

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Desarrollo de métodos para evaluar vitelogenina

3.1.1 Animales

Para la obtención de Vtg con el objetivo de ser empleada como antígeno, se utilizaron cuatro hembras sexualmente inmaduras que fueron provistas por el Proyecto Yacaré de Santa Fe (<http://www.mupcn.com.ar/yacare>). Se criaron en invernáculos de cría que cuentan con temperatura controlada de aproximadamente 30°C, dentro de piletas con zonas secas e inundadas de forma tal que los animales puedan optar en función de sus necesidades de regulación de la temperatura corporal. La alimentación fue balanceada y *ad libitum* durante todo el período de experimentación.

Las hembras *Caiman latirostris* (yacaré overo) utilizadas fueron de 1 año de edad con un promedio de peso corporal de 2,03±0,31 kg. El sexo de los animales fue determinado por evaluación de los genitales externos como previamente se ha descrito en nuestro laboratorio (Stoker y col., 2003).

3.1.2 Protocolo de inducción de Vtg en hembras sexualmente inmaduras.

Las hembras fueron tratadas por 7 días consecutivos con inyecciones subcutáneas diarias de 1 mg/kg de peso corporal de 17β-estradiol (E2, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Los animales controles recibieron aceite de sésamo (n=4). La solución a inyectar se preparó disolviendo E2 en etanol absoluto (Cicarelli, Argentina) y luego diluyendo esta solución en aceite de sésamo (etanol-aceite de sésamo 1:9). Se tomaron muestras de sangre inmediatamente antes del tratamiento (para determinar el nivel basal de Vtg) y 7 días posteriores a la última inyección se realizó la recolección final (figura 9).

Grupo experimental	Días de tratamiento													
7 dosis E2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Se destacan días 1, 7 y 14 que son días de toma de muestra

Referencias:

- Inyección con vehículo (aceite de sésamo)
- Inyección con E2
- Sacrificio del animal

Figura 9: Esquema de tratamiento realizado para obtener Vtg en las hembras juveniles.

3.1.2.1 Obtención de plasma.

Se obtuvieron muestras de sangre por extracción del seno occipital, recogiendo en tubos con heparina (Rivero, Buenos Aires, Argentina) e inhibidores de proteasas: aprotinina (Sigma), 0,0175 unidades inhibitoras de tripsina (UIT)/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0,5 mM (figura 10). Posteriormente, se centrifugó para separar el plasma que se almacenó a -80°C hasta su utilización.



Figura 10: Toma de muestra de sangre del seno occipital de un yacaré juvenil

3.1.3 Identificación de Vtg.

Se identificó la Vtg en muestras de plasma siguiendo tres metodologías:

- Separación de las proteínas plasmáticas de yacaré por electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes, tiñendo los geles con Coomassie Brilliant Blue (Sigma).
- Reconocimiento de proteínas fosforiladas separadas por electroforesis en geles, por medio del colorante Stains All (Sigma) (Green y col., 1973).
- Evaluación de reacción cruzada del anticuerpo policlonal nº 498 provisto por Dr. KW Selcer (Departamento de Ciencias Biológicas, Duquesne, Universidad de Pittsburgh, PA, USA). Este anticuerpo fue desarrollado contra una porción altamente conservada de Vtg de *Xenopus laevis* (Selcer y col., 2001).

Al momento del análisis se tomó en consideración el peso molecular de la Vtg de otras especies.

3.1.3.1 Electroforesis nativa y desnaturizante.

La separación de las proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), se realizó preparando geles discontinuos de concentración variable de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) entre 5 y 12% en el gel de resolución. Se sembraron cantidades conocidas de proteína por calle, junto con un patrón de peso molecular de amplio espectro (Bio-Rad). Una vez realizada la corrida, los geles fueron teñidos o utilizados para realizar western blot.

Para la realización de electroforesis en condiciones nativas se procedió del mismo modo, descrito previamente omitiendo el uso de agentes desnaturizantes en la preparación de los geles, las muestras y el buffer de corrida.

La tinción con el colorante aminotriarilmetano, Coomassie brilliant blue, forma fuertes complejos no covalentes con las proteínas, muy probablemente por combinación de fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas con los grupos amino (Simpson, 2003). Esta tinción se realizó para evidenciar las proteínas separadas por electroforesis, poniendo en contacto el gel con el colorante durante una hora en agitación y posteriormente decolorando el gel con soluciones de metanol - ácido acético.

La tinción con Stains All, evidencia proteínas fosforiladas, para lo cual se lavó el gel con isopropanol 25% (2 veces) durante 15 minutos (min) a 50°C (en agitación). Luego el gel se incubó toda la noche en colorante y al día siguiente se decoloró con agua destilada (en oscuridad).

En todas las electroforesis se sembraron muestras de plasma de yacaré provenientes de animales controles y tratados con E2. El peso molecular de la Vtg de yacaré se calculó como el promedio del peso obtenido a partir de la realización de 3 geles.

3.1.3.2 Determinación de proteínas totales

Se determinó el contenido proteico en las muestras obtenidas utilizando la técnica de Bradford. Para ello, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) para preparar la curva de calibrado en un volumen final de 300 μ l, y las muestras se prepararon diluyéndolas adecuadamente y llevándolas a el mismo volumen final. Luego, se agregó 3 ml de reactivo, dejando actuar 5 min. Las lecturas de

las absorbancias se realizaron a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, USA). Las concentraciones de las muestras se obtienen por interpolación en la curva de calibrado y teniendo en cuenta la dilución que se les aplicó a las muestras.

3.1.4 Purificación de Vtg.

La purificación de Vtg se realizó en dos pasos, una precipitación salina, seguida por una cromatografía, a partir de plasma obtenido de hembras tratadas con E2.

3.1.4.1 Precipitación salina.

Previo a la realización de la precipitación, se adicionó a las muestras de plasma los inhibidores de proteasas, aprotinina y PMSF. Todas las soluciones utilizadas se mantuvieron en baño de hielo. La metodología seguida fue previamente descrita por otros autores (Wiley y col., 1979), pero se realizaron modificaciones. Se homogeneizaron alícuotas de 500 μ l de plasma de hembras tratadas con E2, con 2 ml de EDTA- Na_2 20 mM (pH 7,7) y 160 μ l de MgCl_2 0,5 M. Se centrifugó a 2500 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se descartó y el precipitado conteniendo Vtg, fue disuelto con 200 μ l de un buffer compuesto por Tris-HCl 50 mM y NaCl 1 M (pH 7,5). Luego se centrifugó a 2500 g durante 30 min a 4°C, para separar posibles impurezas. El sobrenadante que contenía Vtg disuelta nuevamente se sometió a precipitación por disminución de la fuerza iónica, con 2,5 ml de agua destilada. Se centrifugó por 15 min a 4°C y se separó por un lado el sobrenadante y por el otro el precipitado, el cual se disolvió con buffer Tris-HCl 50 mM conteniendo NaCl 100 mM (pH 7,5). Esta última fracción se centrifugó a 18400 g por 10 min a 4°C, de esta forma se descartó una fracción lipídica formada en la superficie de la solución. La solución resultante, libre de lípidos, se homogeneizó con el sobrenadante obtenido previamente para continuar con el siguiente paso de purificación. En todas las instancias se verificó la presencia de Vtg por PAGE-SDS.

3.1.4.2 Cromatografía de intercambio iónico.

Se utilizó una columna de intercambio iónico con cargas fuertemente negativas, de 5 ml de lecho, provista comercialmente (Hi-Trap Q Sepharose XL, Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) y se conectó a una bomba peristáltica (Gilson Inc., Villiers le Bel, Francia).

La muestra obtenida por precipitación se diluyó con buffer Tris-HCl 25 mM, (pH 9) se agregó PMSF y se sembró en la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La columna fue eluída con 50 ml de un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en buffer Tris-HCl 25 mM (pH 9), a una velocidad de flujo de 3 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml y se registró la absorbancia de cada una de ellas a 280 nm en espectrofotómetro (Beckman). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por PAGE-SDS y los geles se tiñeron con el colorante Coomassie brilliant blue y con una solución de nitrato de plata.

3.1.5 Generación del anticuerpo anti-Vtg.

Se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Diano y Le Bivic (1996) con mínimas modificaciones. La Vtg purificada por cromatografía de intercambio iónico se separó por PAGE nativo y se transfirió a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro (Schleicher and Schuell Bioscience Inc., Keene, NH, USA). Se identificó la Vtg transferida por coloración con Rojo Ponceau y se cortó la membrana en pequeños trozos dentro de un tubo eppendorf conteniendo buffer fosfato (PBS 0,05M, pH 7,5), para luego someterla a sonicación en baño de hielo (High Intensity Ultrasonic Processor, Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA).

Se inmunizaron 2 conejos con aproximadamente 100 μ g de Vtg siguiendo el protocolo de Vaitukaitis y col. (1971). Dos semanas más tarde, los conejos fueron inoculados con otros 100 μ g de Vtg y se les extrajo una muestra de sangre de la vena auricular. Los 3 estímulos y tomas de muestra subsiguientes, se realizaron una vez por mes hasta obtener un título constante, comprobado con 2 muestras de suero de conejo obtenidas a diferentes tiempos. La titulación se efectuó mediante técnicas de dot blot y western blot, utilizando como antígeno, Vtg purificada y muestras de plasma de hembras tratadas con E2 y con vehículo. Los sueros de conejo cuyo título superaba 1/8000 se almacenaron a -20°C.

La purificación del suero de conejo obtenido se realizó mediante dos técnicas de cromatografía de afinidad. En una primera instancia se purificó 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). La proteína A es un polipéptido constituyente de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, cuya masa molecular es de 42 kDa. Presenta 4 sitios de potenciales de interacción específica con los anticuerpos, pero sólo 2 pueden utilizarse al mismo tiempo. Los sitios de unión en la molécula de anticuerpo se encuentran en el segundo y tercer dominio de la región constante de la cadena pesada (Harlow y Lane, 1988). Esto significa que existen al menos 2 sitios de unión en cualquier molécula de anticuerpo para la proteína A, lo que provee un excelente arreglo para la formación de complejos multiméricos. La proteína A posee características que la convierten en una opción muy útil para la purificación de inmunoglobulinas, entre ellas: (1) la interacción de los anticuerpos con la proteína A no modifica la capacidad de interaccionar con el antígeno, debido a que el sitio de unión se encuentra en la región constante de los anticuerpos, (2) la proteína A es muy resistente a condiciones desnaturizantes, y (3) a pesar que posee alta afinidad por la unión del anticuerpo, la interacción entre antígeno y anticuerpo puede romperse condiciones de pH extremas (Harlow y Lane, 1988).

Luego, a partir de la fracción de IgG totales aislada se realizó una segunda cromatografía de afinidad, utilizando una columna cuya matriz se componía de agarosa con radicales N-hidroxisuccinimida (NHS) activados (Hi-Trap NHS activated HP, Amersham). Este tipo de cromatografía de inmuoafinidad, es el único método comúnmente utilizado para purificar anticuerpos específicos de antígenos a partir de una preparación de anticuerpos policlonales. Brevemente, 5 mg de Vtg se dializaron contra una solución de NaHCO₃ 200 mM y NaCl 500 mM, (pH 8,3) y se concentró en un volumen de 1 ml. La solución de Vtg se adicionó a la columna de 1 ml de lecho activado y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se desactivaron los grupos remanentes activos y la columna se lavó con PBS (pH 7,5), luego con buffer 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 glicina 100 mM (pH 3) 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 las fracciones conteniendo el anticuerpo anti-Vtg doblemente purificado, se homogeneizaron y se utilizaron para los inmunoensayos. El anticuerpo resultante se llamó LETHW 03-07.

3.1.6 Western blot para la detección de Vtg.

A los fines de caracterizar el anticuerpo anti-Vtg de yacaré, las proteínas plasmáticas de animales controles y tratados con E2, así como la Vtg purificada, se separaron por electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes, y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5% en Tris buffer salino-Tween (TBST; Tris 25 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7,4) durante toda la noche a 4°C para prevenir uniones inespecíficas. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con TBST (NaCl 0,5 M) y se incubó 1:30 horas (h) con el anticuerpo anti-Vtg LETHW 03-07, diluido 1/1000 o 1/1600 en TBST con leche descremada 2% a 25°C en un agitador orbital. Luego, la membrana se lavó nuevamente con TBST (NaCl 0,5 M) y se incubó con anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo generado en cabra marcado con peroxidasa (Amersham), diluido 1/2500 en TBST-leche descremada 2%. La membrana se lavó nuevamente 3 veces con TBST (NaCl 0,5 M) y la reacción se visualizó utilizando diaminobencidina 0,5 mg/ml (DAB; Sigma) como sustrato de la enzima ligada al anticuerpo secundario. Asimismo, este protocolo fue seguido utilizando el anticuerpo primario anti-Vtg N°498, provisto por el Dr. Selcer, diluido 1/100 en TBST- leche descremada 2%.

3.1.7 Actividad cruzada del anticuerpo LETHW 03-07

3.1.7.1 Animales

Para la evaluación del reconocimiento de Vtg en otras especies, se utilizaron tortugas juveniles de las especies *Trachemys scripta dorbignyi* (peso corporal promedio: 0,35 \pm 0,05 kg), *Phrynops hilarii* (peso corporal promedio: 0,84 \pm 0,11 kg) (figura 11). El sexo se determinó por evaluación histológica de los genitales internos.

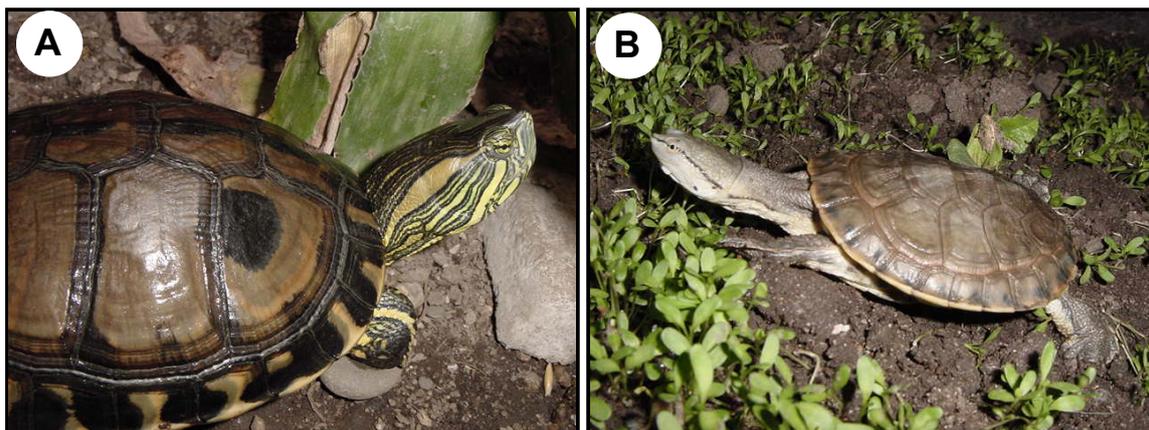


Figura 11: Especies de tortugas utilizadas para la evaluación de la reacción cruzada del anticuerpo. **A:** *Trachemys scripta dorbignyi*. **B:** *Phrynops hilarii*

3.1.7.2 Evaluación de la reacción cruzada

Se obtuvieron muestras de plasma de tortugas *T. scripta dorbignyi* y *P. hilarii* que fueron tratadas previamente con E2 siguiendo el protocolo de Palmer y Palmer (1995). Para ello, se administraron 2 inyecciones subcutáneas de 1 mg/kg de peso corporal espaciadas por 7 días. Pasados 7 días de la última inyección, se obtuvieron las muestras de sangre recogidas en tubos heparinizados que fueron centrifugadas para separar el plasma.

Las proteínas plasmáticas se separaron por PAGE-SDS y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. La reactividad del anticuerpo LETHW 03-07 fue evaluada por western blot.

3.1.8 Dot blot para monitoreo de Vtg.

Este ensayo se optimizó como un método de monitoreo de Vtg. Para ello, se agregó de 0,3 a 80 ng de Vtg a una cantidad constante de plasma de yacaré macho y se sembró directamente en una membrana de nitrocelulosa. Del mismo modo se sembraron las muestras incógnitas. La inmunodetección de la Vtg se realizó siguiendo el protocolo descrito para western blot. El anticuerpo primario anti-Vtg LETHW 03-07 fue evaluado en diluciones crecientes desde 1/500 a 1/8000 y el anticuerpo secundario (Amersham) se utilizó en una dilución 1/2500. De esta manera, no sólo fue posible determinar la presencia de Vtg, sino también estimar su contenido aproximado en las muestras incógnitas.

3.1.9 Obtención y procesamiento de muestras de tejido.

Cada animal sacrificado se colocó con el abdomen hacia arriba sobre una mesa de cirugía y se fijó por sus cuatro miembros. Se levantó el cuero con pinza de punta “diente de ratón” a 0,5 cm del orificio de la cloaca y con tijera de punta roma se realizó una incisión en un ángulo de 45° hacia los laterales hasta la altura de las últimas costillas, exponiendo la cavidad abdominal. De cada animal se disecó una porción de hígado de 1 cm aproximadamente, el cual se sumergió en una solución de formol al 4% tamponada a pH 7,5 con PBS durante 6 h a temperatura ambiente, respetando la proporción recomendada de fijador/muestra (20:1) para permitir una adecuada conservación morfológica del tejido. Luego se realizaron dos lavados de 10 min cada uno y se mantuvieron en solución de etanol al 70%. El procedimiento utilizado para la inclusión de las muestras en tacos de parafina fue el descrito por Junqueira (1983), en el que las mismas son deshidratadas en soluciones de etanol de graduación creciente, clarificadas en sucesivos pasajes por xilol e incluidas en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 5 μ m de espesor en micrótopo que se montaron en portaobjetos previamente tratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 h.

3.1.10 Inmunohistoquímica para detección de Vtg *in situ*.

El anticuerpo anti-Vtg LETHW 03-07 fue evaluado en un ensayo de inmunohistoquímica utilizando muestras de hígado de yacarés controles y tratados con E2. Estas muestras fueron obtenidas y procesadas mediante técnicas histológicas básicas, tal como se describe previamente.

Se montaron en portaobjetos cortes de 5 μ m de espesor obtenidos a partir de tacos de parafina, y se realizó una técnica de inmunohistoquímica estándar optimizada en nuestro laboratorio. En la misma utilizamos un tratamiento con horno microondas como método de recuperación antigénica (Muñoz-de-Toro y col., 1998). Luego se bloquea la actividad endógena de la enzima peroxidasa, utilizando metanol-peróxido de hidrógeno, y los sitios de unión inespecíficos, con suero normal de cabra disuelto en PBS-leche descremada 1,5%. A continuación se detalla la técnica de inmunohistoquímica aplicada (tabla 8).

Tabla 8: Técnica inmunohistoquímica para detectar Vtg

<i>-Desparafinar e hidratar</i>	
Xilol	3 pasajes de 3 min c/u
Alcohol 100°	3 min
PBS	5 min
<i>-Recuperación Antigénica</i>	
Calentamiento en horno microondas en solución de buffer citrato 0,01 M, pH 6	3 min 100%, 14 min 40%, 20 min apagado
PBS	5 min
<i>-Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena</i>	
Agua oxigenada 3% en metanol	15 min
PBS	15 min
<i>-Bloqueo de los sitios de unión no específicos</i>	
Suero normal de cabra 5% adicionado con leche en polvo descremada 1,5%.	30 min (en cámara húmeda)
<i>-Incubación con anticuerpo primario</i>	14-16 h a 4°C (en cámara húmeda)
PBS	15 min
<i>-Sistema de revelado</i>	
Anticuerpo secundario biotinilado	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Estreptavidina-peroxidasa	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Sustrato de la enzima (H ₂ O ₂ 0,001%) + cromógeno (2 mg/ml, DAB) disueltos en 0,05 M Tris-HCl pH 7,5	
Agua destilada	5 min
<i>-Contracoloración</i>	
Hematoxilina de Mayer	1 min
<i>-Deshidratar y Montar</i>	

El anticuerpo primario utilizado en este caso, LETHW 03-07, se diluyó 1/200. El anticuerpo secundario empleado fue un anti-IgG de conejo biotinilado (Zymed, San Francisco, CA, USA) diluido 1/600. El sistema de estreptavidina-peroxidasa (Sigma) se utilizó diluido 1/400.

En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario con suero no inmune. Cuando fue posible, también se incorporaron en cada ensayo de inmunohistoquímica, controles positivos (ej: tejido cuya reacción positiva ya ha sido comprobada previamente).

3.1.11 Desarrollo del enzoinmunoanálisis (ELISA).

Se desarrolló un ELISA competitivo donde se evalúa la capacidad de la Vtg soluble de inhibir la unión del anticuerpo anti-Vtg al antígeno inmovilizado en fase sólida. En todos los casos, las muestras se evaluaron por duplicado en la misma placa. Para el desarrollo de la técnica previamente se optimizaron las condiciones de ensayo.

3.1.11.1 Selección del buffer y la cantidad de antígeno para la sensibilización de placas.

Se evaluaron 2 soluciones para sensibilizar las placas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania): PBS pH 7,5 y buffer carbonato/bicarbonato de sodio 50 mM pH 9,6. En la placa se sembraron diferentes cantidades de Vtg purificada en el rango de 50 a 1000 ng por pocillo, preparadas en buffer de sensibilización. Se bloqueó con 4% leche descremada en PBS para evitar uniones inespecíficas, durante 1:30 h a 37°C y luego de lavar los pocillos con PBS-0,05% Tween 20 (PBST), se incubó con anticuerpo anti-Vtg (1/1000 diluido en buffer ELISA: 4% leche descremada en PBST) durante 1:30 h a 37°C. Se lavaron los pocillos con PBST y se incubó con anticuerpo secundario anti-conejo 1/1500 por 1 h a 37°C. Luego de lavar los pocillos con PBST, la reacción se evidenció utilizando el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB, Zymed). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 12%.

3.1.11.2 Determinación del título de anticuerpo.

Para determinar la dilución óptima de anticuerpo anti-Vtg a utilizar, la placa se sensibilizó con 50, 100 y 200 ng de Vtg purificada (de acuerdo a los resultados obtenidos en el punto anterior, 3.1.11.1). Se prepararon diluciones sucesivas al medio de anticuerpo a partir de 1/500 hasta 1/1024000 y se siguió el protocolo previamente descrito.

3.1.11.3 ELISA competitivo.

Establecidas las condiciones de sensibilización y concentraciones de antígeno y de anticuerpo a utilizar, se optimizaron los tiempos de preincubación de muestra y anticuerpo, y los de competición entre antígeno fijado a la fase sólida, la muestra y el anticuerpo. Asimismo se verificó la dilución adecuada del anticuerpo primario en un ELISA de competición evaluando diluciones en el rango previamente establecido.

Luego, se sensibilizaron placas de 96 pocillos durante toda la noche a 4°C, con 100 µl de una solución estándar de Vtg (200ng/pocillo) preparada en buffer carbonato de sodio (50 mM, pH 9,6). Se preparó una solución 25 µg/ml de Vtg purificada, utilizando para su dilución plasma de yacaré macho (ausencia de Vtg) a partir de la cual se realizaron diluciones sucesivas al medio en buffer ELISA. Luego se adicionó un volumen equivalente al de las diluciones de Vtg, del anticuerpo anti-Vtg 1/500, quedando así finalmente diluido 1/1000 y se incubó toda la noche a 4°C. Del mismo modo, se prepararon las muestras incógnitas. Al día siguiente, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon durante 1:30 h con 4% leche descremada en PBS. Luego, se colocaron 100 µl de las muestras preincubadas con el anticuerpo en los pocillos lavados previamente con PBST, durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron los pocillos y se incubaron durante 1 h a 37°C con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo generado en cabra marcado con peroxidasa (Amersham), en una dilución 1/1500. Finalmente, se lavaron nuevamente los pocillos con PBST y se evidenció la reacción utilizando TMB. La reacción se detuvo utilizando H₂SO₄ al 12%. La absorbancia de los pocillos se registró a 450 nm en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Electro Co., Finland, EU). Los controles negativos se prepararon utilizando plasma de yacarés (libres de Vtg) o buffer ELISA (figura 12).

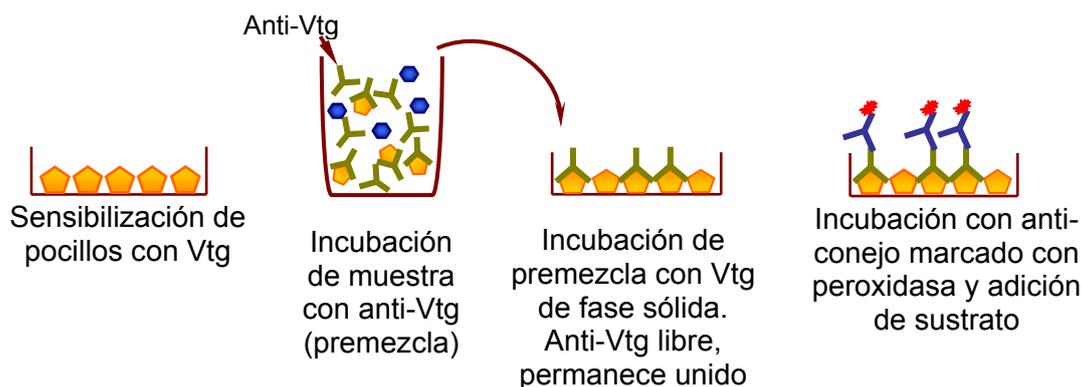


Figura 12: Esquema del ELISA de competición

La curva de calibrado estándar se construyó graficando los valores de la densidad óptica *versus* los logaritmos de las concentraciones de Vtg. El límite de detección se estableció como el valor del título que difiere en 3 desviaciones estándares de los controles negativos, y la sensibilidad del ELISA se calculó como la pendiente de la curva estándar.

3.1.12 Aplicación de las metodologías desarrolladas.

Una vez optimizadas las técnicas para la detección y cuantificación de Vtg evaluamos la inducción y la expresión de Vtg en yacarés y tortugas de agua dulce de ambos sexos, diferentes edades y bajo diferentes situaciones experimentales.

3.1.12.1 Inducción de Vtg en yacarés macho juveniles

3.1.12.1.1 Animales.

Con el fin de determinar la capacidad de los yacarés macho para sintetizar Vtg en respuesta a bajas dosis de E2, se utilizaron animales provistos por el Proyecto Yacaré de Santa Fe que fueron criados y mantenidos según se describe en el punto 3.1.1. Los animales utilizados fueron de 1 año de edad con un promedio de peso corporal de $1,81 \pm 0,16$ kg y fueron sexados por evaluación de los genitales externos (Stoker y col., 2003).

3.1.12.1.2 Protocolo de tratamiento y evaluación.

Se administraron 2 inyecciones de E2 de 1mg/kg de peso corporal, espaciadas por 7 días. La sangre fue colectada **1-** previamente al tratamiento para obtener el valor basal de Vtg, **2-** antes de administrar la segunda inyección

de E2, y 3- 7 días posteriores a la última inyección. La misma fue colocada en tubos heparinizados y con inhibidores de proteasas.

Utilizando las técnicas desarrolladas, la Vtg se determinó a través de monitoreo por dot blot, se evaluó su especificidad por western blot y se cuantificaron los niveles circulantes por ELISA. Además la expresión de Vtg en muestras hepáticas se evidenció a través de inmunohistoquímica.

3.1.12.2 Inducción de Vtg en crías hembra de yacaré overo.

3.1.12.2.1 Animales.

Con el objetivo de conocer la ontogenia de la respuesta de inducción de Vtg utilizamos crías *C. latirostris* de aproximadamente 1 mes de edad provistas por el Proyecto Yacaré de Entre Ríos (Paraná, Entre Ríos). Las crías se mantuvieron en un ambiente calefaccionado, en recipientes de vidrio adaptados con una rampa que les permitió desplazarse tanto sobre zonas secas como húmedas y se alimentaron a base de carne vacuna con bajo tenor graso (figura). El sexo de las crías fue determinado por evaluación histológica de las gónadas (Stoker, 2004).

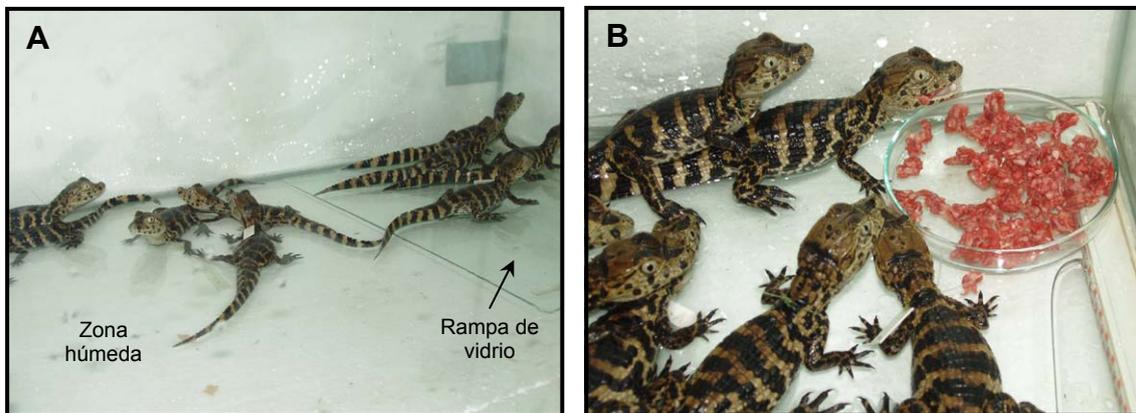


Figura 13: Mantenimiento de crías *C. latirostris* en condiciones de laboratorio. **A:** Recipiente de vidrio adaptado con una zona húmeda y una rampa de vidrio para la zona seca. **B:** Alimentación de las crías

3.1.12.2.2 Protocolo de tratamiento.

Se realizaron 3 protocolos de tratamiento con E2, basados en los resultados previamente obtenidos utilizando yacaré juveniles. Se administraron 1, 2 o 7 inyecciones subcutáneas de E2 según se muestra en el esquema (figura 14) a crías hembra de 26 días de edad ($n=28$), distribuidas en los diferentes grupos de tratamiento.

Grupo experimental	Días de tratamiento													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 dosis E2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 dosis E2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2 dosis E2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
7 dosis E2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

Referencias:

	Inyección con vehículo (aceite de maíz)
	Inyección con E2
	Sacrificio del animal

Figura 14: Esquema del tratamiento recibido por las crías *C. latirostris*. Las crías de 26 días de edad se dividieron en 5 grupos experimentales y al finalizar el tratamiento todos los animales contaron con 40 días de edad.

3.1.12.2.3 Evaluación de la inducción de Vtg.

A los fines de evaluar la capacidad de estas crías para inducir Vtg al momento del sacrificio se recolectó sangre en tubos heparinizados y con inhibidores de proteasas. Se separó el plasma y las muestras obtenidas fueron evaluadas por dot blot, western blot e inmunohistoquímica, y los niveles circulantes de Vtg fueron cuantificados por ELISA.

3.1.12.3 Niveles de Vtg en tortugas silvestres adultas durante la estación reproductiva.

3.1.12.3.1 Animales

Una de las metodologías optimizadas fue aplicada para el reconocimiento de Vtg en tortugas silvestres en época reproductiva. Para ello, se utilizaron tortugas sexualmente maduras de la especie *P. hiliarii* (peso corporal promedio: 2.85 ± 1.25 kg). Las tortugas fueron capturadas en las inmediaciones del río Salado (Santa Fe) en la primavera del año 2004 y se les determinó el sexo por evaluación del plastrón y medidas del plastrón a la cloaca (figura 15). Los machos presentan una distancia mayor del plastrón a la cloaca que las hembras, debido a que allí es donde se aloja el pene (de Solla y col., 1998). Además, el sexo fue confirmado por la forma que adopta el plastrón, los machos presentan un ligero hundimiento que facilitarían la cópula, mientras que el plastrón de las hembras es plano (comunicación personal de la Prof.

Fioramonti perteneciente al Museo de Ciencias Naturales “F. Ameghino”, Santa Fe).

Se tomaron muestras de sangre e inmediatamente después fueron liberadas.

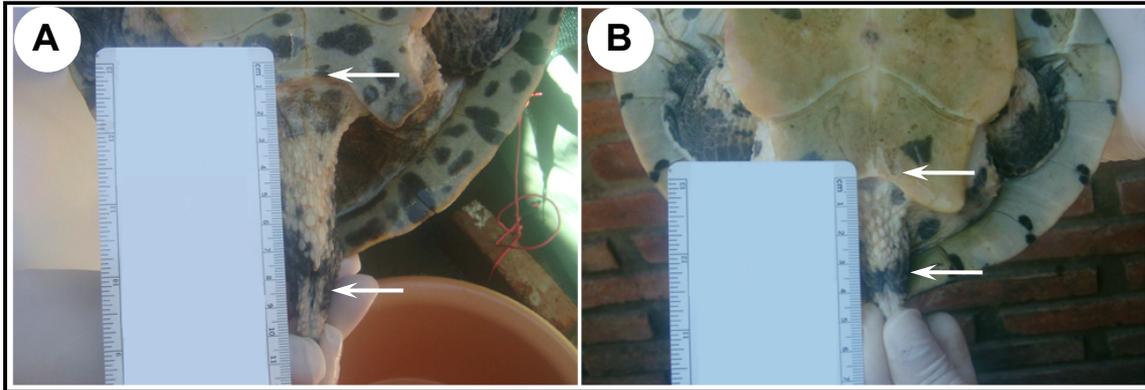


Figura 15: Evaluación del sexo de tortugas *T. scripta* adultas. Medición de la distancia del plastrón (flechas superiores) a la cloaca (flechas inferiores). **A:** Evaluación de un macho, la distancia medida es mayor. **B:** Evaluación de una hembra, distancia menor.

3.1.12.3.2 Evaluación de la reacción

Se obtuvieron las muestras de sangre recogidas en tubos heparinizados que fueron centrifugadas para separar el plasma. Las muestras fueron sometidas a los mismos procedimientos descritos en el punto 3.1.6 para la evaluación de la reactividad por western blot.

3.2 Identificación de órganos blanco de acción de estrógenos en el tracto reproductor femenino.

Con el propósito de determinar posibles alteraciones morfológicas y modificaciones en la proliferación celular debido al tratamiento con E2, se evaluó un órgano blanco de acción estrogénica, el oviducto. Para ello, se utilizaron las crías *C. latirostris* sometidas a los tratamientos previamente descritos en el punto 3.1.12.2.2 y luego del sacrificio, se extrajo el complejo gonadal-adrenal-mesonefros (GAM) al cual se encuentra unido el ducto sexual (oviducto) (figura 16). Se colocó el animal en la tabla de disección y se expuso la cavidad abdominal tal como se describió en el punto 3.1.9. Con pinza anatómica se separó cuidadosamente el vitelo cortando su punto de unión con el intestino permitiendo la visualización del complejo GAM (figura 16). Con tijera

de punta fina se disecó este complejo GAM unido al oviducto que fueron fijados y procesados hasta su inclusión en parafina.

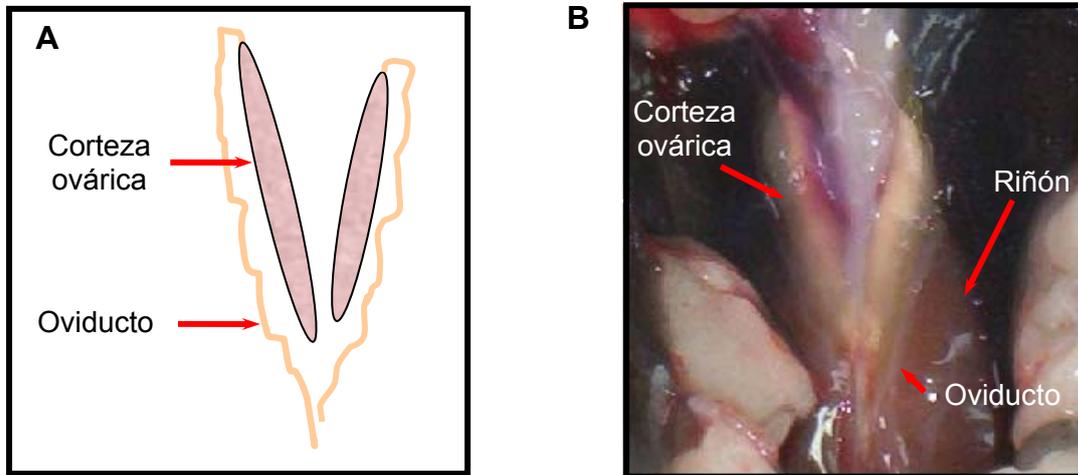


Figura 16: Representación esquemática (A) e imagen macroscópica (B) de los genitales internos de una hembra *C. latirostris* de 10 días de edad. Se distinguen claramente los oviductos y los complejos GAM cuyas regiones caudales descansan sobre los riñones.

3.2.1 Evaluación de la altura del epitelio del oviducto.

La altura del epitelio del oviducto se estudió en cortes histológicos de 5 μm de espesor que fueron coloreados con la solución tricrómica de Picrosirius y contracolorados con hematoxilina (Montes y Junqueira, 1988). La evaluación se realizó sobre imágenes digitalizadas provenientes de al menos 3 profundidades diferentes, cada una de ellas por duplicado, del complejo GAM de cada animal conteniendo oviducto. Los cortes histológicos fueron teñidos con Picrosirius-hematoxilina. Las imágenes fueron tomadas por una cámara color SPOT Insight (Diagnostic Instruments Inc. Sterling Heights, MI, USA) acoplada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japón) (equipado con iluminación halógena de 12V 100W y con fuente de luz estabilizada). El microscopio fue optimizado para iluminación Köehler. Se digitalizaron los campos microscópicos abarcando toda la muestra utilizando objetivo de 40X. La resolución de las imágenes fue de 1600 x 1200 píxeles. Las mediciones espaciales se calibraron con reglas de referencia. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el sistema Image Pro-Plus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Sobre cada imagen se delinearon manualmente los límites basal y apical del epitelio del oviducto en todo el

recorrido comprendido en la imagen (figura 17). La altura del epitelio se calculó automáticamente como el promedio de la longitud de los segmentos perpendiculares a las dos líneas trazadas en cada punto del recorrido.

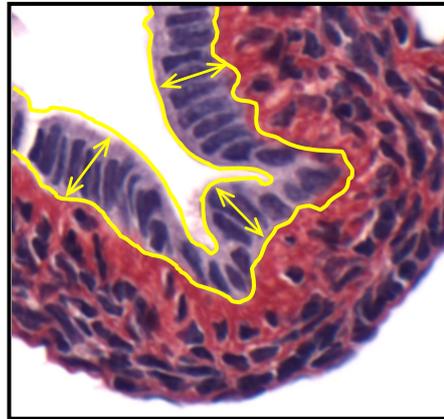


Figura 17: Delimitación de los bordes apical y basal del epitelio del oviducto (líneas amarillas) en una imagen digitalizada de un corte histológico, utilizando el sistema Image Pro-Plus. Las flechas representan la altura tomada en tres puntos del epitelio. Coloración: Picrosirius-Hematoxilina. Magnificación: 400X

3.2.2 Evaluación de la proliferación celular en el oviducto.

La evaluación de la proliferación celular se realizó sobre cortes histológicos de 5 μm de espesor del complejo GAM-oviducto, en los cuales se aplicó una técnica inmunohistoquímica para detectar un antígeno nuclear asociado al ciclo de división celular (PCNA, antígeno nuclear de células en proliferación). La técnica aplicada fue la descrita en el punto 3.1.10 utilizando como anticuerpo primario el Clon PC-10 diluido 1:400 (Novocastra Lab. Ltd. Newcastle upon Tine, Reino Unido). Como sistema de revelado se utilizó un anticuerpo secundario, anti-ratón conjugado con biotina (Sigma) en una dilución 1:130 y estreptavidina-peroxidasa diluida 1:150, ambos en PBS con el agregado de BSA al 1%. La cuantificación se realizó en microscopio óptico con objetivo de 100X y se consideraron positivas las células intensamente marcadas.