la secuencia del ADN modificado por bisulfito (Fig.12C, Tabla 2). Para la amplificación de las islas CpG, 5 μ l de cada ADN modificado químicamente fueron combinados con una mezcla conteniendo Cl₂Mg 2 mM (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP (Promega), y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen) en un volumen final de 25 μ l de buffer 1 \times PCR. Todas las reacciones fueron calentadas a 95°C durante 10 min antes de agregar 2,5 U de polimerasa de ADN Taq (Invitrogen). Las amplificaciones se llevaron a cabo durante 36 ciclos (45 seg 95°C, 45 seg 59°C y 1 min 72°C), seguido de un ciclo de extensión final de 2 min a 72°C. Para cada par de cebadores se realizaron controles con ADN genómico sin modificar y controles sin ADN.

TABLA 2. Cebadores utilizados en los experimentos de COBRA

Promotor bisulfitado	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplición (pb)
ER α -0	Sentido: ATGTTGATTTTAGTGGTGTTATTGT Antisentido: TCCAAAAATATCCATAAATTTATAAAAAAT	296
ER α -OT	Sentido: AAAAAGAAAGAAAAGAAATTAGTTTGTG Antisentido: CTAATCTCCCCTATTCTTAAACATC	281
ER α -E1	Sentido: TTTTGTTGTATTAGATTTAAGGGAA Antisentido: AAAAAAACCCCAAACCTATTAAC	272

Para asegurar que la digestión con enzimas de restricción en el paso posterior a la PCR fuera completa, cada producto de PCR (20 μ l) fue purificado a partir de geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Sigma) utilizando el

kit Wizard SV Gel and clean-up System (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Quince microlitros de cada producto de PCR fueron digeridos por separado con las enzimas *Bst*UI y *Taq*I. En esta técnica, el clivaje de los fragmentos de ADN amplificados por PCR ocurrirá solamente en aquellas secuencias en las que el dinucleótido CpG fue retenido durante la modificación química, debido a un residuo de citosina metilado. Para asegurar que la modificación química con bisulfito fuera completa, se realizó un control de digestión con una enzima de restricción cuya secuencia específica de corte se encontrara repetida dentro de las secuencias de ADN bisulfitado. Para ello se utilizó la enzima *Mse*I (secuencia reconocida: TTAA), la cual cortó los productos de PCR en varios fragmentos mas pequeños (datos no mostrados). Los pesos moleculares de los productos de PCR y de los fragmentos de restricción se determinaron por comparación con marcadores estándar de peso molecular (Cien Marker, Biodynamics, Buenos Aires, Argentina).

3.3.5- Detección de la expresión hipotalámica de ER α mediante inmunohistoquímica

Se utilizó una técnica estándar de inmunohistoquímica (avidina-biotina-peroxidasa) para visualizar la expresión hipotalámica de la proteína de ER α . Las muestras fueron pretratadas en microondas para la recuperación antigénica, seguido por un bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena y de las uniones inespecíficas. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-ER α (dilución 1:200, clon 6F-11, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) a 4°C durante 14-16 h, y luego con un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (dilución 1:200, Sigma) durante 30 min. Los controles negativos se realizaron mediante el reemplazo del anticuerpo primario con suero de conejo no-inmune (Sigma-Aldrich). La reacción de color fue desarrollada utilizando diaminobencidina-níquel (Sigma-Aldrich) como sustrato cromógeno (Varayoud y col., 2001). Las muestras obtenidas fueron deshidratadas y montadas en medio de montaje permanente (PMyR, Buenos Aires, Argentina).

3.3.6- Cuantificación de la expresión de ER α en el área preóptica mediante análisis de imágenes

El análisis de imágenes fue realizado utilizando el sistema Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) de acuerdo a lo previamente descrito (Ramos y col., 2002). Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara de video a colores Spot Insight V3.5, acoplada a un microscopio Olympus BH2 (iluminación, 100 W lámpara halógena de 12 V, equipado con una fuente de luz estabilizada), utilizando una objetiva D-plan 10X (NA=0.25). El microscopio fue previamente preparado para la iluminación Koehler. Un portaobjetos de referencia conteniendo secciones de tejido cerebral teñidas en ausencia de anticuerpo primario se utilizó para corregir iluminaciones desiguales (corrección de sombras) y para calibrar el sistema de medición determinando los valores inespecíficos de fondo. Se analizaron cuatro cerebros por grupo experimental en DPN8 (n=4) y cinco cerebros por grupo experimental en DPN21 (n=5). El AvPv fue identificado mediante la tinción de Nissl de un portaobjeto por serie y fue delimitado de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises y se midió la densidad óptica integrada (DOI) como una combinación lineal de la intensidad promedio y el área relativa ocupada por la marcación positiva. Al menos cuatro cortes histológicos, pertenecientes cada uno a una serie de seis cortes consecutivos abarcando el área estudiada, fueron medidos y promediados por animal. Este enfoque morfométrico posee una alta reproducibilidad, ya que las variables espaciales relativas son independientes de errores de sobre-muestreo en los que se puede incurrir al calcular volúmenes absolutos o número total de células (Gundersen y col., 1988; Palmer y col., 2000; Ramos y col., 2001).

3.3.7- Niveles séricos de 17 β -estradiol en ratas prepuberales

La concentración de 17 β -estradiol en ratas prepuberales fue determinada mediante radioinmunoensayo utilizando [2,4,6,7,16,17-3H(N)]E₂ (Perkin-Elmer

Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) y un anticuerpo específico cedido por el Dr. G.D. Niswender. Se utilizaron cinco mezclas de dos sueros de animales de DPN21 cada una (n=5) por grupo experimental. La sensibilidad del ensayo fue de 12,5 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayos fueron de 3,38% y 2,12% respectivamente.

3.3.8- *Análisis estadístico*

Todos los datos fueron calculados como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas *t* de doble cola. Cada grupo experimental fue comparado solamente con las hembras control, y las diferencias fueron consideradas significativas sólo si $P < 0,05$.

3.4- Desarrollo de un anticuerpo policlonal específico para la detección mediante inmunohistoquímica del represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA)

3.4.1- *Diseño bioinformático, amplificación y clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión del antígeno de REA*

La región de la secuencia del gen de REA a ser utilizada para generar el antígeno fue seleccionada utilizando la herramienta BioPlot del programa bioinformático **Vector NTI**, capaz de identificar zonas de la proteína de REA con alta antigenicidad teórica (Fig.22A, ver sección *Resultados*, pag.71). Para obtener la secuencia nucleotídica seleccionada se utilizó una estrategia de clonado direccional *EcoRI-XhoI* amplificando por PCR la región comprendida entre los aminoácidos 196-299 de la secuencia de rata (Nro. Genbank: NM_001013035). Los cebadores específicos utilizados fueron REA sentido, 5'-**ATTTGAATTC**Ggctgtagaagccaagcaag-3' y REA antisentido, 5'-**TTCGCTCGAG**tcatttctacccttgatg-3', donde en mayúsculas se muestran los extremos 5' no específicos de los cebadores y en negritas se resalta la secuencia de corte de las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (Promega) respectivamente utilizadas para el clonado direccional en el vector de expresión pGEX4T-3

(Fig.13, Stratagene Corp., La Jolla, CA). Para amplificar la secuencia del antígeno de REA se utilizó un programa de ciclado con 38 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 61°C, 1 min a 72°C usando como molde ADNc obtenido de una muestra de hipotálamo de rata hembra adulta.

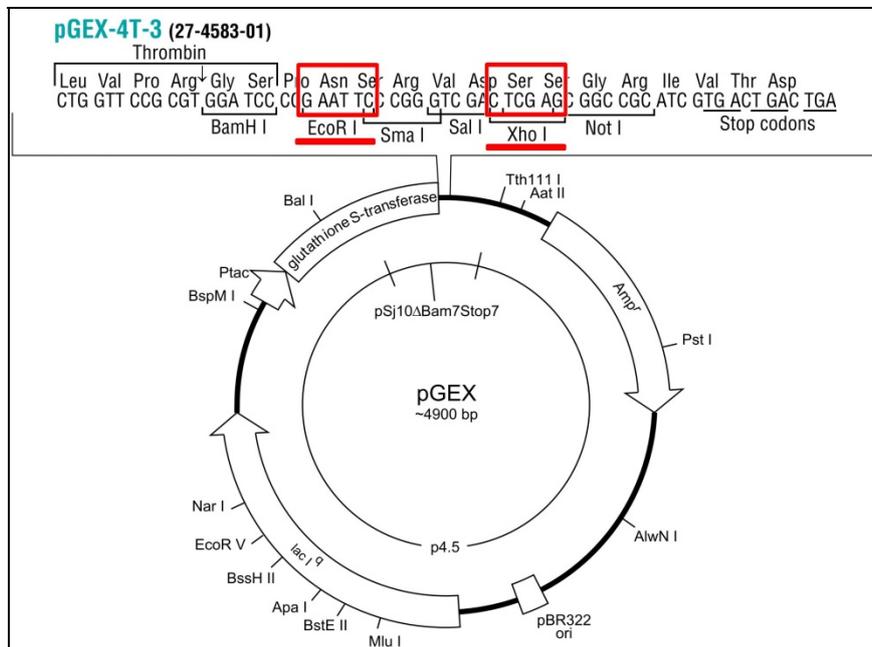


Figura 13 Plásmido pGEX4T-3 y estrategia de clonado direccional utilizados para la expresión del antígeno de REA como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-REA).

Los tubos de reacción se armaron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.2, y el producto de PCR obtenido se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and Clean-up System (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La identidad del fragmento de ADN obtenido se confirmó mediante un corte de restricción con la enzima *HinfI* (Fig.22B, ver sección *Resultados*, pag.71). El fragmento de ADN amplificado de la secuencia de REA y el vector pGEX4T-3 (Fig.13) fueron cortados con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* en buffer D (Promega) durante 2 h a 37°C. Los productos de los cortes de restricción fueron purificados a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and Clean-up System (Promega) y ligados durante toda la noche a 4°C utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Promega). Con el plásmido recombinante obtenido (pGEX-REA) se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5α (Stratagene), guardándose stocks de bacterias transformadas a -80°C y minipreps del plásmido pGEX-REA a -20°C.

3.4.2- Expresión y purificación del antígeno de REA

Para expresar en forma soluble la proteína recombinante GST-REA, células de *E.coli* JM109 (Stratagene) fueron transformadas con el vector pGEX-REA y cultivadas en medio 2YT (1,6% peptona de carne, 1% extracto de levadura, 0,5% ClNa). La expresión del fragmento de REA se indujo con IPTG (0,25 mM) como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-REA, ver Figura 13). Luego de la inducción el cultivo de células fue sonificado en baño de hielo (High Intensity Ultrasonic Processor, Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., Newton, CT, USA) y centrifugado a 14000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y la proteína de fusión fue purificada a partir del mismo utilizando una columna cromatográfica GSTrap™ (Amersham). La absorbancia a 280 nm fue registrada en espectrofotómetro (Beckman) y aquellas fracciones conteniendo la proteína GST-REA fueron homogeneizadas. La purificación fue chequeada en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 4-20%.

3.4.3- Generación y purificación del anticuerpo policlonal específico para la detección de REA

Se inmunizaron 2 conejos con aproximadamente 600 µg de proteína GST-REA purificada siguiendo el protocolo de Vaitukaitis y col. (Vaitukaitis y col., 1971). Tres, seis y ocho semanas después los conejos fueron inoculados con otros 600 µg de proteína GST-REA purificada. Este protocolo de inducción ha sido utilizado exitosamente en nuestro laboratorio para obtener títulos constantes de anticuerpos desarrollados contra otros antígenos (Rey y col., 2006; Varayoud y col., 2008b). Dos semanas luego del último estímulo los conejos fueron sacrificados y los sueros se almacenaron a -20°C.

La purificación de los sueros de conejo obtenidos se realizó mediante dos técnicas de cromatografía de afinidad. En una primera instancia fueron purificados utilizando una columna de 1 ml de matriz comercial de proteína A (Hi-Trap rProtein A FF, Amersham), permitiendo de este modo, aislar las inmunoglobulinas G (IgG) totales. La proteína A posee características que la convierten en una opción muy útil para la purificación de inmunoglobulinas, como ser: la interacción de los anticuerpos con esta proteína no modifica la

capacidad de interactuar con el antígeno, la proteína A es muy resistente a condiciones desnaturizantes, y a pesar de poseer una alta afinidad por el anticuerpo, dicha interacción puede romperse en condiciones de pH extremas. Luego, a partir de las fracciones de IgG totales aisladas se realizó una segunda cromatografía de afinidad, utilizando una columna cuya matriz se componía de agarosa unida a radicales N-hidroxisuccinimida (NHS) activados (Hi-Trap NHS activated HP, Amersham). Este tipo de cromatografía de inmunoafinidad, es el método comúnmente utilizado para purificar anticuerpos específicos para un antígeno particular a partir de una preparación de anticuerpos policlonales. Brevemente, 5 mg de proteína GST-REA purificada se concentraron con tubos Centricon (Millipore, Billerica, MA) a un volumen final de 1 ml. La solución de GST-REA se adicionó a la columna de 1 ml de lecho activado y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se desactivaron los grupos NHS activos remanentes y la columna se lavó con PBS, luego con solución de elución (glicina 100 mM pH 3) y finalmente se equilibró con PBS. La fracción enriquecida con IgG se sembró en la columna y se lavó con PBS. La elución se realizó con buffer de elución y se recogieron fracciones de 1 ml con 60 μ l de Tris-HCl 1,5 M pH 8,6, para neutralizar el eluido. La absorbancia a 280 nm fue registrada en espectrofotómetro (Beckman) y aquellas fracciones conteniendo el anticuerpo anti-REA doblemente purificado de cada uno de los conejos, fueron homogeneizadas y utilizadas para los inmunoensayos.

3.4.4- Caracterización de los anticuerpos para la detección de REA

3.4.4.1- Western blot

En primer lugar la especificidad de los anticuerpos obtenidos fue chequeada mediante western blot utilizando como controles positivos tejidos de hígado (Kurtev y *col.*, 2004) y glándula mamaria (Mussi y *col.*, 2006). Los tejidos fueron homogenizados en buffer de lisis RIPA (PBS 0,1 M pH 7, FNa 50 mM, EDTA 2 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, y SDS 0,1%) conteniendo inhibidores de proteasas (leupeptina 0,5 mM, pepstatina 0,5 mM, aprotinina 1 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 5 mM y ortovanadato de sodio 1 mM) utilizando un homogeneizador de tejido Ultra-Turrax con una herramienta de dispersión 5G

(IKA®-Werke, Staufen, Germany). Los tejidos homogenizados fueron centrifugados dos veces a 14000 rpm a 4°C durante 20 min, y los sobrenadantes colectados. La concentración de proteína en los homogenatos se determinó utilizando el método colorimétrico del ácido bicinconínico con un kit comercial de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Cantidades equivalentes de proteína (100 µg) de cada muestra se sembraron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 4-20%, fueron corridos en cubas electroforéticas, y luego se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar el western blot. Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon de uniones inespecíficas con leche descremada 5% p/v disuelta en buffer Tris-salino-Tween (TTBS; Tris 25 mM, ClNa 0.14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7,4) durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron luego lavadas brevemente con TTBS (0,5 M ClNa) dos veces, seguido de tres lavados con TTBS (0,5 M ClNa) en agitación de 10 min cada uno. Los anticuerpos anti-REA obtenidos de los conejos 1 y 2 fueron diluïdos 1:500 en leche descremada 2% p/v disuelta en TTBS y fueron incubados durante 1,5 h a 25°C en agitación. Las membranas fueron lavadas con TTBS (0,5 M ClNa) e incubadas en las mismas condiciones durante 1 h con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa en leche descremada al 2% disuelto en TTBS (1:5000; Sigma-Aldrich). Luego del lavado final en TTBS (0,5 M ClNa), la reacción de color fue desarrollada utilizando diaminobencidina (Sigma-Aldrich) durante 15 min. El peso molecular de las muestras fue determinado utilizando marcadores de peso estándar obtenidos de Amersham Biosciences.

3.4.4.2- Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.5 utilizando cortes histológicos de la región hipotalámica de hembras control y el anticuerpo anti-REA en una dilución de 1:50. Para evaluar la especificidad del anticuerpo, el péptido de GST-REA utilizado como antígeno fue usado para preadsorber el anticuerpo de REA incubando 1 µg de anticuerpo con 10-20 µg de antígeno durante 24 h a 4°C.

3.4.4.3- Doble inmunofluorescencia

La doble inmunofluorescencia se realizó siguiendo protocolos previamente descritos (Varayoud y col., 2008b). Las secciones de tejido cerebral fueron deparafinizadas, rehidratadas y sometidas a recuperación antigénica en horno de microondas. Para minimizar las uniones inespecíficas las secciones de tejido cerebral se bloquearon con suero normal de cabra (Sigma-Aldrich) durante 1 h. Para la identificación del fenotipo neuronal, la expresión de la proteína NeuN fue detectada utilizando un anticuerpo monoclonal (clon MAB377, dilución 1:200) de Chemicon (Temecula, CA). La incubación con los anticuerpos primarios anti-REA (dilución 1:50) y anti-NeuN se realizó durante toda la noche a 4°C. Las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h, y luego se lavó tres veces con PBS por un total de 45 min. Los anticuerpos secundarios fueron anti-conejo conjugado a isotiocianato de tetrametilrodamina (016-020-084, rojo, dilución 1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y anti-ratón generado en cabra conjugado a Cy2 (115-225-003, verde, dilución 1:100; Jackson ImmunoResearch). Por último, todas las secciones fueron montadas con medio de montaje fluorescente Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y almacenadas en oscuridad a 4°C. En todos los ensayos se incluyeron controles incubados con el buffer de dilución de los anticuerpos primarios (3% BSA, 0,1% Tween20 in PBS). Todos los cortes inmunomarcados fueron examinados utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX-51 equipado con los filtros adecuados (Olympus). Las imágenes fueron obtenidas utilizando una cámara digital USB 2.0 de alta resolución (QImaging Go-3; QImaging, Surrey, British Columbia, Canadá).

3.5- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la respuesta hipotalámica a los estrógenos en hembras adultas

3.5.1- Obtención de las muestras

En esta etapa del trabajo se utilizaron ratas hembra de DPN85 de los grupos: control, BPA20 y BPA.05. Luego de completado el período de exposición

posnatal temprano estos animales fueron destetados en DPN21, mantenidos en jaulas de 4-5 animales y alimentados con alimento balanceado y agua de bebida *ad libitum* hasta su utilización.

Se estudiaron los efectos a largo plazo de la exposición neonatal a BPA sobre:

- El ciclo estral (hembras no castradas).
- El control postranscripcional de la expresión de LHRH.
- La respuesta estrógeno-dependiente de núcleos hipotalámicos íntimamente ligados al control del pico preovulatorio de LH.
- Los aspectos receptivos y proceptivos de la conducta sexual.
- La respuesta estrógeno-dependiente de núcleos hipotalámicos implicados en el control de la conducta sexual.

3.5.2- Citología vaginal

Trabajos previos han reportado que hembras expuestas perinatalmente a un rango de dosis de BPA que van desde 1,2 mg/kg BPA (Rubin y *col.*, 2001) hasta 62,5 mg/kg BPA (Fernandez y *col.*, 2009) exhiben durante la etapa adulta de vida alteraciones en sus ciclos estrales. Para determinar si la dosis baja de BPA usada en este estudio (0,05 mg/kg BPA) provoca alteraciones de los patrones de ciclicidad estral durante la adultez, a partir del DPN85 se analizó la citología vaginal de animales intactos (controles) y del grupo BPA.05 (n=20 por grupo experimental) durante quince días.

3.5.3- Estudio piloto de la inducción estrogénica del pico de LH en ratas ovariectomizadas

Para evaluar la efectividad del modelo de estimulación estrogénica utilizado en este trabajo un grupo de hembras control (n=12) fue ovariectomizado bilateralmente (OVX) bajo anestesia con éter, y se lo dejó recuperar durante 14 días. Segmentos de tubo Silastic (longitud 2 cm, diámetro interno 1,57 mm,

diámetro externo 3,18 mm; Dow Corning Corp., Midland, MI) fueron rellenos con una solución de aceite de maíz conteniendo 17β -estradiol en una concentración de 1 mg/ml y los extremos fueron sellados con el adhesivo siliconado Nusil (NuSil Technology LLC, Carpinteria, CA). Previo a su uso, todos los implantes de Silastic fueron incubados en un animal huésped durante 24 h para evitar el alto pulso de liberación inicial de 17β -estradiol, y luego lavados en PBS y alcohol 96° durante 10 min. En el DPN100, los animales OVX fueron anestesiados con éter y dos implantes de Silastic fueron colocados bajo la piel a través de una pequeña incisión hecha en el lomo del animal, y luego empujados hacia los flancos del animal. La colocación de los implantes conteniendo 17β -estradiol se llevó a cabo a las 09:00-10:00 h (designado Día 0). A las 08:00 h y 16:00 h del Día 2 los animales fueron sacrificados por decapitación (n=6 por punto horario), y se recogieron muestras de sangre troncal y tejido hipotalámico para estudiar los niveles séricos de LH y los niveles de expresión de las especies de ARNm de LHRH presentes en el hipotálamo (ver más adelante). Nuestros resultados demuestran que este modelo induce un pico de LH a las 16:00 h del Día 2 (Fig.28A, ver sección *Resultados, pag.77*), lo cual está de acuerdo con lo previamente reportado por otros autores (Herath y col., 2001). Por lo tanto, este horario fue elegido para estudiar los efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la regulación del procesado postranscripcional del pre-ARNm de LHRH y la expresión del ER α , PR y sus cofactores de transcripción, SRC-1 y REA, en el hipotálamo.

3.5.4- Inducción estrogénica del pico de LH en ratas ovariectomizadas neonatalmente expuestas a BPA

De acuerdo a los resultados obtenidos en la experiencia piloto, todas las hembras experimentales fueron OVX en DPN100 y dos implantes de Silastic conteniendo 17β -estradiol fueron colocados bajo la piel del animal a las 09:00-10:00 h del Día 0. Los animales fueron sacrificados por decapitación a las 16:00 h del Día 2, se recogió sangre troncal y el suero fue guardado a -20°C hasta su posterior uso. Para la extracción de ARN (n=5 por grupo), bloques de tejido conteniendo el hipotálamo fueron micro-disecados bajo un microscopio

de disección (Leica Corp., Buffalo, NY, USA) inmediatamente luego de la cirugía. El hipotálamo fue disecado, delimitado rostralmente por el límite rostral del quiasma óptico, caudalmente por el límite caudal de los cuerpos mamilares, dorsalmente por la porción ventral de la comisura anterior, y lateralmente por una línea virtual proyectada desde la cápsula interna al límite exterior de los tractos ópticos (Paxinos y Watson, 2005). Luego de la micro-disección, las muestras de tejido fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C hasta su utilización. Para inmunohistoquímica ($n=6$ por grupo), los cerebros fueron micro-disecados y fijados por inmersión en paraformaldehído 4% durante 24 h a $4-8^{\circ}\text{C}$, y procesados hasta su inclusión en parafina. Al menos cuatro series de seis cortes consecutivos de $5\ \mu\text{m}$ de espesor (por núcleo) abarcando los núcleos AvPv, MPN, Arc y VMHvl en el plano coronal (Paxinos y Watson, 2005) fueron montados en portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltrióxido (Sigma-Aldrich) y secados a 37°C durante 24 h.

3.5.5- Transcripción reversa y análisis de la expresión del ARNm de LHRH mediante PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo optimizado de RT-PCR para analizar la expresión citoplasmática del ARNm maduro de LHRH y el ARN de LHRH conteniendo el intron A. El ARN citoplasmático fue extraído de acuerdo a reportes previos (Son y col., 2003), con ligeras modificaciones. Brevemente, se realizó la homogenización de los tejidos en buffer de lisis (sucrosa 0,3 M, deoxicolato de sodio 0,25%, Tris-HCl 10 mM pH 7,4; Cl_2Mg 1,5 mM, y Nonidet P-40 0,5%) seguido de una centrifugación a $3000 \times g$ durante 5 min para excluir la fracción nuclear. La fase citoplasmática (fase superior) fue transferida a un nuevo tubo y el ARN fue extraído con reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La concentración de ARN fue medida en espectrofotómetro utilizando el cociente A_{260}/A_{280} , utilizando solamente las muestras con un cociente A_{260}/A_{280} mayor a 1,9 las cuales fueron guardadas a -80°C hasta su utilización. La transcripción reversa se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.2. Seis muestras por punto horario estudiado en

la experiencia piloto y cinco muestras por grupo experimental fueron analizadas por duplicado y se incluyó una muestra sin transcriptasa reversa para detectar contaminación por ADN genómico. Los pares de cebadores utilizados para la amplificación de ARNm maduro (E1-E3, Fig.28B) y ARN conteniendo el intron A (IA-E3, Fig.28B, ver sección *Resultados*, pag.77) fueron: E1 sentido 5'-ggaagacttcagtggtcccaga-3', IA sentido 5'-tgtgtctgcagtttctgtgg-3', E3 antisentido 5'-agagctcctcgcagatcccta-3'; y para la proteína ribosomal L19 (gen de control interno): L19 sentido 5'-agcctgtgactgtccattcc-3', L19 antisentido 5'-tggcagtagcccttctcttc-3'. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el sistema Real-Time DNA Engine Opticon (Bio-Rad Laboratories, Inc., Waltham, MA) y colorante SYBR Green I (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ). Para la amplificación de los ADNc, los tubos de reacción se armaron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.2. Luego de una desnaturalización inicial de 1 min a 95°C, la mezcla de reacción fue sometida a ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C por 15 seg, hibridación a 57°C (E1-E3, IA-E3) y 55°C (L19) por 15 seg, y extensión a 72°C por 15 seg (L19), 40 seg (E1-E3) o 1 min (IA-E3). La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación. El cambio en los niveles de expresión fue determinado mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). El ciclo umbral (C_t) y la eficiencia de cada muestra fue calculada utilizando el programa de análisis Opticon Monitor (MJ Research, Waltham, MA). No se observaron diferencias significativas en los valores de C_t de L19 entre los grupos experimentales.

3.5.6- Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica

El anticuerpo utilizado para la detección de ER α (clon 6F-11, dilución 1:200) fue comprado a Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK), los anticuerpos para la detección de PR (A0098, dilución 1:200) y SRC-1 (clon 128E7, dilución 1:3200) fueron comprados a Dako Corp. (Carpinteria, CA) y Cell Signaling Technology (Boston, MA), respectivamente. Los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-

ratón (conjugado a biotina, B8895/B8774, dilución 1:200) fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO).

3.5.7- Cuantificación de la expresión hipotalámica de proteínas mediante análisis de imágenes

La inmunomarcación de las proteínas específicas estudiadas en esta etapa del trabajo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.5. El análisis de imágenes fue realizado según lo descrito en la sección 3.3.6. Se analizaron seis cerebros por grupo experimental (n=6), identificando los núcleos AvPv, MPN, Arc y VMHvl mediante tinción de Nissl de un portaobjeto por serie y delimitándolos de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises y se determinó el porcentaje de área inmuno-marcada. Por lo menos cuatro cortes histológicos pertenecientes cada uno a una serie distinta de seis cortes consecutivos por serie abarcando los diferentes núcleos estudiados fueron medidos y promediados por animal.

3.5.8- Análisis de la expresión de las isoformas de PR mediante western blot

La presencia/ausencia de las variantes hipotalámicas del receptor de progesterona, PR-A y PR-B, fue evaluada mediante western blot cualitativo. Las proteínas totales fueron extraídas de bloques de tejido hipotalámico provenientes de seis animales (n=6) por grupo experimental. Las proteínas fueron extraídas y cuantificadas de acuerdo a lo descrito en la sección 3.4.4.1. Cantidades equivalentes de proteína (100 µg) de cada muestra se sembraron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 4-20% y fueron corridos en cubas electroforéticas, y luego se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar el western blot. Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon de uniones inespecíficas con leche descremada 5% p/v disuelta en buffer TTBS durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas brevemente con TTBS (0,5 M ClNa) dos veces seguido de tres lavados en agitación de 10 min cada uno. El anticuerpo primario de PR (A0098,

Dako Corp. Carpintería, CA) fue diluído 1:100 en leche descremada 2% p/v disuelta en TTBS y fue incubado durante 1,5 h a 25°C en agitación. Los lavados y el sistema de revelado se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.4.4.1.

3.5.9- Evaluación de la conducta sexual

La conducta sexual de las hembras experimentales fue evaluada en una jaula de observación construida en Plexiglas™, utilizando para ello ratas macho de sexualidad comprobada. Ratas experimentales OVX de DPN100 fueron sujetas a un protocolo de administración de hormonas previo al test, el cual consistió en una inyección subcutánea de benzoato de estradiol (EB, 10 µg en 0,1 ml de aceite de maíz) 24 h previas al test, y una inyección subcutánea de progesterona (P, 500 µg en 0,1 ml de aceite de maíz) 4 h antes del test. Todos los test fueron realizados durante la última hora del ciclo de luz-oscuridad (19:00-20:00 h), momento en el cual las hembras intactas de nuestra colonia presentan conducta tanto receptiva como proceptiva. Este modelo hormonal de inducción de la conducta sexual fue demostrado como efectivo en la inducción de conducta sexual en respuesta a machos estímulo (Marin Bivens y Olster, 1997). Antes del test los machos sexualmente experimentados se colocaron con una hembra estímulo durante 5 min para despertar su interés sexual, y luego fueron aclimatados a la jaula de observación por al menos 5 min. Las hembras utilizadas como estímulo fueron ratas OVX no-experimentales que recibieron el protocolo de inducción de conducta sexual previamente descrito. Luego de cada test la jaula de observación fue íntegramente lavada con alcohol 70° y la viruta de madera cambiada por nueva. Se evaluó la conducta sexual de cinco hembras de cada grupo (n=5) en dos ocasiones distintas, con machos distintos en cada una de las ocasiones, durante un período de dos semanas. La duración de los test fue de 10 min o 10 monturas del macho sobre la hembra (lo que ocurriese primero) y todos los test fueron grabados con una videocámara para luego ser analizados. La receptividad sexual se cuantificó utilizando el Cociente de Lordosis (CL, número de respuestas de lordosis positiva/número de monturas × 100), y la Tasa de Lordosis (TL, grado promedio

de arqueo cervical utilizando el siguiente criterio: 0 = sin lordosis, 1 = suave, 2 = moderado, 3 = fuerte flexión dorsal) (Marin Bivens y Olster, 1997). La conducta proceptiva fue evaluada mediante el conteo del número de movimientos de oreja, saltos y corridas durante el transcurso del test.

3.5.10- Niveles séricos de LH

Se utilizó el RIA heterólogo desarrollado por Niswender y colaboradores (Niswender y col., 1968). Como primer antisuero se utilizó el NIDDK-anti-rat-LH RIA-11. El Standard de referencia fue el NIDDK-rat-LH-RP3. La sensibilidad del ensayo fue de 0,6 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 7,2 % y 11,4 % respectivamente. Sueros provenientes de seis muestras por punto horario estudiado en la experiencia piloto y de al menos nueve sueros por grupo experimental fueron utilizados para determinar los niveles séricos de LH.

3.5.11- Análisis estadístico

Todos los datos fueron calculados como la media \pm E.E.M. El análisis estadístico de la dependencia horaria del pico de LH, de la expresión del ARN de LHRH y de los patrones de ciclicidad estral fue realizado mediante pruebas *t* de doble cola. Para el resto de las comparaciones se realizaron análisis de ANOVA para obtener la significancia total (testando la hipótesis de que la respuesta no es homogénea entre los distintos grupos) y las diferencias entre los grupos fueron determinadas utilizando el pos-test de Dunnet. Valores de $P < 0,05$ se aceptaron como significativos en todos los casos.

3.6- Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo

3.6.1- Obtención de las muestras

En esta etapa del trabajo se utilizaron ratas macho control y ratas macho expuestas neonatalmente a DES. En DPN8, machos de ambos grupos fueron inyectados intraperitonealmente con el análogo de la timidina, bromo-deoxiuridina (BrdU, 60mg/kg de peso, Sigma). Para determinar el índice de proliferación de las CPN en DPN8, un grupo de animales (n=12 por grupo experimental) fue sacrificado por decapitación 4 h luego de la inyección de BrdU. Para analizar el índice de supervivencia de las CPN, otro grupo (n=10 por grupo experimental) fue sacrificado dos semanas después (DPN21) del tratamiento con BrdU. Para evaluar la proliferación de las CPN dos semanas luego de finalizado el tratamiento con DES, otro grupo de animales fue inyectado con BrdU en DPN21 y sacrificado 4 h después (n=13 por grupo experimental). Para el estudio mediante inmunohistoquímica, los cerebros fueron micro-diseccionados y fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 24 h a 4-8°C. Los tejidos fijados fueron deshidratados en series de etanol de graduación ascendente, clarificados en xilol y embebidos en parafina. Series de cortes consecutivos de 5 µm de espesor abarcando el giro dentado en el plano coronal (Paxinos y Watson, 2005) fueron montados en portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltrietoxilano (Sigma-Aldrich) y secados a 37°C durante 24 h. Para RT-PCR en tiempo real, un segundo grupo de cerebros (n=10 por grupo experimental por edad) fue rápidamente removido y el polo dorsal del hipocampo (incluyendo el giro dentado) fue micro-diseccionado utilizando agujas huecas (Palkovits y Brownstein, 1983). Luego de la micro-disección, las muestras de tejido fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C hasta su utilización.

3.6.2- Expresión de proteínas en el hipocampo de ratas macho expuestas posnatalmente a DES

Para visualizar la expresión de las proteínas de interés en el hipocampo se utilizó una técnica estándar de inmunohistoquímica de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.5. La incorporación de BrdU en la fase S del ciclo celular se evaluó de acuerdo a lo previamente descrito (Kass y *col.*, 2000). Para la inmunodetección de BrdU, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU (clon 85-2C8, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) en una dilución 1:100. La inmunomarcación de ER α se realizó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ER α (clon 6F-11, Novocastra) en una dilución de 1:200 y para la detección de la proteína p27^{kip1} se utilizó un anticuerpo policlonal (sc-528, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA) en una dilución 1:500. Las muestras fueron luego incubadas con un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo biotinilado, según correspondiera, (dilución 1:200, Sigma) durante 30 min. La reacción de color fue desarrollada utilizando diaminobencidina (Sigma-Aldrich) como sustrato cromógeno (Varayoud y *col.*, 2001). Las muestras obtenidas fueron contracoloradas con hematoxilina de Harris (Biopur, Rosario, Argentina) y montadas en medio de montaje permanente (PMyR, Buenos Aires, Argentina). Los controles negativos se realizaron mediante el reemplazo del anticuerpo primario con suero de conejo no-inmune (Sigma-Aldrich), o realizando un ensayo en muestras provenientes de animales no inyectados con BrdU.

3.6.3- Caracterización del fenotipo de CPN en estado inactivo o de proliferación

Para identificar el fenotipo de las células en estado inactivo o de proliferación, se desarrolló una segunda inmunomarcación luego de la detección de BrdU o p27^{kip1} utilizando diferentes anticuerpos: 1-anti-nestina (identificando las CPN tipo-I y tipo-II) (Filippov y *col.*, 2003), 2- anti-calbindina (para detectar neuronas granulares maduras), o 3- anti-GFAP (para detectar astrocitos) como segundos anticuerpos primarios. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con anti-nestina (dilución 1:200, clon de rata 401, BD Pharmingen, San Jose, CA), anti-calbindina-D-28-K (dilución 1:200, KD-15, Sigma), o anti-GFAP (dilución 1:100, Sigma). La reacción de color se desarrollo con el método de la estravidina-biotina-peroxidasa, utilizando en este segundo ensayo

diaminobencidina-níquel como sustrato cromógeno. Las muestras obtenidas fueron contracoloreadas con hematoxilina de Harris (Biopur, Rosario, Argentina) y montadas en medio de montaje permanente (PMyR, Buenos Aires, Argentina).

3.6.4- Detección de apoptosis in situ

Las muestras fueron analizadas para detectar *in situ* la presencia de hebras de ADN rotas (células apoptóticas) utilizando la técnica de TUNEL (ApopTag, Intergen Co., Purchase, NY). Luego de la deparafinización y rehidratación, las muestras fueron incubadas con proteinasa K (20 µg/ml) (Intergen) a 37°C durante 15 min y luego tratadas con peróxido de hidrógeno en PBS a temperatura ambiente durante 10 min para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Las muestras fueron luego incubadas con una mezcla de trifosfatos de desoxinucleótidos marcados con digoxigenina, trifosfatos de desoxinucleótidos sin marcar, y enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) en una cámara húmeda a 37°C durante 1 h. Las muestras fueron luego lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a peroxidasa a 20°C durante 30 min y se utilizó diaminobencidina como sustrato cromógeno (Sigma). Las muestras obtenidas fueron contracoloreadas con hematoxilina de Mayer, deshidratadas y montadas en medio de montaje permanente (PMyR, Buenos Aires, Argentina). Los controles negativos se realizaron agregando agua destilada en lugar de enzima TdT. Como control positivo, junto a las muestras experimentales se procesó de la misma forma una próstata de rata en involución luego del segundo día de castración.

3.6.5- Morfometría

Para evitar interferencias entre posibles gradientes neurogénicos (Crespo y col., 1986) y diferencias generadas a raíz del tratamiento, la misma región del hipocampo fue analizada en todos los grupos para BrdU, marcadores neuronales y la técnica de TUNEL. El área evaluada en esta parte del trabajo

estuvo limitada al polo dorsomedial del hipocampo (Fig.14), en la región donde el giro dentado está horizontalmente orientado debajo del cuerpo caloso y las láminas externa e interna se juntan en la cresta (formando un bloque de tejido de aproximadamente 0,8 mm de profundidad extendiéndose en dirección caudal desde la aparición rostral de la CCG) (Ciaroni y *col.*, 1999; Kuhn y *col.*, 1996; Palmer y *col.*, 2000). La ZSG se definió como una banda de 150 μm inmediatamente adyacente a la superficie hiliar de la CCG. El conteo de células se realizó de acuerdo a lo previamente descrito por otros autores (Ciaroni y *col.*, 1999; Palmer y *col.*, 2000). Para calcular las proporciones de cada fenotipo celular y la densidad de células BrdU-(+) en el giro dentado; y, el número total de células BrdU-(+) o p27^{kip1}-(+) y sus respectivos fenotipos se analizaron seis o más muestras pertenecientes a series de seis cortes consecutivos por animal.



Figura 14 Esquema representativo del área hipocámpica evaluada. En el gráfico se observan dos cortes seriados rostro-caudalmente en el plano coronal conteniendo el hipocampo (sombreado en verde). La línea de puntos rojos demarca el área dorso-medial evaluada. Adaptado de Paxinos y Watson, 2005 (Paxinos y Watson, 2005).

Para evaluar el polo dorsomedial del hipocampo entero, las diferentes series de cortes de tejido en el plano coronal se recogieron con una separación en la dirección caudal de aproximadamente 120 μm . La población de células ER α (+) y la proporción de células apoptóticas se evaluó de la misma forma. Toda la información fue representada como densidad espacial de células (número de células/ mm^2 de área evaluada) o proporciones relativas. El análisis de imágenes fue realizado utilizando el sistema Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) de acuerdo a lo previamente descrito (Ramos y col., 2002). Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara de video a colores Spot Insight V3.5, acoplada a un microscopio Olympus BH2 (iluminación, 100 W lámpara halógena de 12 V, equipado con una fuente de luz estabilizada), utilizando una objetiva D-plan 10X (NA=0,25). Para calcular el volumen total analizado de la CCG y la ZSG, dos muestras consecutivas cada 120 μm fueron seleccionadas y se delimitó la CCG y la ZSG utilizando una objetiva con lente de bajo aumento. La estimación de los volúmenes de CCG y la ZSG se realizó de acuerdo al principio de Cavalieri (van Praag y col., 1999). Las áreas fueron calculadas mediante el programa Image Pro-Plus y el volumen total de cada hemisferio se estimó como la suma de las áreas multiplicado por la distancia entre las muestras analizadas.

3.6.6- Análisis de la expresión hipocámpica de los mensajeros de VEGF y BDNF mediante PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo optimizado de RT-PCR para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de VEGF, BDNF y la proteína ribosomal L19 en el giro dentado de ratas macho de DPN8 y DPN21. Muestras individuales del giro dentado de cada grupo experimental (n=10 por grupo experimental por edad) fueron homogenizados en reactivo TRIzol y el ARN total fue extraído de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Invitrogen). La concentración de ARN fue medida en espectrofotómetro utilizando el cociente A_{260}/A_{280} , utilizándose solamente aquellas muestras con un cociente A_{260}/A_{280} mayor a 1,9 las cuales fueron guardadas a -80°C hasta su utilización. La transcripción reversa se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.2. Todas las muestras retro-

transcriptas a ADNc fueron amplificadas por duplicado o triplicado y se incluyó una muestra sin transcriptasa reversa para detectar contaminación por ADN genómico. Los pares de cebadores utilizados para la amplificación del ARNm de VEGF, BDNF y L19 se muestran en la Tabla 3. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el sistema Real-Time DNA Engine Opticon (Bio-Rad Laboratories, Inc., Waltham, MA) y el colorante SYBR Green I (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ).

TABLA 3. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real

Gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplificación (pb)	Número de Genbank
BDNF	Sentido: AGCCTCCTCTGTCTTTCTGCTGGA Antisentido: CTTTTGTCTATGCCCTGCAGCCTT	298	NM_012513
VEGF	Sentido: CTGCTCTCTTGGGTGCACTGG Antisentido: GGTTTGATCCGCATGATCTGCAT	320	NM_031836.1
L19	Sentido: GAAATCGCCAATGCCAACTC Antisentido: ACCTTCAGGTACAGGCTGTG	290	NM_031103

Los tubos de reacción fueron armados de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.2 y la pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación consistente. El cambio en los niveles de expresión fue determinado mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Higuchi y *col.*, 1993). El ciclo umbral (C_t) de cada muestra fue calculada utilizando el programa de análisis Opticon Monitor (MJ Research, Waltham, MA). No se observaron diferencias significativas en los valores de C_t de L19 entre los grupos experimentales.

3.6.7- Análisis estadístico

Todos los datos fueron calculados como la media \pm E.E.M. Para el análisis estadístico se utilizó el test de Mann-Whitney, y las diferencias fueron consideradas significativas sólo si $P < 0,05$.

4- Resultados

4- RESULTADOS

4.1- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la diferenciación sexual del hipotálamo

4.1.1- Efectos de la exposición a dosis altas y bajas de BPA sobre la expresión del ARNm de ER α en el área preóptica hipotalámica de ratas hembra prepuberales

En concordancia con lo descrito en trabajos anteriores (DonCarlos y col., 1995), en DPN8 observamos una mayor expresión del ARNm de ER α en el área preóptica hipotalámica de las hembras control respecto de los machos ($P < 0,05$; Fig.15A).

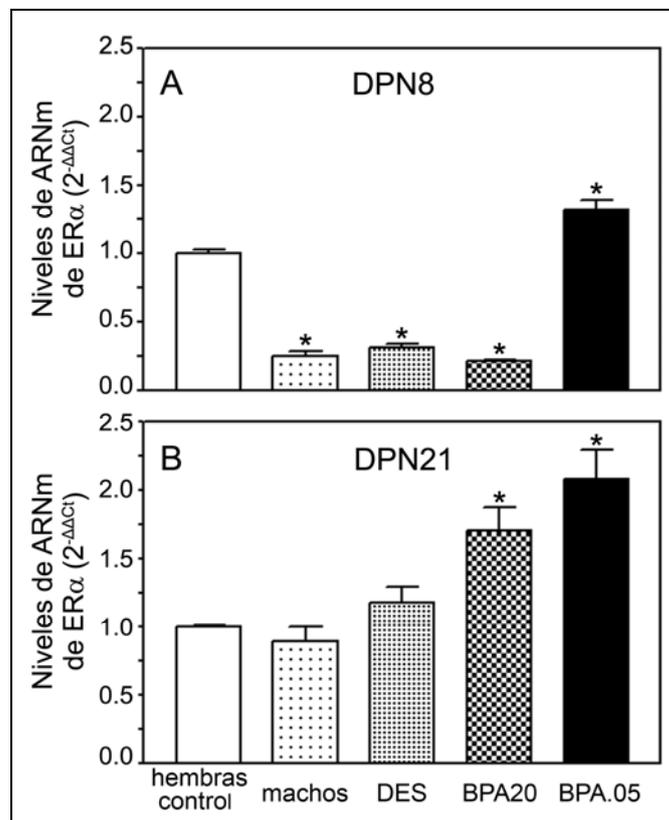


Figura 15 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión del ARNm de ER α en el área preóptica de ratas de DPN8 (A) y DPN21 (B). Los niveles relativos de expresión del ARNm se cuantificaron mediante PCR en tiempo real y los cambios en la expresión respecto de las hembras control se calculó mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A los controles se les asignó el valor de referencia de 1 y todos los valores se expresaron como la media \pm E.E.M de al menos tres determinaciones independientes (*, $P < 0,05$ vs. hembras control).

Las hembras expuestas a DES presentaron una defeminización en la expresión del ARNm de ER α , ya que ésta fue disminuída respecto de las hembras control

y similar a los machos ($P<0,01$; Fig.15A). La exposición neonatal a BPA produjo efectos opuestos dosis-dependientes: en las hembras expuestas a BPA20 la expresión del ARNm de ER α disminuyó aproximadamente cuatro veces en comparación con las hembras control ($P<0,001$; Fig.15A). Por el contrario, en las hembras expuestas a la dosis baja de BPA (BPA.05) la expresión hipotalámica de ARNm de ER α se incrementó en aproximadamente 1,4 veces respecto de las hembras control ($P<0,05$; Fig.15A). Para conocer si las alteraciones observadas en DPN8 eran de naturaleza transitoria o permanente estudiamos la expresión hipotalámica del ARNm de ER α dos semanas después de finalizada la exposición a xenoestrógenos. En DPN21, en contraste con lo observado en DPN8, la expresión hipotalámica del ARNm de ER α fue similar en hembras control, machos y hembras DES (Fig.15B). En DPN21 ambos grupos de hembras tratadas con BPA presentaron un claro aumento en la expresión hipotalámica del ARNm de ER α ($P<0,05$; Fig.15B) independientemente de la dosis estudiada. Resulta interesante destacar que los altos niveles de expresión del ARNm de ER α observados en las hembras BPA.05 de DPN8 persistieron hasta DPN21, incrementándose hasta cerca de 2,1 veces ($P<0,05$; Fig.15B).

4.1.2- La exposición neonatal a BPA altera la abundancia relativa de los transcriptos de ER α provenientes de distintas secuencias promotoras

Para determinar si los cambios en la expresión hipotalámica del gen ER α están asociados a cambios en la actividad relativa de sus promotores transcripcionales, estudiamos por RT-PCR en tiempo real la expresión de transcriptos conteniendo los exones codificantes de las regiones no traducidas 5' (5'UTR) correspondientes a cada uno de las regiones regulatorias descritas para el ER α . Para tal fin, se diseñaron cebadores-sentido específicos para los exones 5'UTR OS, ON, OT, O, E1 y un cebador-antisentido específico para el exón 1 del gen ER α (descrito en la Tabla 1, Fig.12A, ver sección *Materiales y Métodos*, pag.38). Las condiciones óptimas de reacción fueron evaluadas en primer lugar en ADNc obtenido a partir de una muestra de útero de una rata

adulta no-experimental, observando para todos los pares de cebadores una sola banda del peso molecular esperado (Fig.16).

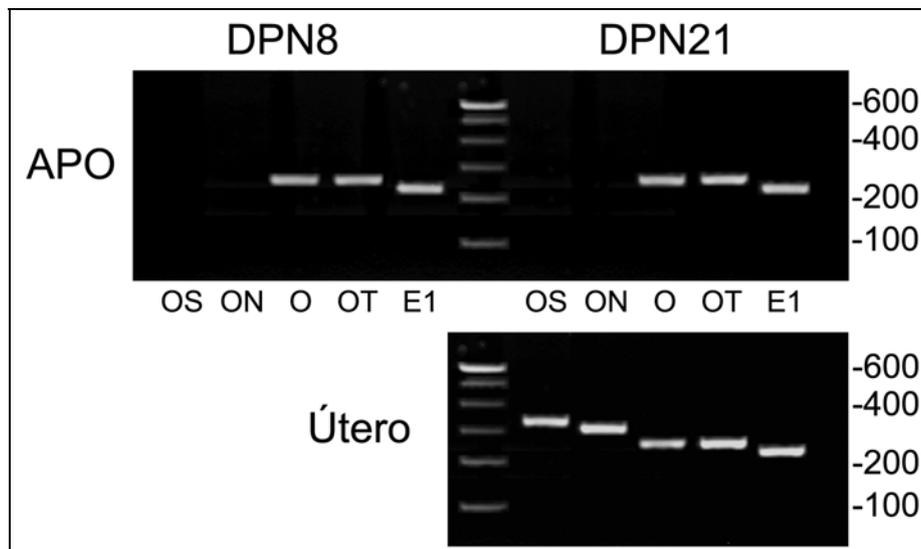


Figura 16 Promotores del gen ER α utilizados en el área preóptica de la rata. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio representativo de las especies de ARNm de ER α conteniendo los distintos exones 5'UTR en el área preóptica (APO) de ratas de DPN8 y DPN21. En esta región no se detectaron transcritos provenientes de los promotores OS y ON en ningún grupo experimental. Como control positivo de las reacciones de PCR específicas para los promotores se utilizó ADNc de útero de rata adulta no experimental.

Determinamos luego que en el área preóptica hipotalámica, la expresión del gen ER α está regulada a través de los promotores OT, E1 y O (Fig.16), en todos los grupos y edades estudiadas. No detectamos expresión de transcritos conteniendo los exones ON u OS en el área preóptica en ninguna de las edades estudiadas en esta etapa del trabajo. En DPN8, la expresión de las variantes 5'UTR del gen ER α demostró ser sexualmente dimórfica, ya que se observaron mayores niveles de expresión de transcritos ER α -OT, ER α -O y ER α -E1 en las hembras control respecto de los machos ($P < 0,05$; Fig.17A-C). Las hembras expuestas a DES presentaron bajos niveles de transcritos ER α -OT y ER α -O comparadas con las hembras control ($P < 0,05$; Fig.17A, B), mientras que los niveles de expresión de transcritos ER α -E1 fueron aproximadamente 1,6 veces mayores que en las hembras control ($P < 0,05$; Fig.17C). En el caso de las hembras expuestas a BPA, pudimos observar que la expresión de las variantes 5'UTR del gen ER α fue alterada de forma dosis-dependiente. En comparación con las hembras control y al igual que las hembras tratadas con DES, la dosis alta de BPA (BPA20) disminuyó

significativamente el contenido de los transcritos ER α -OT y ER α -O ($P<0,01$; Fig.17A, B) y aumentó la expresión de transcritos ER α -E1 ($P<0,05$; Fig.17C).

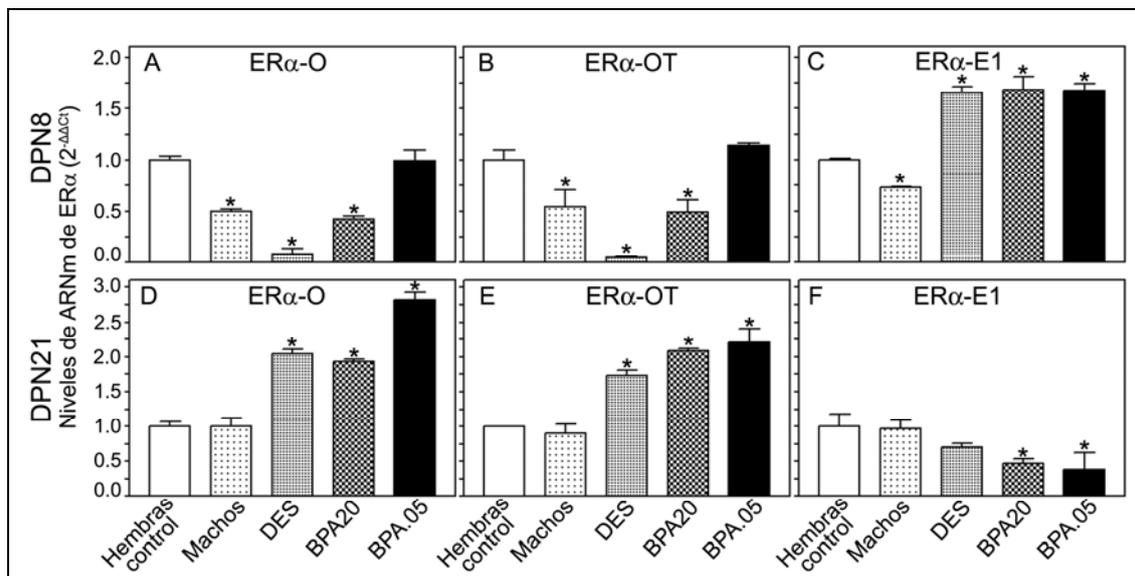


Figura 17 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la abundancia relativa de los transcritos provenientes de los distintos exones 5'UTR del gen de ER α en el área preóptica de ratas de DPN8 (A-C) y DPN21 (D-F). Los niveles relativos de expresión del ARNm de los promotores ER α -O (A, D), ER α -OT (B, E) y ER α -E1(C, F) activos en esta edad y tejido, se cuantificaron mediante RT-PCR en tiempo real y los cambios en la expresión respecto de las hembras control se calcularon mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A los controles se les asignó el valor de referencia de 1 y todos los valores se expresaron como la media \pm E.E.M de al menos tres determinaciones independientes (*, $P<0,05$ vs. hembras control).

Por otro lado, en los animales expuestos a la dosis baja de BPA no se observaron cambios en la expresión de transcritos ER α -OT y ER α -O, pero sí se observó un aumento significativo de la expresión de transcritos provenientes del promotor E1 ($P<0,05$; Fig.17A-C).

En las hembras prepuberales de DPN21, observamos un patrón de expresión de las variantes transcripcionales de ER α diferente al observado en DPN8 luego de la exposición a xenoestrógenos. La expresión de transcritos de ER α -OT y ER α -O aumentó en las hembras tratadas con DES ($P<0,01$), BPA20 ($P<0,01$) y BPA.05 ($P<0,005$, Fig.17D, E). Respecto a la expresión de transcritos conteniendo el exón E1, observamos una caída de aproximadamente 2 veces en las hembras BPA20 ($P<0,01$) y BPA.05 ($P<0,05$, Fig.17F) en comparación con las hembras control. Es importante destacar que en esta edad, los machos no presentaron diferencias con las hembras control

en la tasa de expresión de los transcritos conteniendo los distintos exones 5'UTR del gen ER α (Fig.17D-F).

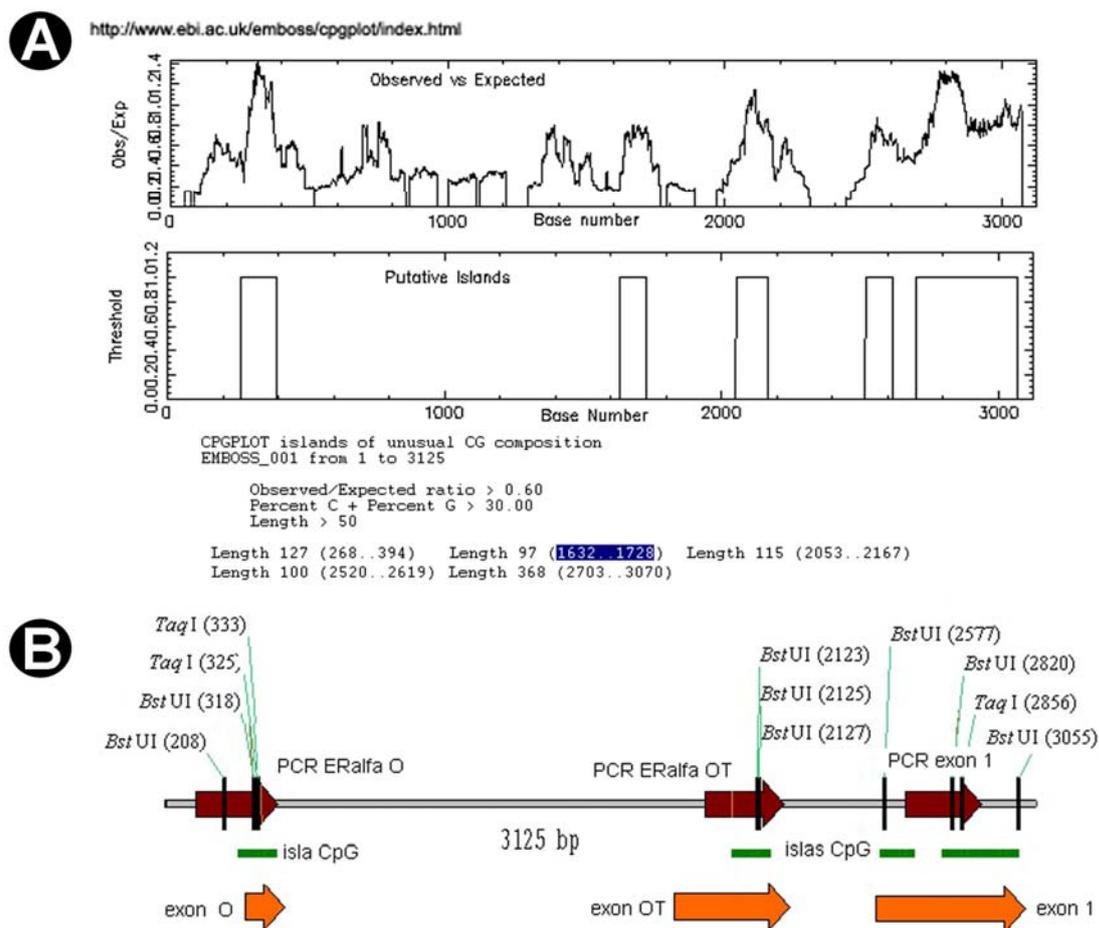


Figura 18 Análisis bioinformático de las islas CpG presentes en la región promotora del gen de ER α . **(A)** Salida del programa informático CpGPlot del European Bioinformatics Institute mostrando la ubicación de islas CpG putativas dentro de la secuencia analizada. **(B)** Salida del programa informático Vector NTI mostrando, en la misma secuencia analizada con el programa CpGPlot, la ubicación de los exones de ER α (**flechas naranjas**), los fragmentos amplificados por PCR (**flechas marrones**), la ubicación de las islas CpG (**líneas verdes**) y los sitios de corte de las enzimas *Bst*UI y *Taq*I. La isla CpG putativa ubicada entre las bases 1632-1728 (**A, remarcado en azul**) no pudo ser estudiada por esta metodología ya que no presenta sitios de corte para las enzimas *Bst*UI y *Taq*I.

4.1.3- Estado de metilación de los promotores transcripcionales de ER α en ratas hembra prepuberales

Una posible explicación a los cambios observados en la expresión de transcritos conteniendo los distintos exones 5'UTR del gen ER α en animales expuestos a DES y BPA es que estos hayan sido causados a través de un mecanismo de metilación diferencial del ADN. Para estudiar esta posibilidad,

utilizamos la técnica de COBRA para chequear el estado de metilación de los promotores de ER α transcripcionalmente activos en el área preóptica de animales prepuberales de DPN21. Se realizó un estudio bioinformático de la región promotora del gen ER α , detectándose islas CpG putativas factibles de ser estudiadas mediante la técnica de COBRA en los promotores O, OT y en el exón 1 (Fig.18). En todos los grupos experimentales, las islas CpG estudiadas en el exón 1 y en el promotor ER α -O no presentaron citosinas metiladas. Por el contrario, el promotor ER α -OT presentó bajos niveles de metilación en la isla CpG evaluada por análisis de restricción con la enzima *Bst*UI. Nuestros resultados sugieren que la metilación del promotor ER α -OT es de naturaleza constitutiva e independiente del tratamiento (Fig.19).

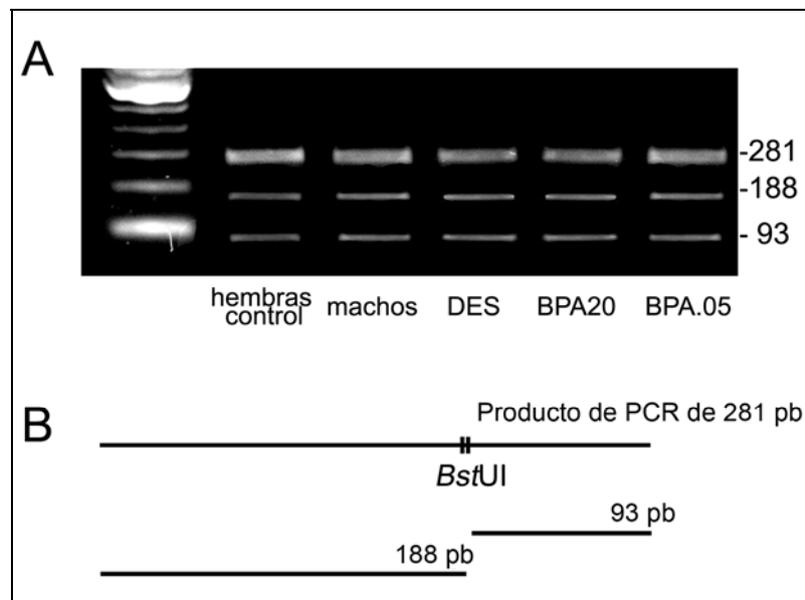


Figura 19 Determinación del estatus de metilación de las islas CpG del promotor ER α -OT. **(A)** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio representativo del ensayo de COBRA realizado con la enzima de restricción *Bst*UI; no se observaron diferencias en los patrones de metilación del promotor ER α -OT entre los grupos experimentales. **(B)** Esquema del producto de PCR y los tamaños esperados de los fragmentos de restricción.

4.1.4- Expresión diferencial de la proteína de ER α en el núcleo AvPv de crías de rata y ratas prepúberes

Para determinar si las alteraciones producidas por la exposición neonatal a xenoestrógenos a nivel de la expresión del ARNm de ER α son extensivas a la síntesis de la proteína de ER α , determinamos los niveles relativos de expresión de la proteína de ER α en neuronas del núcleo AvPv de ratas de DPN8 y

DPN21 (Fig.20A-J). En DPN8, los niveles de proteína de ER α fueron significativamente menores en el AvPv de crías macho, y en crías hembra expuestas a DES y BPA20 ($P<0,005$; Fig.20K) respecto de las hembras control. Por el contrario, en el AvPv de hembras expuestas a la dosis baja de BPA observamos un claro aumento en la expresión de la proteína de ER α ($P<0,001$; Fig.20K).

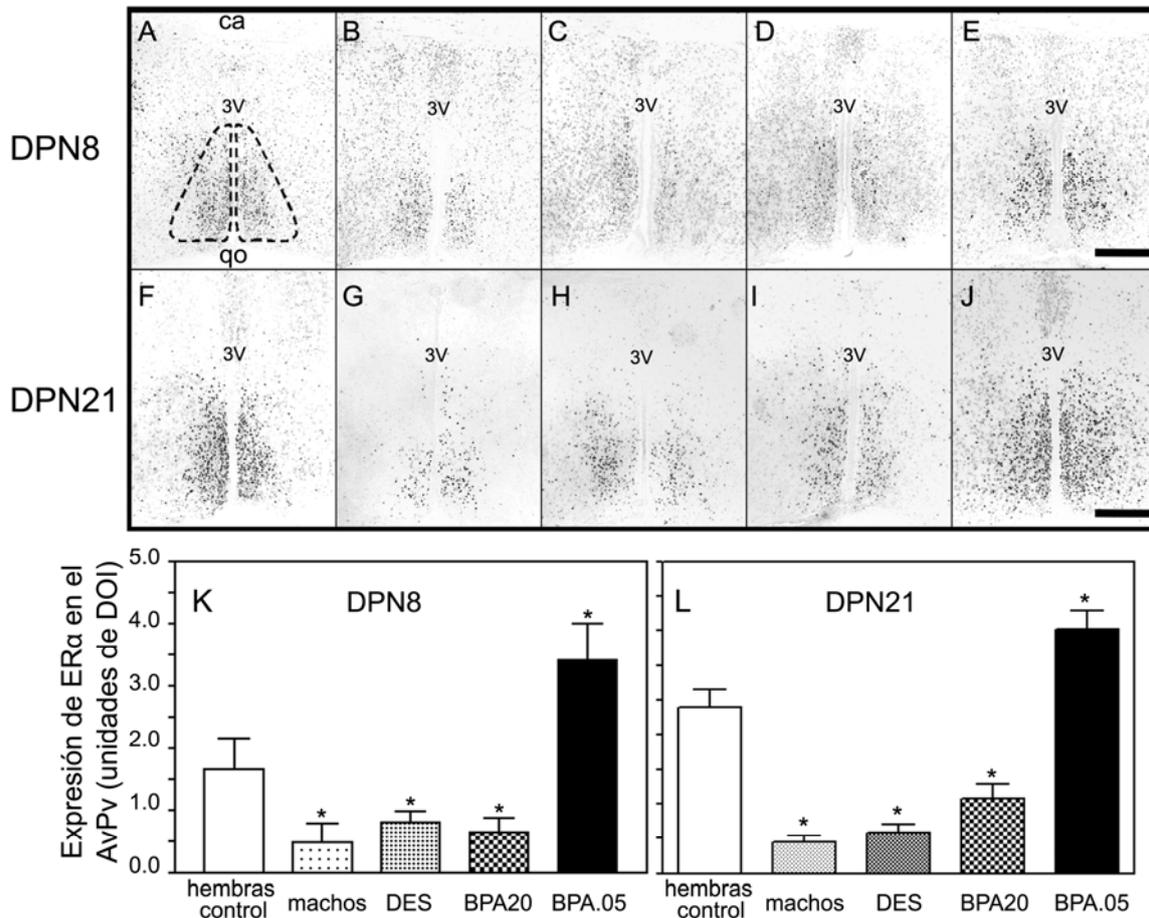


Figura 20 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la traducción del gen de ER α en el núcleo AvPv del área preóptica. **(A-J)** Fotomicrografías representativas de la detección mediante inmunohistoquímica del ER α en el AvPv de animales de DPN8 **(A-E)** y DPN21 **(F-J)**. El núcleo AvPv se demarcó de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson **(A, línea de puntos)** (Paxinos y Watson, 2005). Barra de escala, 200 μ m; 3V, tercer ventrículo; ca, comisura anterior; qo, quiasma óptico. **(K,L)** Cuantificación de los resultados obtenidos por inmunohistoquímica en el AvPv de animales DPN8 **(K)** y DPN21 **(L)**. Los datos se expresan como densidad óptica integrada (DOI), la cual se mide como una combinación lineal entre la intensidad promedio de la inmunotinción y el área relativa del AvPv ocupada por las células positivas. Cada columna representa la media \pm E.E.M. de al menos seis secciones seriadas por animal de cuatro (DPN8) o cinco (DPN21) animales por grupo (*, $P<0,05$ vs. hembras control).

Dos semanas luego de concluida la exposición a xenoestrógenos, los niveles de expresión de ER α en crías macho, hembras DES y BPA20 se mantuvieron significativamente reducidos ($P < 0,001$; Fig.20L) en comparación a las hembras control; mientras que en hembras BPA.05 los niveles de ER α se mantuvieron mayores respecto de las hembras control ($P < 0,05$; Fig.20L).

4.1.5- Niveles séricos de 17 β -estradiol en hembras prepuberales

No se observaron diferencias en los niveles séricos de 17 β -estradiol entre ratas prepuberales de DPN21 de los distintos grupos experimentales (Fig.21). Es importante destacar que los niveles séricos de 17 β -estradiol de hembras control y machos fueron similares en esta edad.

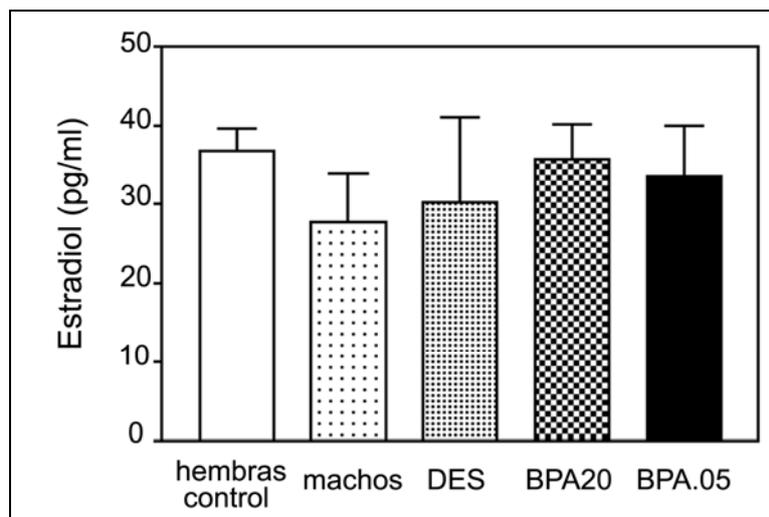


Figura 21 Niveles de estradiol sérico en animales prepuberales. La sangre troncal de animales de DPN21 fue recogida y se analizaron los niveles de 17 β -estradiol. Cada columna representa la media \pm E.E.M. de cinco muestras de suero por grupo experimental.

4.2- Desarrollo de un anticuerpo policlonal específico para la detección del represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA)

4.2.1- Diseño y obtención de un polipéptido específico

Mediante el estudio bioinformático de la secuencia nucleotídica reportada para REA detectamos una región de alta antigenicidad teórica ubicada en el extremo 3' de la secuencia nucleotídica (Fig.22A, B). El fragmento de la secuencia de

REA seleccionado fue traducido y comparado *in silico* con el resto del genoma de la rata utilizando la herramienta BLAST protein-protein del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, EEUU), sin observarse alineamientos significativos con otras proteínas de rata distintas a la reportada para REA.

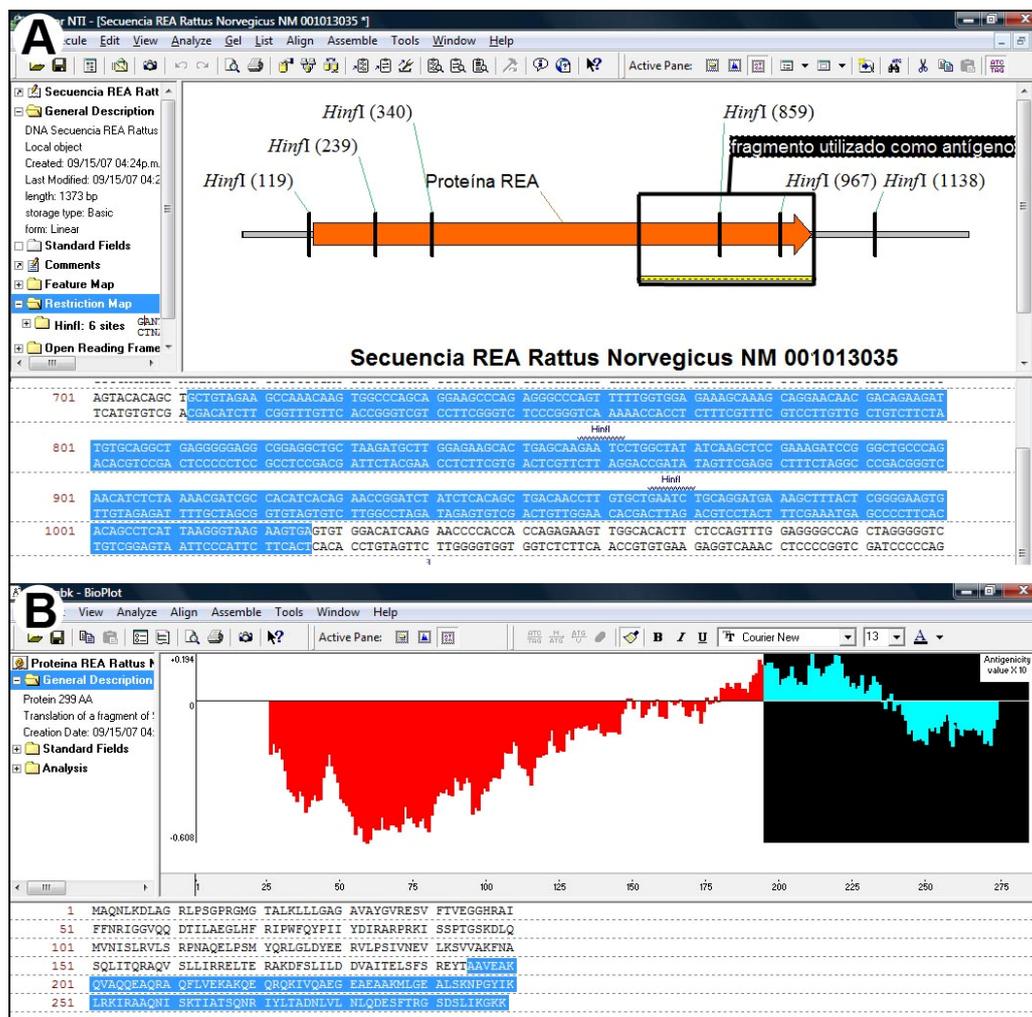


Figura 22 Selección de un fragmento de la secuencia del gen de REA para ser utilizado como antígeno en la producción de un anticuerpo policlonal específico. **A)** Salida del programa informático Vector NTI mostrando la secuencia utilizada como antígeno y la ubicación de sitios específicos para la enzima de restricción *Hin*fI utilizada para corroborar la identidad del fragmento. **B)** Análisis de la antigenicidad teórica de la proteína de REA. En negro y azul se muestra la antigenicidad correspondiente al polipéptido codificado por el fragmento seleccionado.

El fragmento seleccionado de la secuencia de REA fue amplificado mediante PCR y la identidad del mismo fue positivamente confirmada mediante cortes con la enzima de restricción *Hin*fI (ver Fig.22A). Siguiendo la estrategia de clonado direccional mencionada en la sección 3.4.1 se obtuvo el plásmido

recombinante pGEX-REA, el cual fue expresado en bacterias *E.coli* JM109 y la proteína de fusión GST-REA resultante fue purificada mediante columnas cromatográficas GSTrap™. Las fracciones obtenidas durante la elución de la proteína GST-REA se separaron mediante SDS-PAGE y el gel fue teñido con Coomasie Blue (Fig.23).

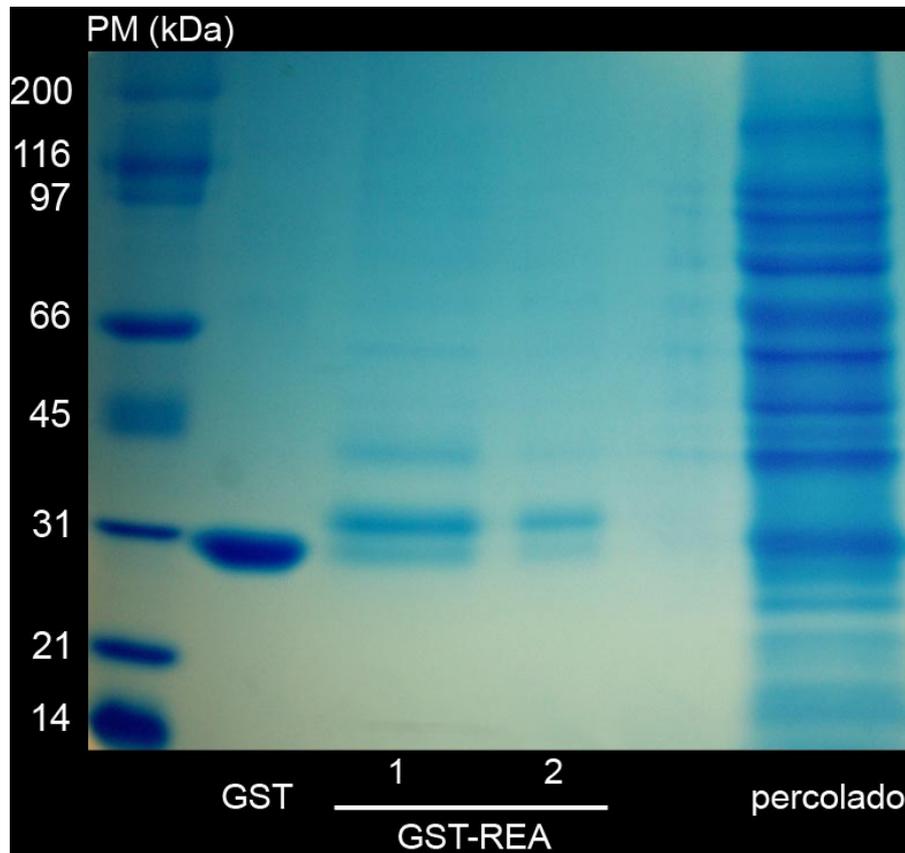


Figura 23 Purificación del antígeno GST-REA mediante cromatografía de afinidad. Gel de poliacrilamida teñido con Coomasie Blue de las 2 primeras fracciones de una cromatografía realizada con GSTrap. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular, GST purificada, GST-REA purificada fracciones 1 y 2, percolado.

Observamos que la mayor proporción de proteína purificada estuvo contenida en la fracción 1 y fue compuesta por 3 proteínas mayoritarias. De acuerdo al peso molecular de las mismas, la banda de menor peso correspondería a GST, la de mayor peso a GST-REA y la banda de peso intermedio podría deberse a una liberación prematura del complejo de traducción del plásmido, resultando en una proteína de peso intermedio conteniendo el extremo amino terminal de alta antigenicidad del fragmento de REA seleccionado.

4.2.2- Generación y caracterización del anticuerpo policlonal anti-REA

Dos conejos fueron inoculados con el antígeno GST-REA siguiendo el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*. El suero se purificó por doble cromatografía de afinidad, en primera instancia a través de una matriz de proteína A, donde se obtuvo la población de IgG totales, y luego por una matriz con GST-REA purificada y ligada a la misma, colectando así la subpoblación de IgG específicas para el antígeno GST-REA.

La caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos de ambos conejos se realizó mediante técnicas de western blot, inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia. En los ensayos de western blot se utilizó hígado (Kurtev y *col.*, 2004) y glándula mamaria de rata (Mussi y *col.*, 2006) como controles positivos. El anticuerpo obtenido del conejo 1 presentó marcación inespecífica en ambos tejidos, detectando conjuntamente con REA otra proteína de menor peso molecular (Fig.24). Por el contrario, el anticuerpo obtenido del conejo 2 se desempeñó exitosamente en el western blot, detectando específicamente la proteína REA (37 kDa) en ambos tejidos evaluados (Fig.24).

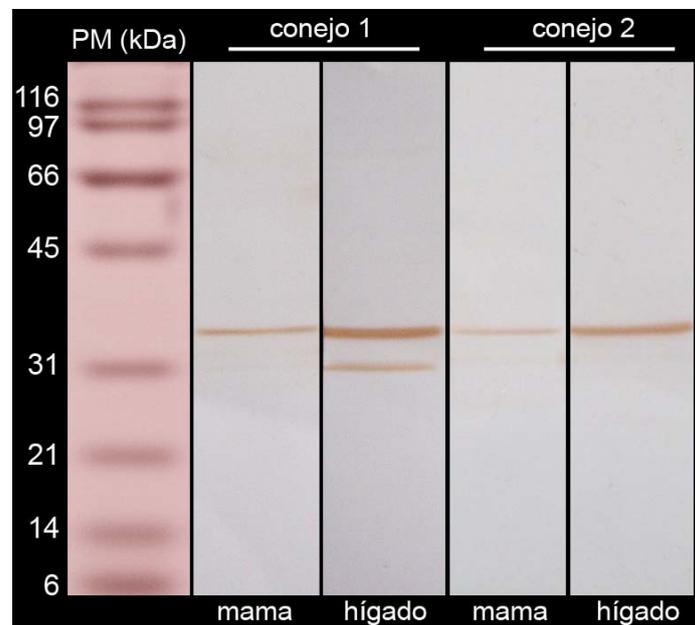


Figura 24 Western blot para los anticuerpos anti-REA obtenidos y purificados de los conejos 1 y 2. El anticuerpo obtenido del conejo 1 presentó marcación inespecífica para REA detectando conjuntamente otra proteína de menor peso molecular tanto en glándula mamaria (marcación débil) como en hígado (marcación fuerte). Por el contrario, el anticuerpo obtenido del conejo 2 se desempeñó exitosamente en el western blot, detectando específicamente la proteína REA (37 kDa). Los marcadores de peso molecular se tiñeron con Rojo Ponceau después de la transferencia y luego se recortaron de la membrana.

De acuerdo a lo observado en estos ensayos el anticuerpo policlonal obtenido del conejo 1 fue descartado. El resto de las pruebas de caracterización se realizaron solamente con el anticuerpo obtenido del conejo 2. En tejido hipotalámico la detección de la proteína REA se realizó mediante inmunohistoquímica. Como se muestra en la Fig.25 (panel izquierdo), la marcación de REA fue mayormente observada en el citoplasma de las células hipotalámicas. No se detectó marcación específica cuando el anticuerpo anti-REA fue preincubado con el péptido utilizado como inmunógeno (Fig.25, panel derecho).

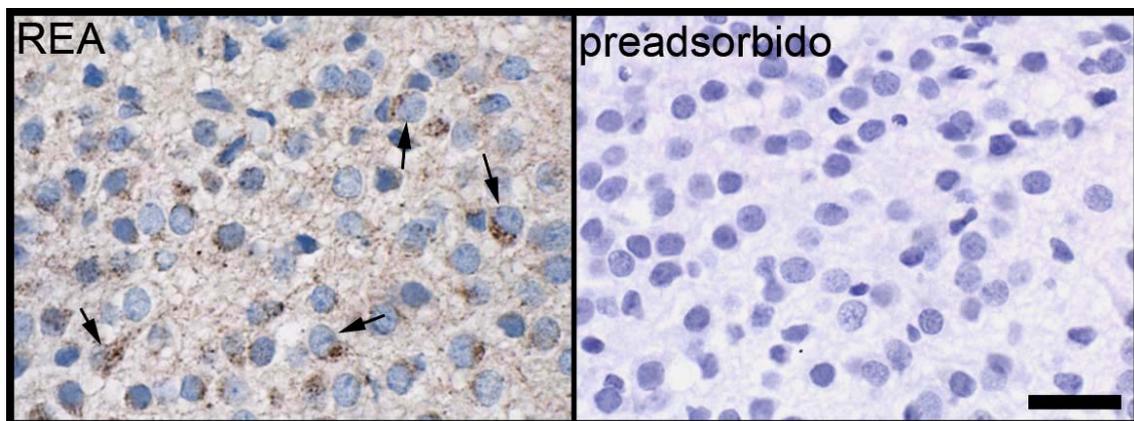


Figura 25 Análisis mediante inmunohistoquímica del anticuerpo anti-REA obtenido del conejo 2. En tejido hipotalámico la marcación específica de REA fue observada en el citoplasma de las células positivas (**panel izquierdo, flechas negras**). Cuando el anticuerpo primario fue preadsorbido con el antígeno usado como inmunógeno para REA la marcación específica no fue observada (**panel derecho**). Barra de escala, 25 μ m.

Para evaluar si la proteína de REA se expresa en neuronas hipotalámicas maduras, se realizó un ensayo de doble inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal obtenido del conejo 2 junto con la proteína nuclear específica de neuronas de vertebrados, NeuN. Nuestros resultados revelan que en el hipotálamo de hembras adultas, la expresión de REA está restringida al citoplasma de neuronas maduras (Fig.26). Una vez realizada la caracterización del anticuerpo anti-REA, el mismo se utilizó en este trabajo de tesis para evaluar los efectos de los perturbadores endocrinos estudiados sobre la expresión del cofactor REA (ver más adelante, *pags.80 a 85*)