

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**FACTORES QUE MODULAN LA ACCIÓN NEUROTRÓFICA
DE LOS ESTRÓGENOS EN EL HIPOCAMPO DEL ADULTO
*IN VIVO***

Lic. Guillermo Samuel Moreno-Piovano

Director de Tesis: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Co-Director de Tesis: Dra. Jorgelina Varayoud

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

Santa Fe

2013

A Dios. Si puedo escribir esta nota y dar gracias desde el corazón, es porque Él puso en mi camino a las personas que voy a mencionar:

A mis padres, Samuel y Miriam, por ser mi orgullo y ejemplo. Por luchar día a día para que lograra escalar y conquistar este peldaño más en la vida. Mi eterno agradecimiento.

A mi querido hermano Dany y su esposa Mary, por su apoyo y compañía constantes.

Agradecimientos

Debo agradecer de manera especial y sincera:

Al Dr. Guillermo Ramos y la Dra. Jorgelina Varayoud por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

A los directores del LETH, el Dr. Enrique Luque y la Dra. Mónica Muñoz de Toro, brillantes profesionales, 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, Silvi, Cati, Gaby F., Flor R., Laura, Germán, Guillita, Julián, Ramiro, Marce, Virgi, Mecha, Gaby A., Mile, Vero, Clari, Luci, Cora, Lucas, Horacio, Adri, Maricel, Flor A., Pao, Juanca, Beti, Gaby N., Juan y Nacho.

A mis tíos Guillermo, Viviana, Graciela y Joel, por su estímulo permanente.

A mis abuelos y a toda mi familia, a los que están y a los que se han ido. Por su ejemplo de vida que me estimularon a perseverar en mis metas. ¡Los admiro!

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 mis amigos, quienes con sus acciones y gestos me ayudaron en cada momento. Dios nos pone a cada uno frente a la vida de otros para impactarlos de alguna manera. Ustedes lo lograron.

LISTADO DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

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

Publicaciones en revistas internacionales indexadas en PubMed, MedLine y Web of Science (full papers):

- Varayoud J, Monje L, **Moreno-Piovano G**, Galoppo GH, Luque EH, Muñoz-de-Toro M, Ramos JG. "Sexually dimorphic expression of receptor-alpha in the cerebral cortex of neonatal Caiman latirostris (Crocodylia: Alligatoridae)". Gen. Comp. Endocrinol. 179(2): 205-213, 2012.
- Ramos JG, Varayoud J, Monje L, **Moreno-Piovano G**, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "Diethylstilbestrol alters the population dynamic of neural precursor cells in the neonatal male rat dentate gyrus". Brain Res. Bull. 71(6): 619-627, 2007.

-Resúmenes Publicados en Revistas Científicas de Publicación Periódica

- **Moreno-Piovano G.**, Varayoud J., Rossetti M.F., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. "La disminución de la expresión del receptor de estrógenos alfa (ERa) en el hipocampo asociada al envejecimiento está ligada a procesos epigenéticos de metilación de ADN". *"Medicina"* (Buenos Aires), vol. 71, Supl. III, p.104, 2011.
- **Moreno-Piovano G.**, Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. "Regulación de la expresión del receptor de estrógenos alfa (ERa) en el hipocampo mediada por estradiol". *"Medicina"* (Buenos Aires), vol. 71, Supl. III, p.193, 2011.
- Rossetti M.; Varayoud J.; **Moreno-Piovano G.**; Muñoz-de-Toro M.; Luque E.; Ramos J. "La estimulación sensorial y la actividad física voluntaria modulan la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo". *"Medicina"* (Buenos Aires), vol. 71, Supl. III, p.192, 2011.

- **Moreno-Piovano G.**, Falco G., Dudiuk C., Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E., Ramos J.G. “El 17beta-estradiol activa diferentes promotores del gen de BDNF (brain derived neurotrophic factor) en corteza e hipocampo de ratón”. **“Medicina”** (Buenos Aires), vol. 69, Supl. I, p.207, 2009.
- **Moreno-Piovano G.**, Dudiuk C., Falco G., Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. “Regulación estrogénica de la expresión del receptor de estrógenos alfa (ERa) en el hipocampo”. **“Medicina”** (Buenos Aires), vol. 69, Supl. I, p.64, 2009.
- **Moreno-Piovano G.**, Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. “Regulación estrogénica de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo”. **“Medicina”** (Buenos Aires), vol. 68, Supl. II, p.77, 2008.
- Ramos J.G., Varayoud J., **Moreno-Piovano G.**, Muñoz-de-Toro M., Luque E.H. “Influencia del tiempo de castración sobre la regulación estrogénica de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo del ratón adulto”. **“Medicina”** (Buenos Aires), vol. 67, Supl. III, p.172, 2007.

Presentaciones a congresos

- **Moreno-Piovano G.**, Dudiuk C., Rossetti M.F., Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. “Age-related changes in hippocampal estrogen receptor alpha in female mice”. Libro de resúmenes de la **II Reunión Conjunta de Neurociencias**, Huerta Grande (Prov. de Córdoba). Páginas: 145-146, octubre de 2010.
- **Moreno-Piovano G.**, Rossetti M.F., Dudiuk C., Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. “Immunohistochemical localization of estrogen receptor alpha in the cerebral cortex of the *Caiman latirostris* (Crocodylia: *Alligatoridae*)”. Libro de resúmenes de la **II Reunión Conjunta de Neurociencias**, Huerta Grande (Prov. de Córdoba). Páginas: 145-146, octubre de 2010.
- Rossetti M.F., **Moreno-Piovano G.**, Dudiuk C., Varayoud J., Muñoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G. “Long term continuous environmental enrichment decreases estrogen receptor alpha expression in the female mouse hippocampus”. Libro de

resúmenes de la **II Reunión Conjunta de Neurociencias**, Huerta Grande (Prov. de Córdoba). Página: 150, octubre de 2010. Participación como: AUTOR.

- Dudiuk CB, Falco G, **Moreno-Piovano G**. “La regulación estrogénica de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo y la corteza del ratón involucra diferentes promotores”. Libro de resúmenes del **Décimo Tercer Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y Cuarto Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe**. Trabajo N°: 2.2.4, noviembre de 2009. Participación como: AUTOR.

ÍNDICE GENERAL

<u>Abreviaturas utilizadas</u>	i
<u>Índice de tablas</u>	iii
<u>Índice de figuras</u>	iv
<u>Resumen</u>	vii
<u>Abstract</u>	xvii
<u>1- INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1- <u>NEUROANATOMÍA GENERAL DEL HIPOCAMPO</u>	1
1.1.1- <u>Histoarquitectura del Hipocampo</u>	3
1.1.2- <u>Circuito Trisináptico del Hipocampo</u>	3
1.2- <u>INFLUENCIA DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE EL HIPOCAMPO</u>	5
1.2.1- <u>Estrógenos</u>	6
1.2.2- <u>Receptores de estrógeno</u>	7
1.2.3- <u>Mecanismos de regulación epigenética</u>	17
1.2.4- <u>Influencia de los estrógenos sobre las funciones neuronales</u>	20
1.2.5- <u>Estrógenos y neurogénesis en estructuras hipocampales</u>	22
1.3- <u>NEUROTROFINAS</u>	24
1.3.1- <u>El Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)</u>	25
1.3.2- <u>Estructura del gen del BDNF</u>	26
1.3.3- <u>Regulación epigenética de la expresión de BDNF por metilación del ADN</u>	28
1.4- <u>TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO Y NEUROPROTECCIÓN</u>	29
1.4.1.- <u>El Estudio sobre la Memoria del Programa de Promoción de la Salud de la Mujer (WHIMS)</u>	30
1.4.2- <u>Hipótesis del período crítico</u>	32
1.5- <u>ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LA VÍA ESTROGÉNICA HIPOCAMPAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO DEL RATÓN</u>	34
1.5.1- <u>Niveles de estrógenos durante el envejecimiento y deterioro cognitivo</u> ..	34
1.5.2- <u>Regulación de la expresión del ERα en el hipocampo a través del envejecimiento y sus implicancias</u>	36
1.5.3- <u>Los tratamientos conductuales y su utilidad para revertir los efectos de la edad: la exposición a ambientes enriquecidos</u>	37
<u>2- OBJETIVOS</u>	40
2.1- <u>OBJETIVO GENERAL</u>	40
2.2- <u>OBJETIVOS PARTICULARES</u>	40
<u>3- MATERIALES Y MÉTODOS</u>	42

<u>3.1- REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA EXPRESIÓN DEL ERα EN EL HIPOCAMPO DEL ADULTO</u>	42
.....	42
<u>3.1.1- Animales y modelo experimental</u>	42
<u>3.1.2- Obtención de las muestras</u>	43
<u>3.1.3- Extracción de ARN total, transcripción reversa y análisis de la expresión de ERα, sus promotores transcripcionales y BDNF mediante PCR en tiempo real</u>	45
.....	45
<u>3.1.4- Análisis de la expresión de isoformas de delección del ERα mediante RT-PCR de punto final</u>	47
<u>3.1.5- Detección de la expresión a nivel proteína del ERα, sus coreguladores transcripcionales REA y SMRT y BDNF mediante inmunohistoquímica</u>	48
<u>3.1.6- Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica</u>	49
<u>3.1.7- Cuantificación de la expresión de ERα, REA, SMRT y BDNF en el hipocampo mediante análisis de imágenes</u>	49
<u>3.1.8- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el análisis de histonas acetiladas H3 y H4</u>	50
<u>3.1.9- Niveles séricos de 17β-estradiol</u>	54
<u>3.1.10- Análisis estadístico</u>	55
<u>3.2- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PRIVACIÓN DE ESTRÓGENOS ENDÓGENOS SOBRE LA EFICACIA DE UNA THR BASADA EN E2</u>	55
<u>3.2.1- Animales y modelo experimental</u>	55
<u>3.2.2- Terapia hormonal de reemplazo</u>	56
<u>3.2.3- Obtención de las muestras</u>	57
<u>3.2.4- Transcripción reversa y análisis de la expresión de BDNF y sus promotores transcripcionales mediante PCR en tiempo real</u>	57
<u>3.2.5- Extracción de ADN genómico y modificación mediante bisulfitación</u>	58
<u>3.2.6- Análisis combinado de bisulfitación restricción (COBRA)</u>	59
<u>3.2.7- PCR en tiempo real específica de metilación (MSP)</u>	62
<u>3.2.8- Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica</u>	64
<u>3.2.9- Cuantificación de la expresión hipocámpica de BDNF, SYN y ERα mediante análisis de imágenes</u>	65
<u>3.2.10- Análisis estadístico</u>	65
<u>3.3- INFLUENCIA DE LA EDAD Y LA PRESENCIA DE UN AMBIENTE ENRIQUECIDO DE LARGO PLAZO (9 MESES) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ERα EN EL HIPOCAMPO DEL ADULTO</u>	65
<u>3.3.1- Animales y modelo experimental</u>	65
<u>3.3.2- Exposición a ambiente enriquecido o estándar</u>	66
<u>3.3.3- Obtención de las muestras</u>	67
<u>3.3.4- Transcripción reversa y análisis de la expresión de ERα y sus promotores transcripcionales mediante PCR en tiempo real</u>	67
<u>3.3.5- Expresión de la proteína ERα en el hipocampo de ratones expuestos a ambiente enriquecido o estándar</u>	68
<u>3.3.6- Extracción de ADN genómico y modificación mediante bisulfitación</u>	68
<u>3.3.7- Análisis combinado de bisulfitación-restricción (COBRA)</u>	69
<u>3.3.8- PCR en tiempo real basada en enzimas de restricción sensibles a metilación (MSRE-PCR)</u>	70

3.3.9- Niveles séricos de 17β-estradiol	72
3.3.10- Análisis estadístico.....	73
4- RESULTADOS.....	74
4.1- REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA EXPRESIÓN DEL ERα EN EL HIPOCAMPO DEL ADULTO	74
4.1.1- Efectos del tratamiento con E2 sobre la expresión del ARNm del ERα en el hipocampo del ratón hembra adulto	74
4.1.2- Expresión de variantes de delección del ERα en ratones hembras OVX	76
4.1.3- Efectos del tratamiento con E2 sobre la expresión de la proteína ERα en el hipocampo a las 4 h post-inyección	77
4.1.4- Efectos del tratamiento con E2 sobre la expresión de los cofactores de transcripción SMRT y REA en el hipocampo a las 4 h post-inyección	78
4.1.5- Análisis epigenético del estado de acetilación de las histonas H3 y H4 a las 4 h post-tratamiento con E2	79
4.1.6- Modificaciones en la expresión de genes estrógeno-sensibles a las 4 h post-tratamiento con E2	81
4.1.7- Niveles séricos de 17β-estradiol a las 4 h post-tratamiento	83
4.2- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PRIVACIÓN DE ESTRÓGENOS ENDÓGENOS SOBRE LA EFICACIA DE UNA THR BASADA EN E2	83
4.2.1- El tiempo post-OVX transcurrido antes de la administración de la THR es crítico para la inducción estrogénica de proteínas neurotróficas	83
4.2.2- El tiempo post-OVX transcurrido antes de la administración de la THR afecta los niveles del ARNm de BDNF y sus variantes de splicing alternativo	85
4.2.3- Modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias de BDNF están asociadas a la pérdida de la respuesta estrogénica.....	86
4.3- INFLUENCIA DE LA EDAD Y LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO DE LARGO PLAZO (9 MESES) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ERα EN EL HIPOCAMPO DEL ADULTO	88
4.3.1- El envejecimiento produce una caída del ARNm de ERα que no se revierte con el envejecimiento.....	88
4.3.2- El envejecimiento aumenta los niveles de metilación en la región 5'UTR del exón 1 y en el exón C del ERα y éstos no se modifican por la exposición a un ambiente enriquecido de largo plazo.....	91
4.3.3- El ambiente enriquecido revirtió la caída de ERα a nivel proteína que se produce por el envejecimiento.....	94
4.3.4- Los niveles séricos de E2 permanecieron inalterados en los ratones CF-1 de mediana edad.....	96
5- DISCUSIÓN	97
5.1- REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA EXPRESIÓN DEL ERα EN EL HIPOCAMPO DEL ADULTO	97

<u>5.2- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PRIVACIÓN DE ESTRÓGENOS ENDÓGENOS SOBRE LA EFICACIA DE UNA THR BASADA EN E₂</u>	103
<u>5.3- INFLUENCIA DE LA EDAD Y LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO DE LARGO PLAZO (9 MESES) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ER_α EN EL HIPOCAMPO DEL ADULTO</u>	107
<u>6- CONCLUSIONES</u>	112
<u>7- BIBLIOGRAFÍA</u>	115

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albúmina de suero bovino
CA1	Región CA1 del hipocampo
CA3	Región CA3 del hipocampo
CCG	Capa de células granulares
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
COBRA	Análisis combinado de bisulfitación-restricción
C _t	Ciclo umbral
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
E2	17 β -estradiol
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
ER	Receptor de estrógenos
ER α	Receptor de estrógenos alfa
ER β	Receptor de estrógenos beta
GD	Giro dentado del hipocampo
h	Horas
IHQ	Inmunohistoquímica
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimol
nmoles	Nano mol
OVX	Ovariectomía
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salino
pmoles	Picomoles

PZ	Zona polimórfica del giro dentado del hipocampo
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
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
SMRT	Mediador del silenciamiento del receptor retinoico y tiroideo
seg	Segundos
WHIMS	Estudio sobre la Memoria del Programa de Promoción de la Salud de la Mujer
E.E.M	Error estándar de la media
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'
T°a	Temperatura de hibridación para cebadores de PCR

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Presencia o ausencia del ARNm de las variantes del ER α en cerebro de ratón observadas tanto por RT-PCR como por ensayos de protección a la nucleasa S1.....	13
TABLA 2. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real correspondientes al estudio de regulación estrogénica de la expresión del ER α en el hipocampo del adulto	46
TABLA 3. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR de punto final para la evaluación de isoformas de delección del ER α correspondiente al estudio de regulación estrogénica de la expresión del ER α en el hipocampo del adulto.....	48
TABLA 4. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real para chip correspondientes al estudio de regulación estrogénica de la expresión del ER α en el hipocampo del adulto.....	54
TABLA 5. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real correspondientes al estudio de influencia del tiempo de privación de estrógenos endógenos sobre la eficacia de una THR basada en E2.....	57
TABLA 6. Cebadores utilizados en los experimentos de cobra correspondientes al estudio de influencia del tiempo de privación de estrógenos endógenos sobre la eficacia de una THR basada en E2.	61
TABLA 7. Cebadores utilizados en los experimentos de MSP correspondientes al estudio de influencia del tiempo de privación de estrógenos endógenos sobre la eficacia de una THR basada en E2.....	64
TABLA 8. Cebadores utilizados en los experimentos de COBRA correspondientes al estudio de Influencia de la edad y la presencia de un ambiente enriquecido de largo plazo (9 meses) sobre la expresión del ER α en el hipocampo del adulto.....	70
TABLA 9. Cebadores utilizados en los ensayos de MSRE-PCR correspondiente al estudio de Influencia de la edad y la presencia de un ambiente enriquecido de largo plazo (9 meses) sobre la expresión del ER α en el hipocampo del adulto.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema representativo de la organización tridimensional del sistema límbico en el cerebro de la rata.....	2
Figura 2 Tinción de Nissl del hipocampo dorsal de ratón.....	3
Figura 3 Circuito Trisináptico del Hipocampo.....	5
Figura 4 Los tres tipos de estrógenos.....	7
Figura 5 Mecanismos de acción postulados para los receptores de estrógeno.....	9
Figura 6 Comparación de las regiones promotoras del ER α humano, de ratón y de rata.....	12
Figura 7 Región 5'UTR del ER α de ratón.....	13
Figura 8 Diagrama de la región codificante del ER α murino y sus dominios proteicos.....	14
Figura 9 Reclutamiento de coactivadores y corepresores por el receptor nuclear...	15
Figura 10 Mecanismos de acción de los corepresores de ER.....	16
Figura 11 Estructura del gen del BDNF de ratón.....	27
Figura 12 Representación esquemática de los elementos regulatorios en el promotor del exón IV de ratón que son importantes para la transcripción dependiente de la actividad neuronal.....	28
Figura 13 Resultados obtenidos en los estudios de memoria verbal y asociativa de WHIMS.....	31
Figura 14 Liberación de E2 a lo largo de la vida en humanos, ratas y ratones.....	36
Figura 15 Cortes coronales sobre el cerebro con la posición ventral hacia arriba....	45
Figura 16 Experimento de ChIP	52

Figura 17 Posición relativa y orientación de los cebadores específicos diseñados para ser utilizados en la PCR en tiempo real específica de los promotores del BDNF.....	58
Figura 18 Diagrama del análisis combinado de bisulfiteación-restricción (COBRA)..	60
Figura 19 Imágenes de las jaulas utilizadas en el estudio de la influencia de la edad y la presencia de un ambiente enriquecido de largo plazo sobre la expresión del ER α en el hipocampo del adulto.....	67
Figura 20 Regiones del gen ER α evaluadas por COBRA y PCR en tiempo real basada en enzimas de restricción sensibles a metilación.....	72
Figura 21 Efectos de un tratamiento con E2 sobre la expresión del ER α en el hipocampo de ratones hembra adultos OVX.....	75
Figura 22 Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio representativo de las especies de ARNm de ER α estudiadas en el ratón conteniendo los distintos exones 5'UTR.....	76
Figura 23 Expresión de isoformas de delección del ER α durante el proceso de regulación hacia abajo del ARNm total del receptor a las 4 h post-tratamiento con E2.....	76
Figura 24 Efectos sobre la traducción del gen de ER α en el hipocampo a las 4 h del tratamiento con estrógenos.....	77
Figura 25 Expresión hipocámpal de los coreguladores de transcripción REA y SMRT durante la regulación hacia abajo del ARNm del ER α a las 4 h post-tratamiento.....	79
Figura 26 Esquema de la región 5'UTR del gen ER α evaluada por ChIP.....	80
Figura 27 Grado de acetilación de las histonas H3 y H4 analizado por ChIP en las inmediaciones de los exones 5'UTR A y C de los animales E2 4h.....	81

Figura 28 Cinética de la expresión del ARNm del BDNF a las 2 y 4 h post-tratamiento con E2.....	82
Figura 29 Efectos del tratamiento agudo con E2 (2 h) sobre la expresión del BDNF en el hipocampo de ratones hembra adultos OVX.....	83
Figura 30 Niveles de estradiol sérico durante la regulación hacia abajo del ARNm del ER α a las 4 h post-tratamiento.....	83
Figura 31 Fotomicrografías representativas de la detección por inmunohistoquímica de BDNF, SYN and ER α en el hipocampo de los animales CP y LP.....	85
Figura 32 Cuantificación por IHQ de BDNF, ER α y SYN en las diferentes regiones del hipocampo.....	85
Figura 33 Efectos del tiempo de castración sobre la efectividad de la THR con E2 para incrementar los niveles de expresión de ARNm del BDNF en el hipocampo de ratones OVX.....	86
Figura 34 Estudio de los diferentes niveles de metilación en los promotores IV y V de BDNF.....	88
Figura 35 Efectos del envejecimiento y la exposición a un ambiente enriquecido sobre los niveles de expresión del ARNm del ER α en el hipocampo de ratones hembra	90
Figura 36 Cambios en el patrón de metilación de los exones 5'UTR del gen ER α durante el envejecimiento.....	93
Figura 37 Análisis de IHQ para la cuantificación del ER α	95
Figura 38 Niveles séricos de 17 β -estradiol en los animales experimentales.....	96

El hipocampo se ha asociado desde hace tiempo a la ejecución de funciones cognitivas (aprendizaje) 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 (memoria de trabajo) que eventualmente se envía a la corteza cerebral para su almacenamiento a largo plazo. La formación hipocampal se encuentra en el telencéfalo. Comprende seis regiones histoarquitectónicamente distintas, incluyendo el giro dentado (GD); el hipocampo propiamente dicho, el cual está subdividido en tres campos constituídos por neuronas piramidales empaquetadas (CA3, CA2 y CA1); el subículo; presubículo; parasubículo; y corteza entorrinal.

El sistema endocrino y específicamente las hormonas gonadales están estrechamente ligadas al cerebro y presentan una fuerte influencia sobre sus funciones. Está bien establecido que los estrógenos están involucrados en la diferenciación y plasticidad de las neuronas del hipocampo. Pueden influir de forma general sobre funciones neurobiológicas tales como destrezas espacio-perceptuales, aprendizaje y memoria. Los estrógenos llevan a cabo sus funciones biológicas a través de los receptores de estrógeno, que incluyen principalmente al receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y el más reciente $ER\beta$. Ambos receptores tienen una alta expresión en estructuras límbicas y entre estos dos receptores se han demostrado importantes diferencias en su acción biológica tales como su afinidad por compuestos estrogénicos, las secuencias específicas de ADN reconocidas y los patrones tisulares de expresión. Cada uno de estos receptores posee múltiples promotores transcripcionales que controlan la expresión de estos genes en forma compleja y aún desconocida. Precisamente, el splicing alternativo entre el exón codificante líder y el exón no codificante (transcripto a partir de los diferentes promotores) resultará en múltiples variantes de ARNm con distintas regiones 5'UTR. De esta manera, los distintos ARNm generados pueden intervenir en la regulación de la vía estrogénica por estabilidad o procesamiento del ARNm. 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. Para el gen $ER\alpha$ de ratón se reconocen cinco promotores: A, B, C, F1, y H. A la fecha se han reportado seis variantes 5'UTR del gen $ER\alpha$ murino:

A-1, B-1, C-1, F1-1, F1-F2-1, y H-1 (donde 1 corresponde al exón líder o primer exón codificante) que pueden ser traducidos a la misma proteína de 66 kDa. Además de diferencias a nivel de la actividad de promotores del ER α , la existencia de variantes con deleciones de exones codificantes pueden impactar en la capacidad de la proteína ER α para unirse al ADN o ligando, para dimerizar, o para entrar en el núcleo, regulando las vías de señalización del receptor. Los mecanismos de acción de los receptores de esteroides implican un repertorio tripartito, incluyendo los receptores, sus ligandos, y sus proteínas coregulatoras. 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. Dos cofactores nucleares clave asociados al ER α son el mediador del silenciamiento del receptor retinoico y tiroideo (SMRT) y el represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA). Desde su descubrimiento SMRT ha sido considerado como un corepresor, pero recientemente se ha demostrado que tiene un rol específico del tipo celular y que puede regular positivamente la actividad transcripcional del ER α . Parecería que este rol positivo de SMRT en regular la expresión génica es específico para ER α , ya que las actividades dependientes de agonistas de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares resultaron negativamente reguladas por este coregulador. Por otro lado, REA es un corepresor que interacciona específicamente con los ER, suprimiendo su actividad transcripcional.

Algunos de los efectos neurotróficos de los estrógenos pueden deberse al incremento de la transcripción del gen del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Esta neurotrofina juega un rol muy importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas. Al igual que el gen ER α , la estructura del gen que codifica para el BDNF es compleja, ya que contiene múltiples promotores que son usados para generar diferentes transcritos con distintos exones no codificantes en su región 5'. Debido a esto, la regulación de la expresión de estos genes por mecanismos epigenéticos es el objetivo actual en la investigación para poder comprender el control de su expresión en las neuronas. La modificación epigenética de la cromatina involucra el cambio de bases y proteínas en ausencia de cambios en la secuencia de ADN. Entre las modificaciones

epigenéticas conocidas podemos resaltar la acetilación de histonas, metilación de las histonas y la metilación del ADN en sitios CpG. En este último caso, la metilación de los residuos de citosina resultará en la represión transcripcional. Por otro lado, la acetilación de las histonas permite al ADN separarse de los nucleosomas y ser accesible para la maquinaria transcripcional.

Debido a que el hipocampo depende de factores tróficos hormonales tales como los estrógenos durante la edad adulta, la deficiencia de estrógenos durante la menopausia puede hacer que estas neuronas sean más vulnerables al deterioro y exacerbar déficits de memoria emergentes relacionados con la edad. Los efectos tróficos ejercidos por los estrógenos en el cerebro disminuirían el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas y disfunciones mnemónicas tales como las asociadas a traumatismos, hipoxia, menopausia o envejecimiento. Sin embargo, durante los últimos años fueron publicados varios estudios pertenecientes al *Women's Health Initiative Memory Study* de Estados Unidos en donde se describe no sólo la falta de efecto neuroprotector de algunas terapias hormonales de reemplazo (THR) sobre el padecimiento de demencias o declinación cognitiva sino que dichas terapias aumentaban el riesgo de padecerlas. Estos estudios han puesto en duda el paradigma clásico de los efectos neuroprotectores de las THR sobre la prevención de la enfermedad de Alzheimer y la declinación cognitiva asociada a la edad. Se ha hecho evidente que existen variables neuroendocrinas y conductuales asociadas a cada individuo que determinan el efecto final de las THR sobre el SNC. Es imprescindible conocer de qué manera estas variables influyen sobre el efecto neuroprotector de los estrógenos, generando modelos *in vivo* que permitan estudiar la acción trófica de las hormonas sexuales sobre estructuras cerebrales corticales y subcorticales.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es conocer, mediante el uso de modelos animales *in vivo*, los mecanismos moleculares por los que ciertas variables neuroendocrino-conductuales pueden modular la acción neurotrófica de los estrógenos en estructuras del cerebro relacionadas con la memoria (hipocampo y sus relaciones corticales y septales).

Para esto nos propusimos evaluar en una primera etapa la influencia de un tratamiento agudo con E2 sobre la regulación transcripcional y postranscripcional de

la expresión del ER α en el hipocampo de ratones hembra ovariectomizadas (OVX). Luego de conocer este aspecto básico de regulación pasamos a la segunda etapa (variable **tiempo**) donde investigamos si el **tiempo** que el ratón hembra pasa privado de su función ovárica modifica la capacidad transcripcional de la vía estrogénica en el hipocampo. Finalmente en una tercera etapa evaluamos si la **exposición** de ratones hembra a un **ambiente enriquecido** modifica los efectos del **envejecimiento natural** sobre la expresión del ER α .

Materiales y Métodos

En la primera etapa de trabajo se utilizaron ratones hembra de la cepa Swiss-Rockland OVX a los 3 meses de edad y sacrificados a las 2 h (E2 2 h) o 4 h (E2 4 h) post-inyección sc de 0,05 μ g E2/g de peso corporal. El grupo control fue tratado con el vehículo de la hormona (aceite de maíz). En el sacrificio se recogió la sangre troncal y se estudiaron los niveles séricos de E2 mediante radioinmunoensayo (RIA). Para inmunohistoquímica los cerebros fueron fijados y embebidos en parafina y se evaluó la expresión de ER α , sus cofactores SMRT, REA y la neurotrofina BDNF en el hipocampo. Para la extracción de ácidos nucleicos el hipocampo fue disecado y mantenido a -80°C. Mediante RT-PCR en tiempo real se estudiaron los promotores de ER α activos y la expresión del ARNm total de ER α y BDNF. Para evaluar la expresión de isoformas de delección del ER α utilizamos RT-PCR de punto final. Con el objetivo de estudiar si existe un mecanismo de acetilación/desacetilación de histonas que subyace a la regulación de la expresión del ER α por el tratamiento, se utilizó la técnica de ChIP. Para ello, se extrajo la cromatina de muestras de tejido de hipocampo fijado en formol 1% y congelado a -80°C. Luego de fragmentar la cromatina por sonicado se sometió a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-acetil histona H3 o anti-acetil histona H4. Finalmente los fragmentos de cromatina sonicada e inmunoprecipitada fueron purificados y conservados a -20°C para su posterior uso en PCR cuantitativa de tiempo real para la región 5'UTR del gen ER α . En la segunda etapa del trabajo se utilizaron ratones hembra de la cepa Swiss-Rockland OVX a los 3 o 10 meses de edad y tratados a partir de los 10,5 meses de edad durante 15 días con 1,75 μ g de E2/animal vía sc (animales LPE y CPE respectivamente) o aceite de maíz (animales controles LPC o CPC, respectivamente). Para evaluar la inducción estrogénica de la neurotrofina BDNF estudiamos la expresión del ARNm total y el uso de sus promotores alternativos

mediante RT-PCR en tiempo real. Seguidamente estudiamos por inmunohistoquímica si los cambios observados a nivel del ARNm del BDNF se traducían a nivel de la proteína. Junto con esto, evaluamos el estado de la expresión proteica de ER α y sinaptofisina (SYN). Para conocer si el tiempo que el ratón hembra pasa privado de su función ovárica causa alteraciones mediante mecanismos de metilación diferencial del gen de BDNF se utilizó la técnica de análisis combinado de bisulfitación-restricción (COBRA) y PCR en tiempo real específica de metilación (MSP). Para ello, se extrajo ADN genómico de muestras de hipocampo y fue modificado químicamente con bisulfito de sodio. Las muestras modificadas fueron amplificadas por PCR y la metilación de las islas CpG fue estudiada mediante ensayos de restricción (COBRA) o por análisis de los datos de la PCR en tiempo real (MSP).

En la última etapa del trabajo se utilizaron ratones hembra de la cepa CF-1. Luego de cumplidos los 2 meses de edad los animales fueron mantenidos en jaulas estándar durante 2 meses y sacrificados a los 4 meses de edad (animales controles jóvenes, CJ) o mantenidos durante 9 meses y sacrificados a los 11 meses de edad (animales de mediana edad controles, C). Otro set de animales fue mantenido en jaulas con ambiente enriquecido (para su estimulación física y cognitiva continua) durante 9 meses y sacrificados a los 11 meses de edad (animales de mediana edad enriquecidos, E). Los niveles de expresión relativa del ARNm de ER α y de los transcritos de ER α conteniendo los distintos exones no-traducidos fueron evaluados por RT-PCR en tiempo real. La expresión de la proteína ER α fue evaluada por inmunohistoquímica. Para conocer si los mecanismos que subyacen a la regulación transcripcional del ER α mediada por la edad involucran modificaciones epigenéticas decidimos realizar un análisis de metilación de ADN por COBRA. Con el objetivo de poder cuantificar los resultados del análisis cualitativo que realizamos por COBRA decidimos utilizar la técnica de PCR en tiempo real basada en enzimas de restricción sensibles a metilación (MSRE-PCR). Básicamente, estas enzimas fallan en cortar el ADN genómico si un residuo de citosina del sitio de reconocimiento se encuentra metilado. Mediante el uso de cebadores que delimiten una región que contenga sitios de restricción para la MSRE de interés se logrará cuantificar la cantidad de sitios no cortados y por ende metilados. Los niveles séricos de E2 fueron evaluados por RIA a partir de la sangre troncal recogida en el sacrificio.

Resultados

Regulación estrogénica de la expresión del ER α en el hipocampo del adulto. Los animales tratados con una única inyección sc de 0,05 μ g E2/g de peso corporal mostraron una disminución de la expresión del ARNm del ER α a las 4 h post inyección. Dicha disminución estuvo asociada con una regulación hacia abajo de los niveles de expresión de los transcritos ER α -A y ER α -C. Adicionalmente, no detectamos expresión de isoformas de delección del ER α en ningún grupo experimental. En las hembras tratadas con E2 y sacrificadas a las 4 h, los niveles de proteína de ER α fueron significativamente menores en el GD y la región CA1 respecto de las hembras castradas control. Estos animales también presentaron un aumento de los niveles de expresión de la proteína REA en la región CA3 del hipocampo. De manera contraria, la expresión de la proteína SMRT estaba disminuida en el GD de los animales a causa del tratamiento con E2. El estudio de ChIP develó que los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 en las regiones inmunoprecipitadas estudiadas no presentaban diferencias a las 4 h post-tratamiento con E2 respecto de las hembras castradas controles. A las 2 h post-inyección con E2, mientras la expresión del ER α no se modificó, la expresión del ARNm del BDNF aumentó respecto de los controles. La proteína de BDNF no presentó cambios a las 2 h post-tratamiento. Seguidamente, luego de 4 h de haber tratado a los animales con E2 la expresión del ARNm del BDNF no mostró diferencias con respecto a los controles. Esta falta de inducción de BDNF coincide con la disminución de la expresión del ER α a las 4 h post-tratamiento. El ensayo de RIA confirmó que los animales castrados y tratados con E2 alcanzaron una concentración de 73 ± 9 pg E2/ml suero, mientras que los animales controles castrados no superaron los $4,0 \pm 3,3$ pg E2/ml suero.

Influencia del tiempo de privación de estrógenos endógenos sobre la eficacia de una THR basada en E2. Luego del comienzo de la THR los animales que pasaron un corto periodo de castración (CPE) presentaron una expresión proteica más alta de BDNF comparado con sus controles (CPC). Cuando la THR fue administrada 7,5 meses post-OVX, el E2 no fue capaz de inducir la expresión de la proteína BDNF. En paralelo, los animales que pasaron un corto periodo de castración (CPE) al momento de recibir E2 mostraron un incremento de la expresión de SYN en la región CA3. En contraste, el tratamiento no indujo la expresión de SYN cuando fue iniciado

7,5 meses post-OVX. El tratamiento con E2 resultó en una regulación hacia abajo del $ER\alpha$, tanto en los animales CPE como en los LPE. En paralelo a los cambios observados en la expresión proteica, nosotros encontramos un incremento en la expresión del ARNm de BDNF en los animales CPE. Por el contrario, no encontramos diferencias en la expresión del ARNm de BDNF en los grupos LP. Un análisis detallado de la expresión de ARNm reveló cambios en tres de los cinco transcritos de BDNF. De esta manera encontramos que la regulación hacia arriba del ARNm total de BDNF (observado en el grupo CPE) estaba mediada principalmente por el incremento en la expresión de las variantes IV y V. Dado que la expresión de BDNF no fue inducida en los animales LPE, decidimos investigar los mecanismos de regulación que subyacen a la pérdida de respuesta al E2. De esta manera planteamos la hipótesis de que los niveles de metilación de regiones regulatorias en los promotores IV y V podrían ser afectados en los grupos LP. Los resultados de COBRA indicaron que el sitio CRE del promotor IV presentaba un alto nivel de metilación de manera independiente al tratamiento con E2 en los animales LP. Los grupos CP (CPE y CPC) presentaron los sitios CRE completamente demetilados. Los resultados de MSP mostraron que la isla CpG estudiada en el promotor V presentaba un alto grado de metilación en los animales LP respecto a los animales CP. En conjunto, esta información indicó que el hipocampo de los animales que transcurrieron un largo tiempo post-OVX presentó un incremento global en la metilación de regiones ricas en CpG de ambos promotores del gen BDNF.

Influencia de la edad y la exposición a un ambiente enriquecido de largo plazo (9 meses) sobre la expresión del $ER\alpha$ en el hipocampo del adulto. Mediante el empleo de PCR en tiempo real encontramos que los niveles de expresión del ARNm total del $ER\alpha$ se encontraban disminuidos en los animales de mediana edad. Dicha disminución estuvo asociada con una regulación hacia abajo de los niveles de expresión de las isoformas transcripcionales $ER\alpha$ -A, $ER\alpha$ -C y $ER\alpha$ -F. Para poder entender los mecanismos de esta regulación evaluamos la hipótesis de que los cambios en la expresión del ARNm del $ER\alpha$ durante el envejecimiento se corresponden con cambios en el patrón de metilación de la región 5'UTR del gen $ER\alpha$. Los amplímeros digeridos por la enzima *Bst*UI en COBRA demostraron que los sitios de restricción estudiados tanto en la región no codificante del exón 1 como en el exón C del gen $ER\alpha$ se encontraban metilados en los animales de mediana de

edad. Los resultados obtenidos mediante COBRA fueron confirmados y cuantificados por PCR en tiempo real basada en MSRE. La cantidad relativa de alelos metilados en los mismos sitios *Bst*UI evaluados por COBRA se encontraba incrementada en los animales de mediana edad respecto de los controles jóvenes. Al estudiar los efectos de la exposición a un ambiente enriquecido encontramos que dicho tratamiento no revirtió la caída de la expresión del ARNm del ER α asociada a la edad. Adicionalmente, no encontramos diferencias en la metilación del gen ER α cuando comparamos los grupos de mediana edad E y C. Sin embargo, cuando evaluamos la expresión de ER α , a nivel proteína detectamos que la exposición a un ambiente enriquecido aumentó la expresión analizada mediante inmunohistoquímica. Con respecto a los niveles séricos de E2 no encontramos diferencias entre los animales experimentales y se mantuvieron en $4\pm 0,23$ pg/ml.

Conclusiones

1) Un **tratamiento agudo** con E2 tiene la capacidad de modificar la expresión del ER α en el hipocampo del ratón adulto, presentando las siguientes características:

- ✓ Una dosis de 0,05 μ g E2/g de peso corporal generó niveles séricos de la hormona en el orden de los 73 ± 9 pg/ml. Dicho tratamiento disminuyó los niveles del ARNm del ER α a las 4 hs post-tratamiento. Además, detectamos una menor expresión de la proteína ER α en la región CA1 y el GD del hipocampo frente al tratamiento con E2.
- ✓ La disminución en la transcripción del ER α se produjo en asociación a una menor actividad de los promotores A y C del gen.
- ✓ El mecanismo epigenético de acetilación/desacetilación de histonas en la región promotora A y C del ER α no estaría interviniendo en la regulación estrogénica del receptor.
- ✓ La dosis empleada de E2 provocó un aumento de la expresión del represor específico de la acción estrogénica (REA) en la región CA3 y una disminución del coregulador SMRT en el GD del hipocampo.
- ✓ No encontramos expresión de isoformas de delección ni en los animales controles ni en los tratados.
- ✓ El tratamiento con E2 estimuló la expresión del ARNm del BDNF pero no de la proteína a las 2 hs post-tratamiento. A las 4 hs post-tratamiento, no detectamos inducción de la expresión del ARNm de BDNF.

2) El **tiempo** que un individuo transcurre privado de su función ovárica condiciona el efecto neurotrófico de una THR basada en estrógenos exógenos, pudiéndose destacar las siguientes características:

- ✓ El tratamiento con E2 provocó un aumento en la expresión de la proteína BDNF en la región CA3 y PZ del hipocampo de los animales que transcurrieron por un período corto de castración. Si la castración es crónica, la THR basada en estradiol falla en estimular la expresión de BDNF.
- ✓ Dado que la dinámica de la expresión del ER α fue la misma tanto para los animales LPE como para CPE, las diferencias encontradas en la expresión del BDNF no se estarían debiendo a un cambio en la expresión del ER α .
- ✓ Los animales CPE presentaron una mayor expresión del ARNm de BDNF. Por el contrario, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de BDNF entre los grupos de largo plazo de castración, verificando de esta manera que el tratamiento con E2 fue incapaz de inducir un aumento en la transcripción de BDNF cuando los animales llevaban un tiempo largo de castración.
- ✓ El aumento en la expresión del ARNm de BDNF observado en el grupo CPE se debió mayormente a la inducción de las variantes EIV-BDNF y EV-BDNF y en menor medida a la variante EII-BDNF.
- ✓ El análisis del promotor IV por COBRA reveló que la región regulatoria CRE mostró un mayor número de alelos metilados en los animales que transcurrieron un largo período de castración.
- ✓ Al analizar la isla CpG del promotor V se encontró que los grupos experimentales que pasaron mucho tiempo castrados (grupos LPC y LPE) presentaron un mayor grado de metilación respecto a los grupos CP. Estos resultados en paralelo con los obtenidos por COBRA indicarían que la falla en la respuesta estrogénica de BDNF en los animales castrados crónicos está asociada a un silenciamiento transcripcional de los promotores IV y V del gen de BDNF mediado por un mecanismo de metilación diferencial.
- ✓ Los animales que pasaron un corto periodo de castración (CPE) al momento de recibir E2 mostraron un incremento significativo de la expresión de SYN en

la región CA3. En contraste, el tratamiento con E2 no indujo la expresión de SYN cuando el tratamiento fue iniciado 7,5 meses post-OVX.

3) La expresión del ER α disminuye con la edad avanzada pero esto se revierte por la exposición a un **ambiente enriquecido** de largo plazo (9 meses):

- ✓ La expresión del ARNm total del ER α fue menor en los animales de mediana edad (11 meses). Esta regulación hacia abajo estuvo asociada con una disminución de la actividad relativa de los promotores A, C y F del ER α .
- ✓ Los ensayos de metilación en este experimento mostraron que la disminución de la expresión del ARNm de las variantes ER α -A, ER α -C y ER α -F en el hipocampo de ratones hembra de mediana edad se correspondió con un incremento en la metilación del exón C (perteneciente a la isoforma ER α -C) y de la región 5'UTR del exón 1 (perteneciente a todas las isoformas) del ER α , en comparación con los animales controles jóvenes (CJ).
- ✓ La exposición a un ambiente enriquecido no logró revertir la disminución en la transcripción y el incremento en los niveles de metilación del gen de ER α asociados al envejecimiento.
- ✓ Sorpresivamente la disminución de la expresión a nivel proteína de ER α que se produce por la edad, fue revertida por la exposición a un ambiente enriquecido de largo plazo.

The hippocampus has long been associated with the implementation of cognitive function (learning) and memory consolidation. A function loss in the hippocampus region has been linked to the onset of dementia and neurodegenerative diseases. The hippocampus is involved in encoding new memory, creating spatiotemporal patterns in an initial working memory that is eventually sent to the cerebral cortex for long-term storage. The hippocampal formation is in the telencephalon and comprises six different regions, including the dentate gyrus (DG), the hippocampus itself, which is divided into three areas constituted by packed pyramidal neurons (CA3, CA2 and CA1), the subiculum; presubiculum; parasubiculum, and entorhinal cortex.

The endocrine system, specifically the gonadal hormones, is closely linked to the brain which has a strong influence on its functions. It is well established that estrogens are involved in the differentiation and plasticity of hippocampal neurons. Generally, they can influence neurobiological functions such as space-perceptual skills, learning and memory. Estrogens carry out their biological functions through estrogen receptors, among them the estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) and $ER\beta$. Both receptors have a high expression in limbic structures; however, they have shown significant differences in their biological action such as affinity for estrogenic compounds, recognition of specific DNA sequences and tissue expression patterns. Each of these receptors has numerous transcriptional promoters which control the expression of these genes in a complex and unknown manner. Indeed, alternative splicing between a leader-coding exon and different non-coding exons (transcribed from different promoters) result in multiple variants of mRNA that differ in the 5'-untranslated region (5'UTR). Thus, the different mRNAs generated can intervene in the regulation of the estrogenic pathway through mRNA processing or stability. Recent work has shown that these promoters are capable of being activated or inhibited in particular physiological situations or by the action of compounds with estrogenic activity. The mouse $ER\alpha$ gene is preceded by at least five promoters: A, B, C, F1, and H. To date, six 5'UTR variants have been reported for $ER\alpha$ mouse gene (A-1, B-1, C-1, F1-1, F1-F2-1 and H-1; where 1 is the leader exon or first coding exon) that can be translated to the same protein of 66 kDa. Apart from differences in the level of promoter activity of the $ER\alpha$, the existence of variants that have deletions of coding exons may impact the ability of the $ER\alpha$ protein to bind the DNA or the ligand, to dimerize or to enter the nucleus, regulating receptor signaling pathways.

The steroid receptor-mediated signaling pathway involves the receptors, their ligands, and their coregulatory proteins. Depending on how the coregulators affect gene expression, they can be divided into coactivators which promote transcriptional activity and, corepressors that decrease gene expression. Two key nuclear cofactors associated with ER α are: the silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) and the repressor of estrogen receptor activity (REA). Since its discovery, SMRT has been considered as a corepressor, but recently it has been shown that SMRT can upregulate the transcriptional activity of ER α . This positive role of SMRT in regulating gene expression seems to be specific to ER α because agonists-dependent activities of other members of the nuclear receptor superfamily were negatively regulated by this coregulator. In addition, REA is a corepressor that interacts specifically with the ER, suppressing transcriptional activity.

Some estrogenic neurotrophic effects may be due to an increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene transcription. This neurotrophin plays a very important role in the proliferation, differentiation and survival of neurons. Similar to ER α gene, the structure of the gene encoding for BDNF is complex, containing multiple promoters that are used to generate different transcripts with different noncoding exons at their 5' region, implying that epigenetic mechanisms can regulate its expression in neurons. The chromatin epigenetic modification involves chemical modification of nucleotides and nucleoproteins in the absence of changes in the DNA sequence. Among known epigenetic modifications we can highlight histone acetylation, histone methylation and DNA methylation at CpG sites. In the latter case, methylation of cytosine residues results in transcriptional repression. On the other hand, when the histones are acetylated, the DNA can be separated from the nucleosome and be accessible to the transcriptional machinery.

Because the hippocampus is modulated by estrogen throughout adulthood, an estrogen deficiency in females during menopause can make these neurons more vulnerable to deterioration and exacerbates memory deficits later on. Trophic effects exerted by estrogen in the brain would decrease the risk of neurodegenerative diseases such as mnemonic dysfunction associated with trauma, hypoxia, menopause or aging. However, in recent years were published several studies pertaining to the Women's Health Initiative Memory Study from U.S.A., which describes not only the lack of neuroprotective effect of some hormone replacement

therapies (HRT), but also the increased risk of suffering dementia or cognitive decline. These studies have questioned the classic paradigm of the neuroprotective effects of HRT on the prevention of Alzheimer's disease and cognitive decline associated with aging. It has become evident that there are neuroendocrine and behavioral variables associated with each individual that influence the final effect of HRT on the central nervous system. It is essential to know how these variables modulate the neuroprotective effect of estrogen, generating *in vivo* models for the study of the trophic action of sex hormones on cortical and subcortical brain structures.

Objectives

The overall aim of this study was to determine, by using *in vivo* animal models, the molecular mechanisms by which certain neuroendocrine-behavioral variables can modulate the neurotrophic action of estrogens on brain structures involved in memory (hippocampus and cortical and septal relationships).

In a first stage, we decided to assess the influence of an acute treatment with estradiol (E2) on transcriptional and posttranscriptional regulation of ER α expression in the hippocampus of ovariectomized (OVX) female mice. After learning this basic aspect of ER α regulation we continued with the second stage (**time** variable) where we investigated whether the **timeframe** that the female mouse was deprived of ovarian function modifies the transcriptional capacity of the estrogenic pathway in the hippocampus. Finally, in a third stage we evaluated whether exposure of the female mice to an **enriched environment** modifies the effects of **natural aging** on the expression of ER α .

Materials and Methods

For the first stage, Swiss-Rockland female mice were OVX at 3 months of age and sacrificed at 2 h (2 h E2) or 4 h (E2 4 h) after sc injection of E2 0.05 μ g/g body weight. The control group was treated with the hormone vehicle (corn oil). At sacrifice, trunk blood was collected and then the concentration of E2 in the serum was quantified by radioimmunoassay (RIA). Samples of brain tissue were fixed and embedded in paraffin. The expression of ER α , its cofactors SMRT and REA and, the neurotrophin BDNF was evaluated in the hippocampus by immunohistochemistry. In addition, the hippocampus was dissected and kept at -80°C for nucleic acid extraction in another set of animals. In these samples, active promoters of ER α and

total mRNA expression of ER α and BDNF were studied by real-time RT-PCR, whereas the expression of ER α deletion isoforms was evaluated by endpoint RT-PCR. To study whether histone acetylation/deacetylation is underlying the regulation of ER α expression after E2 treatment, chromatin immunoprecipitation (ChIP) was used. Chromatin was extracted from 1% formalin-fixed hippocampal samples and frozen at -80°C. After fragmenting the chromatin by sonication, immunoprecipitation with anti-acetyl-histone H3 or anti-acetyl-histone H4 was performed. Then, the sonicated and immunoprecipitated chromatin was purified and stored at -20°C for subsequent 5'UTR ER α quantitative real-time PCR analysis.

For the second stage, female mice of the Swiss-Rockland strain were OVX at 3 or 10 months of age. Beginning at 10.5 months of age, the OVX mice were treated for 15 days with sc injection of 1.75 μ g of E2/animal (LTE and STE animals respectively) or corn oil (LTC and STC control animals, respectively). To evaluate the estrogenic induction of the neurotrophin BDNF we measured total mRNA expression; the use of alternative promoters was analyzed by real-time RT-PCR. Then, we studied whether the changes observed at BDNF mRNA level were translated to the protein level using immunohistochemistry. Along with this, we assessed ER α and synaptophysin (SYN) protein expression. To know whether the post-OVX timeframe elapsed before the initiation of E2 treatment causes methylation of the BDNF gene, combined bisulfite restriction analysis (COBRA) and real-time methylation-specific PCR (MSP) techniques were used. For this purpose, genomic DNA was extracted from hippocampus samples and chemically modified with sodium bisulfite. The modified samples were amplified by PCR and, methylation of CpG islands was studied using restriction assays (COBRA) or by analyzing data from real-time PCR (MSP).

In the last stage, female mice of the CF-1 strain were used. Two months old animals were kept in standard cages for 2 more months and sacrificed at 4 months of age (young control animals, YC) or maintained for 9 months and sacrificed at 11 months of age (middle-aged control animals, MC). Another set of animals were kept in cages with enriched environment (for continuous physical and cognitive stimulation) for 9 months and sacrificed at 11 months old (middle-aged and enriched animals, ME). Relative expression levels of total ER α mRNA and transcripts containing various non-translated exons were assessed by real-time RT-PCR. ER α protein was evaluated by immunohistochemistry. To determine whether the mechanism

underlying age-mediated ER α transcriptional regulation involves epigenetic modifications we decided to analyze DNA methylation by COBRA. In order to quantify the qualitative COBRA analysis we decided to use methylation-sensitive restriction enzymes-based real-time PCR (MSRE-PCR). Basically, these enzymes fail to cut genomic DNA if a cytosine residue of the recognition site is methylated. By using primers which delineate a region containing the restriction sites to the MSRE of interest the amount of not cut sites, and hence methylated can be quantified. Serum E2 levels were assessed by RIA from trunk blood collected at sacrifice.

Results

Estrogenic regulation of ER α expression in the adult hippocampus. Animals treated with a single sc injection of 0.05 E2 μ g/g body weight showed a decrease in mRNA expression of ER α at 4 h post-injection. This decrease was associated with downregulation of the expression levels of the transcripts ER α -A and ER α -C. Additionally, we did not detect expression of ER α deletion isoforms in any experimental group. In females treated with E2 and sacrificed at 4 h, the ER α protein levels were significantly lower in the DG and CA1 region with respect to control OVX females. These animals also showed increased expression levels of REA protein in the hippocampal CA3 region. Conversely, the SMRT protein expression was decreased in the DG of animals due to treatment with E2. ChIP analysis revealed that the levels of acetylation of histones H3 and H4, in the regions studied did not differ from controls OVX females. At 2 h post-injection with E2, whereas ER α expression remained unchanged, BDNF mRNA expression was increased compared to controls. BDNF protein showed no change at 2 h post-treatment. Then, after 4 h E2 treatment, BDNF mRNA expression showed no differences compared to controls. This lack of induction of BDNF coincides with the decreased expression of ER α at 4 h post-treatment. The RIA assay confirmed that animals treated with E2 reached a concentration of 73 ± 9 pg E2/ml, whereas castrated control animals did not exceed 4.0 ± 3.3 pg E2/ml.

Influence of an endogenous estrogen deprivation timeframe on the effectiveness of E2-based HRT. Animals that experienced a short period of castration (STE) before the beginning of the HRT, had a higher BDNF protein expression compared with controls animals (STC). When HRT was administered 7.5 months post-OVX (LTE), E2 was not able to induce the protein expression of BDNF. In parallel, the animals

that had a short period of castration before receiving E2 (STE) showed an increase in the expression of SYN in CA3 region. In contrast, the HRT did not induce the expression of SYN when was initiated 7.5 months post-OVX. Treatment with E2 resulted in a down-regulation of ER α , both in STE and LTE animals. In parallel to the changes observed in protein expression, we found an increase in BDNF mRNA expression in STE animals. By contrast, no differences were found in BDNF mRNA expression of LT groups. A detailed analysis of mRNA expression revealed changes in three of the five BDNF transcripts. Thus, we found that the mRNA upregulation of total BDNF (observed in STE group) was mediated mainly by the increased expression of variants IV and V. Since BDNF expression was not induced in LTE animals, we decided to investigate the regulatory mechanisms underlying the loss of response to E2. We hypothesized that methylation levels in the promoter regulatory regions IV and V may be affected in LT groups. COBRA results indicated that the CRE site of promoter IV showed a high methylation level in LT animals, independently of treatment with E2. ST groups (STE and STC) had completely demethylated CRE sites. MSP results showed that the CpG island, studied in the promoter V, had a high degree of methylation in LT animals compared to ST animals. Taken together, these results indicate that the hippocampus of animals under a long period of OVX have an overall increase in the methylation of CpG-rich regions of both *BDNF* promoters.

Influence of age and exposure to a long term enriched environment (9 months) on ER α expression in the adult hippocampus. By using real-time PCR we found that total ER α mRNA expression levels were decreased in aged animals. This decrease was associated with downregulation of the expression levels of transcriptional isoforms ER α -A, ER α -C y ER α -F. To understand this regulation we tested the following hypothesis: changes in ER α mRNA expression during aging correspond to changes in the pattern of methylation of the 5'UTR region of ER α . The digested amplimers by *Bst*UI in COBRA showed that both restriction sites studied in the non-coding region of exon 1 and exon C of the ER α gene were methylated in middle-aged mice. The results obtained by COBRA was confirmed and quantified by MSRE-PCR. The relative amount of methylated alleles in the same *Bst*UI sites evaluated by COBRA, an increase in middle-aged animals compared to young control mice was found. In studying the effects of exposure to an enriched environment found that

such treatment did not reverse the age-related decline in the ER α mRNA expression. Additionally, no differences in ER α gene methylation were observed when ME and MC middle-aged groups were compared. However, when we evaluated the expression of ER α , protein level we found that exposure to an enriched environment increased expression analyzed by immunohistochemistry. With regard to serum levels of E2 found no differences between experimental animals had similar E2 serum levels (4 ± 0.23 pg/ml).

Conclusions

1) An **acute treatment** with E2 has the ability to modify ER α expression in adult mouse hippocampus, presenting the following features:

- ✓ A dose of 0.05 μ g E2/g body weight resulted in serum levels of the hormone in the order of 73 ± 9 pg/ml. Such treatment decreased the mRNA levels of ER α at 4 h post-treatment. Additionally, we also detected changes in mRNA levels of ER α were accompanied by a decreased expression of the ER α protein in the CA1 region of the hippocampus and DG due to E2 treatment.
- ✓ Decreased transcription of ER α occurred in association with a lower activity of the promoters A and C of the gene.
- ✓ The epigenetic mechanism of acetylation/deacetylation of histones in the promoter region A and C of the ER α would not be involved in the receptor regulation.
- ✓ The dose of E2 used resulted in an increased REA expression in the CA3 region and a decreased SMRT expression in the hippocampal DG.
- ✓ ER α deletion isoforms were not detected neither in control animals nor in the treated ones.
- ✓ E2 treatment stimulated the expression of BDNF mRNA expression but not the protein at 2 hours post-treatment. At 4 h post-treatment, we did not detect induction of BDNF mRNA expression.

2) The period of time that an individual elapses deprived of the ovarian function determines the neurotrophic effect of exogenous E2-based HRT:

- ✓ E2 treatment caused an increase in BDNF protein expression in the CA3 and PZ region in the hippocampus of animals with a short period of castration. If castration is chronic, estradiol-based HRT fails to stimulate the expression of BDNF.
- ✓ Since ER α expression dynamics was the same for both LTE and STE animals, the differences found in BDNF expression could not be explained by a change in the activity or expression of ER α .
- ✓ STE animals had higher a BDNF mRNA expression. However, BDNF levels were similar between long term castration groups, implying that E2 treatment was unable to induce an increase in the transcription of BDNF when animals had a long period of castration.
- ✓ The increase in BDNF mRNA expression observed in the group STE was largely due to the induction of the EIV and EV-BDNF variants and to a lesser extent the II-BDNF variant.
- ✓ COBRA analysis for IV promoter revealed that the CRE regulatory region showed a greater number of methylated alleles in animals with a long period of castration.
- ✓ Analyzing the CpG island of the promoter V, the experimental groups who spent OVX for a long time (LTC and LTE groups) had a higher degree of methylation over ST groups. These results parallel those obtained by COBRA, indicating that the failure of BDNF estrogenic response in chronic castrated animals is associated with a transcriptional silencing of the promoters IV and V of BDNF gene mediated by a mechanism of differential methylation.
- ✓ Animals that experienced a short period of castration upon receiving E2 (STE) showed a significant increase in the expression of SYN in the CA3 region. In contrast, E2 treatment did not induce SYN expression when treatment was initiated 7.5 months post-OVX.

3) ER α expression decreases with advancing age but this is reversed by exposure to an enriched environment long-term (9 months):

- ✓ Total ER α mRNA expression was lower in middle-aged animals (11 months). This down-regulation was associated with a decrease in the relative activity of the promoters A, C and F of ER α gene.

- ✓ Methylation assays in this experiment showed that the reduced expression of ER α mRNA variants ER α -A, ER α -C and ER α -F in the hippocampus of middle-aged female mice corresponded to an increase in the methylation of the 5'UTR region of coding exon 1 (belonging to all isoforms) and the exon C (belonging to isoform ER α -C) of the ER α compared with young control animals (YC).

- ✓ Exposure to an enriched environment failed to reverse the decrease in transcription and increased methylation levels ER α gene associated with aging.

- ✓ Surprisingly, the reduced expression of ER α protein level that occurs with age was reversed by exposure to a long-term enriched environment.

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Neuroanatomía general del hipocampo

El hipocampo se ha asociado desde hace tiempo a la ejecución de funciones cognitivas (aprendizaje) 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 (memoria de trabajo) 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; Addis y col. 2007; Battaglia y Pennartz, 2011).

En los roedores, la *formación hipocampal* (Fig.1) se encuentra en el telencéfalo, una subdivisión del prosencéfalo o cerebro anterior, componente fundamental del cerebro donde residen estructuras vitales tales como la corteza y el hipotálamo. Aparece como una estructura elongada en forma de C extendiéndose desde el núcleo septal del prosencéfalo basal rostródorsal, por encima y detrás del diencefalo (tálamo-hipotálamo), al lóbulo temporal incipiente caudoventral. Comprende seis regiones de histoarquitectura diferente, incluyendo el giro dentado (GD); el hipocampo propiamente dicho, el cual está subdividido en tres campos constituidos por neuronas piramidales empaquetadas (CA3, CA2 y CA1); el subículo; presubículo; parasubículo; y la corteza entorrinal. La información entrante llega del córtex, y a su vez el hipocampo es capaz de enviar señales neuronales al hipotálamo y el área septal a través del fórnix (Amaral y Witter, 1995).

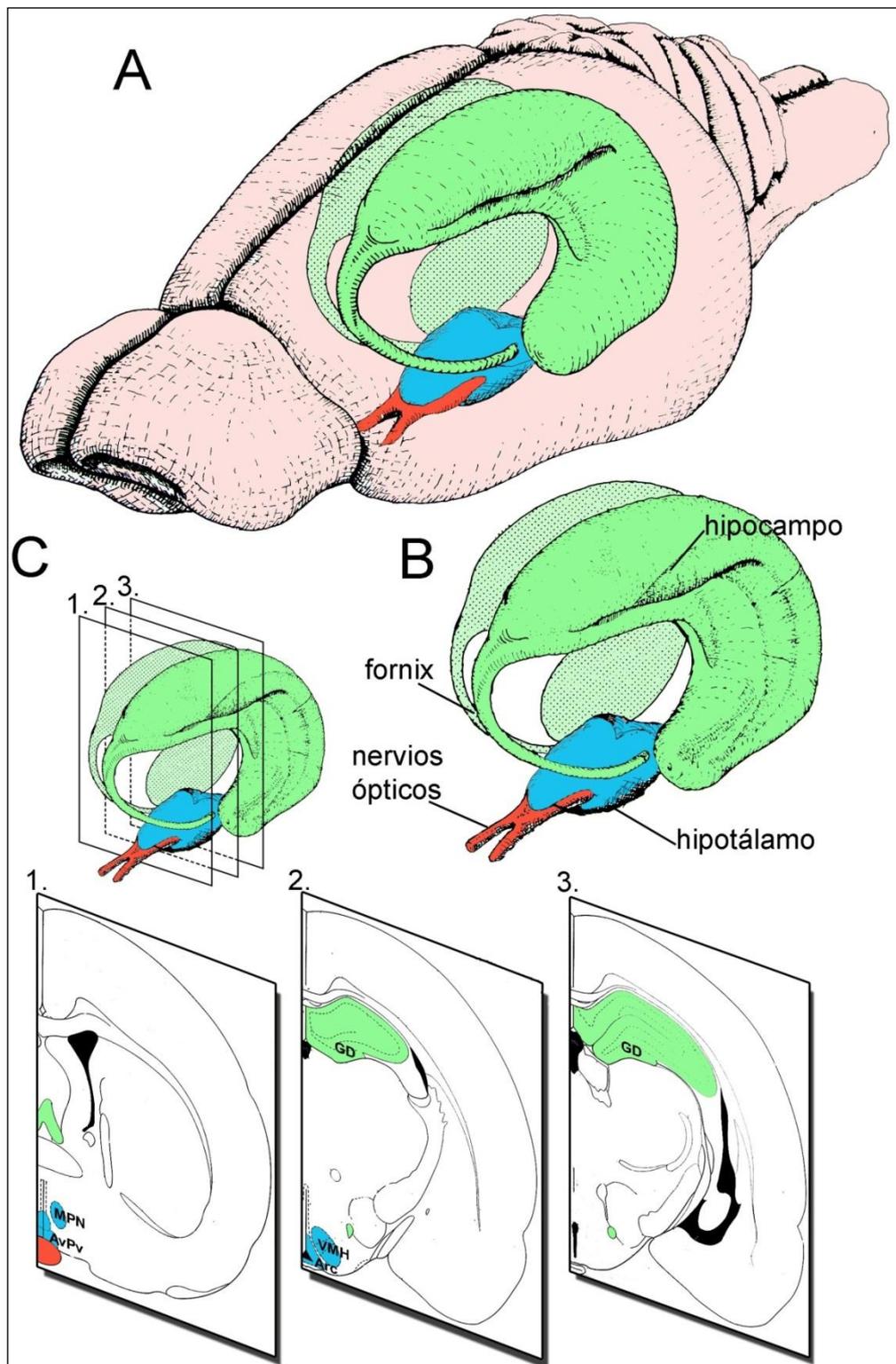


Figura 1 (A) Ubicación espacial de la formación hipocámpica en el cerebro de la rata (B) En verde pueden observarse el fornix y el hipocampo, en rojo los nervios ópticos y en azul el hipotálamo. (C) Ubicación rostro-caudal de los cortes 1, 2 y 3 en el plano coronal. 1. Hipotálamo anterior. AvPv, núcleo 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.

1.1.1- Histoarquitectura del Hipocampo

Las regiones CA1, CA2 y CA3 están constituídas mayoritariamente por neuronas piramidales en tanto que el GD comprende tres tipos de capas celulares bien diferenciadas. La más cercana a la fisura hipocampal (fh) es una capa, relativamente libre de células, denominada capa molecular (sm; stratum moleculare). La segunda la constituyen las células granulares (sg: stratum granulosum) ubicándose en la profundidad de la capa molecular y la tercera está formada primariamente por una población celular heterogénea y se denomina capa celular polimórfica (PZ: zona polimorfica) (Fig.2).

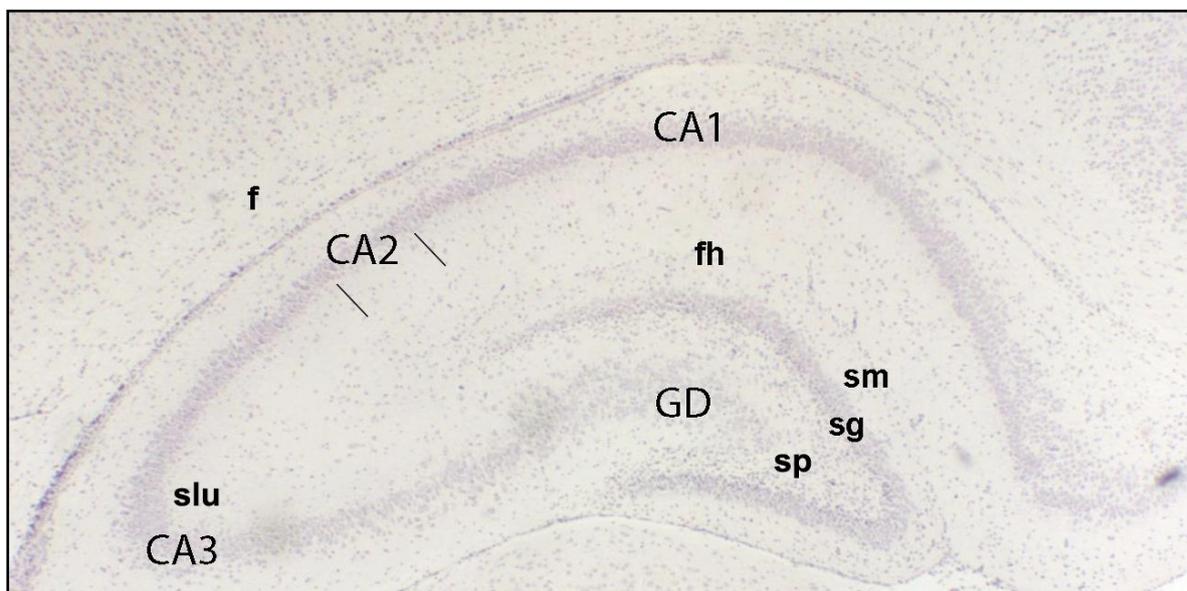


Figura 2 Tinción de Nissl del hipocampo dorsal de ratón. Las regiones CA1, CA2 y CA3 están compuestas por neuronas piramidales. Stratum moleculare (sm); stratum granulosum (sg); Capa o zona polimórfica (sp); Stratum lucidum (slu); giro dentado (GD); fimbria (f); fisura hipocampal (fh). Aumento: 4x.

1.1.2- Circuito Trisináptico del Hipocampo

Ninguna neurona posee toda la información necesaria para la reconstrucción de una memoria. Su existencia se manifiesta únicamente cuando una red de neuronas interconectadas se activa. Esta asociación funcional de grupos de neuronas corticales y sub-corticales, distribuidos a través de diferentes partes del cerebro, es

posible gracias a la existencia de redes neuronales bien definidas. Una de las redes más conocida es la formada por los circuitos de la formación hipocámpica, que están involucrados en el establecimiento de recuerdos de largo plazo. La información proveniente de las cortezas asociativas, somáticas, auditivas y visuales llega primero a la región parahipocámpal y luego pasa al hipocampo a través del córtex entorrinal, que se clasifica en lateral y medial (*LEC* y *MEC*: del inglés **Lateral Entorhinal Cortex** y **Medial Entorhinal Cortex**) (Fig.3). Dicha información ingresa, de manera unidireccional, a través de los axones del córtex entorrinal que forman conexiones con las células granulares del GD y las neuronas piramidales de la región CA3 a través de la vía Perforante (*PP*: del inglés **Perforant Pathway**), dividida en lateral y medial (*LPP* y *MPP*), generando así el *primer bucle de conexión*. La vía PP surge en el córtex entorrinal y culmina en el GD. Las dendritas de las neuronas piramidales de la región CA3 también reciben información desde el GD a través de las fibras musgosas (*MF*: del inglés **Mossy Fibres**), conformando el *segundo bucle de conexión*. Los axones de las neuronas de la región CA3 se dividen en dos ramas. Una rama se une a las células CA1 en el hipocampo contralateral a través de la vía comisural asociacional (*AC*: del inglés **Associational Commissural pathway**). La otra rama emite axones a las células piramidales de la región CA1 a través de la vía colateral de Schaffer (*SC*: del inglés **Schaffer Collateral pathway**), dando lugar al *tercer bucle de conexión*. Las neuronas de la región CA1 también reciben entrada desde la vía perforante y emiten axones al subículo (*Sb*: del inglés **Subiculum**) y al córtex entorrinal, estableciendo así, la principal vía de salida de la información. De esta manera la porción receptora del hipocampo está constituida por el GD, mientras que la porción de emisión de información está constituida por el Sb.

Los axones de las neuronas piramidales del Sb se proyectan al núcleo subcortical a través de la fimbria, una delgada franja de materia blanca en el borde interior del hipocampo. Por último la información vuelve a la corteza sensorial, región cerebral en donde la información se alojó antes de que fuera procesada por el hipocampo (Amaral y Witter, 1995).

1.2.1- Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroides pleiotrópicas (Couse y Korach, 1999) que poseen una reconocida capacidad de actuar como reguladores del crecimiento y la diferenciación celular en diversos órganos y tejidos (O'Brien y col., 1999). En el metabolismo de numerosos mamíferos podemos encontrar principalmente tres tipos químicos de estrógenos diferentes, el E2, considerado como el estrógeno más potente, la estrona y el estriol (Fig. 4).

Los estrógenos juegan un papel fundamental en el desarrollo sexual y la reproducción (George y Wilson, 1988) así como en los procesos fisiológicos de varios órganos, tales como la glándula mamaria, la hipófisis, los huesos, el hígado y el sistema cardiovascular. Los estrógenos también están implicados en diversos procesos patológicos como el cáncer de mama y endometrio (Henderson y col., 1988) y la osteoporosis (Horowitz, 1993).

La mayoría de los estudios sobre la acción de los estrógenos en el cerebro se han centrado en la reproducción. Muchos de estos trabajos han tratado con modelos animales y durante más de 30 años han recabado pruebas que demuestran los diversos sitios de acción de los estrógenos en el cerebro de los animales de experimentación (Sakuma y Pfaff, 1980). Ahora, la ciencia médica ha reconocido que el cerebro es uno de los órganos del cuerpo que más sufre la pérdida de estrógenos después de la menopausia quirúrgica o natural y que los daños provocados por un derrame cerebral y/o la neurodegeneración en la demencia pueden ser retardados por las acciones de los estrógenos. De hecho, con el aumento de la esperanza de vida durante el siglo XXI, las mujeres son propensas a vivir una parte importante de sus vidas en un estado de deficiencia de estrógenos. A pesar de que los sofocos son, para muchas mujeres, la consecuencia más notable de la pérdida de las hormonas ováricas, algunas mujeres experimentan, en la menopausia quirúrgica o natural, dificultades para recordar nombres y otra información importante para la vida diaria, síntomas de depresión y ansiedad, así como también serios déficits en la motricidad fina de coordinación y tiempos de reacción (McEwen y Alves, 1999). Otras consecuencias asociadas a la menopausia son la pérdida de calcio de los huesos y el desarrollo de osteoporosis. Asimismo, la pérdida de la protección de las arterias coronarias, puede llevar a las mujeres

posmenopáusicas a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Para combatir estos problemas muchas mujeres son tratadas con terapias hormonales de reemplazo (THR).

Los efectos fisiológicos resultantes de la acción de los estrógenos sobre los tejidos diana involucran cambios en los patrones de expresión de genes específicos. Dichos fenómenos son mediados por los receptores de estrógenos (RE), proteínas pertenecientes a la superfamilia de los receptores nucleares que se unen a los estrógenos (Jensen y Jacobson, 1962; Jensen y DeSombre, 1973).

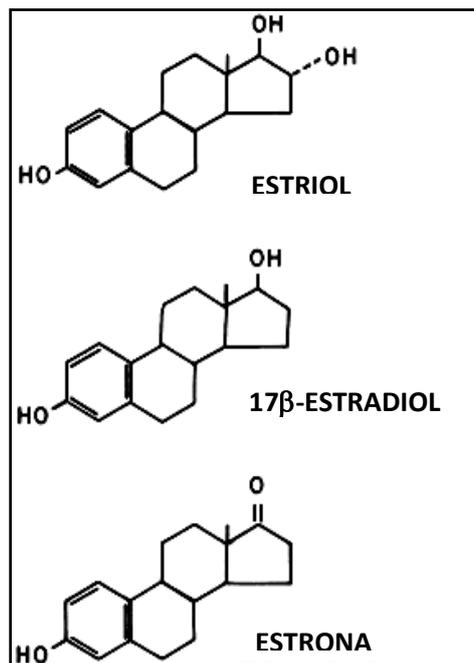


Figura 4 Los tres tipos de estrógenos.

1.2.2- Receptores de estrógeno

Los estrógenos llevan a cabo sus funciones biológicas a través de los receptores de estrógeno (ER, del inglés *Estrogen Receptor*), que incluyen principalmente al receptor clásico ER α y al 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 E2 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 córtex (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 E2 en ciertas regiones del cerebro. En el hipotálamo y amígdala de ratones dobles *knockout* para ER α /ER β se observó captación de E2 radiactivo, lo cual sugiere la existencia de otras proteínas capaces de unir estrógeno (Shughrue y col., 2002). Una de dichas proteínas es el ER-X, un ER de membrana descrito en neocórtex, 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 E2 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).

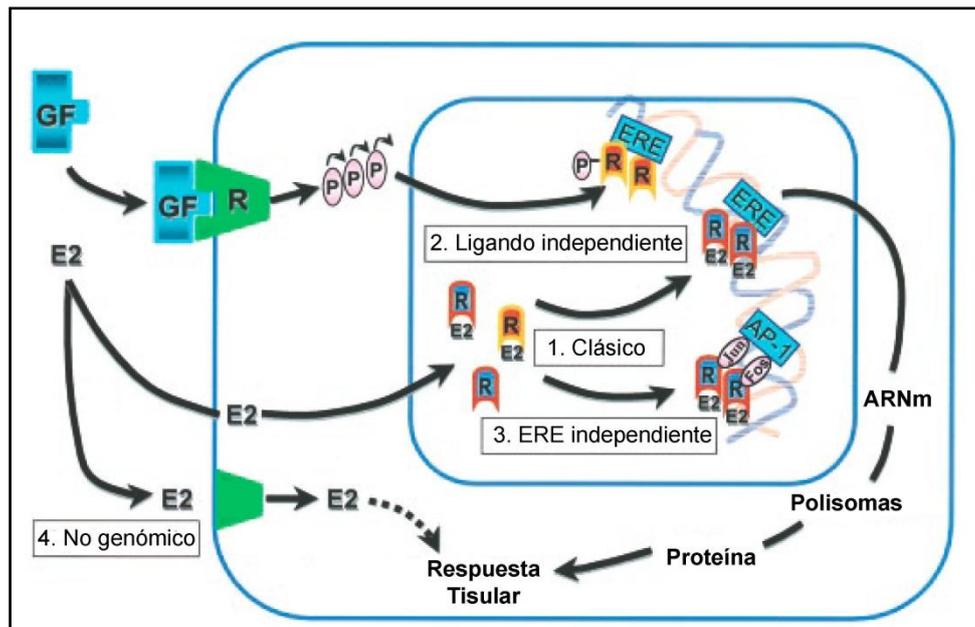


Figura 5 Mecanismos de acción postulados para los receptores de estrógeno. *GF*, factor de crecimiento; *R*, receptor; *P*, fosforilación; *ERE*, elemento de respuesta a estrógenos. Modificado de Hall y col., 2001.

El mecanismo ligando dependiente, o mecanismo clásico de acción de los estrógenos, define a los miembros Clase I de la superfamilia de receptores nucleares esteroide/tiroide, de la cual $ER\alpha$ y $ER\beta$ 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. 5). 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 se unen 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 las modificaciones necesarias 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 E2 (Fig. 5). 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 ERE dentro de la región promotora. No obstante, distintos estudios han reportado inducción del tipo ER-E2 en genes en los cuales ninguna secuencia del tipo ERE ha sido descrita (Fig. 5), 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 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 E2 observado en hueso, mama, sistema vascular y en sistema nervioso, sugiriendo que los estrógenos podrían también producir respuestas del tipo no genómico (Fig. 5). 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 E2 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 controlan la expresión de estos genes en forma compleja y aún desconocida (Fig. 6). Precisamente, el *splicing* alternativo entre el exón codificante líder y el exón no codificante (transcripto a partir de los diferentes promotores) resultará en múltiples variantes de ARNm con distintas regiones 5'UTR (Ishii y col., 2010). De esta manera, los distintos ARNm generados pueden intervenir en la regulación de la vía estrogénica por estabilidad o procesamiento del ARNm (Kos y col. 2001). 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. 6), 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).

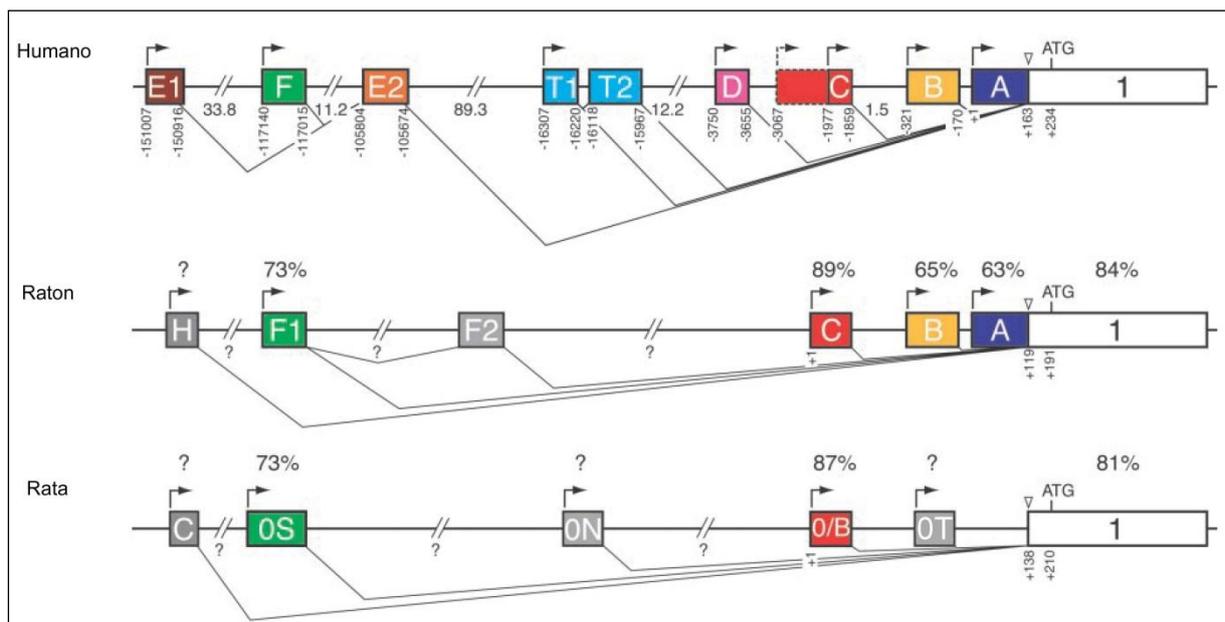


Figura 6 Comparación de las regiones promotoras del ER α humano, de ratón y de rata. Los exones conservados entre las distintas especies se muestran del mismo color, y la homología con la secuencia del ER α humano en forma de porcentaje de identidad se muestra sobre cada exón. Modificado de Kos y col., 2001.

El gen del ER α humano contiene al menos siete secuencias promotoras ubicadas corriente arriba capaces de iniciar la transcripción (Fig.6) (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 del ARNm de ER α incluyendo al núcleo supraóptico, 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 córtex temporal de humanos.

Los modelos animales basados en el uso del ratón han sido ampliamente utilizados para estudiar la regulación del ER α *in vivo*. Mediante el uso de técnicas de amplificación rápida de extremos de ADNc (*RACE*, del inglés **R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds), RT-PCR y secuenciación de ADN, se ha dilucidado que el gen del ER α murino (ubicado en el cromosoma 10) es una unidad de transcripción compleja con múltiples promotores activados de manera tejido-específica y asociada a procesos de *splicing* alternativo (Hirata, y col., 2003; Ishii y Sakuma, 2011). Como comentamos más arriba, el uso de los diversos promotores seguido de *splicing* alternativo contribuye a la diversidad de ARNm de un solo gen. Para el gen ER α de ratón (Fig. 7) se reconocen cinco promotores: A, B, C, F1, y H (Ishii y col., 2010). A la fecha se han reportado seis variantes 5'UTR del gen ER α murino: A-1, B-1, C-1, F1-1, F1-F2-1, y H-1 (donde 1 corresponde al exón líder o primer exón codificante, el cual a su vez también posee una región 5'UTR) que pueden ser traducidos a la misma proteína de 66 kDa (Kos y col., 2000). Como se puede observar en la figura

7, todas las variantes transcripcionales tendrán en común el exón 1 completo, esto es, su región 5'UTR (destacado en rojo) y su región codificante.

Tal como fue determinado por Kos y col., (Tabla 1) los niveles de expresión de las variantes A, B y F en el cerebro de ratón son muy bajos en tanto que el ARNm de la variante C fue encontrado como el más abundante. El ARNm de la variante H solo se encontró expresado en hígado (Kos y col., 2000).

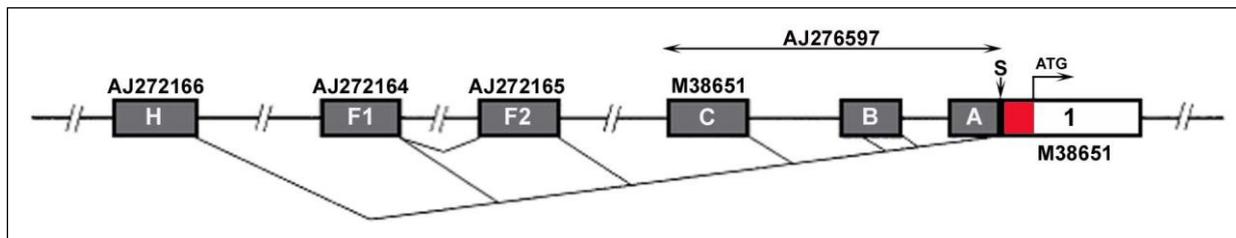


Figura 7 Región 5'UTR del ER α de ratón. Los exones no codificantes (A-H) se muestran como cajas sombreadas junto a los números de acceso de sus secuencias (EMBL) (las nuevas secuencias se muestran en negrita). S, sitio común aceptor de corte y empalme del ARNm. En rojo se destaca la región 5'UTR del exón codificante 1, común a todas las variantes transcripcionales (adaptado de Kos y col., 2000).

Tejido/variante	A	B	C	F1F2	H
Cerebro	+	+	49	+	-

Tabla 1 Presencia o ausencia del ARNm de las variantes del ER α en cerebro de ratón observadas tanto por RT-PCR como por ensayos de protección a la nucleasa S1: (-), no se detecta la variante de ARNm ni por RT-PCR ni por ensayo de protección a la nucleasa S1; (+), variante de ARNm observada sólo por RT-PCR; 49 indica la abundancia relativa (en porcentaje) de la variante C estimada por ensayos de protección a la nucleasa S1 (adaptado de Kos y col., 2000).

La región codificante del gen ER α de ratón (Fig. 8) está conformada por ocho exones (599 aminoácidos totales, *NCBI Reference Sequence*: NP_031982.1). La supresión de un exón o exones codificantes tendrá consecuencias para la actividad de la proteína modular ER α , que, como explicamos más arriba, se compone de varios dominios con funciones específicas. El exón 1 y una porción del exón 2 codifica el dominio de la función activadora 1 de la transcripción independiente de ligando (dominio A/B, extremo amino-terminal). Este dominio regula la transcripción de genes mediada por ER α mediante su interacción con cofactores de receptores

nucleares y proteínas del complejo de inicio de la transcripción. El resto del exón 2 y el exón 3 codifica una región involucrada en la dimerización y el dominio de unión de la proteína al ADN, interactuando con secuencias específicas de ADN (ERE) (dominio C). Una porción del exón 4 codifica para la región bisagra de la proteína y una señal de localización nuclear (dominio D). El resto del exón 4 y los exones 5, 6, 7 y 8 codifican para la otra porción del dominio de unión al ligando, un dominio de dimerización, sitios de reconocimiento de coactivadores y el segundo dominio con función activadora de la transcripción dependiente de ligando (AF-2) (dominio E). El dominio F (extremo carboxilo-terminal) codificado por la última porción hacia 3' del exón 8 está involucrado en la interacción proteína-proteína y en la dimerización (Lu y col., 1999; Shanle y Xu, 2010). Por lo tanto, los ARNm ER α con deleciones pueden impactar en la capacidad de la proteína ER α de unirse al ADN o ligando, para dimerizar, o para entrar en el núcleo, regulando las vías de señalización del ER α (Perlman y col., 2005).

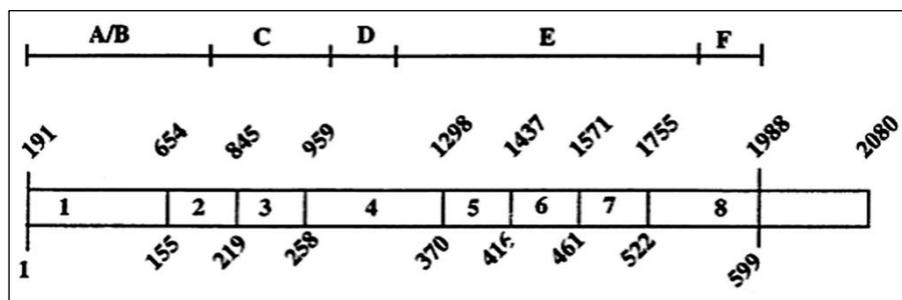


Figura 8 Diagrama de la región codificante del ER α murino y sus dominios proteicos (adaptado de Lu y col., 1999).

Los mecanismos de acción de los receptores de esteroides implican un repertorio tripartito, incluyendo los receptores, sus ligandos, y sus proteínas coreguladoras (Fig. 9) (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. 9) (Wu y col., 2005).

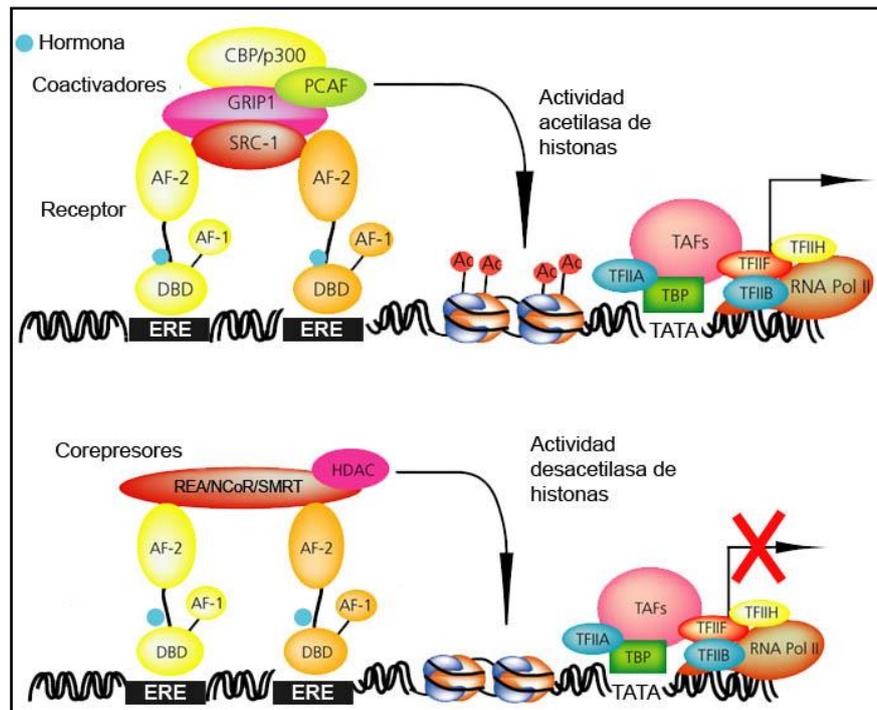


Figura 9 Reclutamiento de coactivadores y corepresores por el receptor nuclear. El complejo receptor-coactivador activa acetiltransferasas de histonas; de esta forma, las histonas acetiladas se disocian de la cromatina y permiten que el complejo transcripcional se una a las regiones reguladoras de los 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 esteroides 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 esteroides 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. 10), 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.

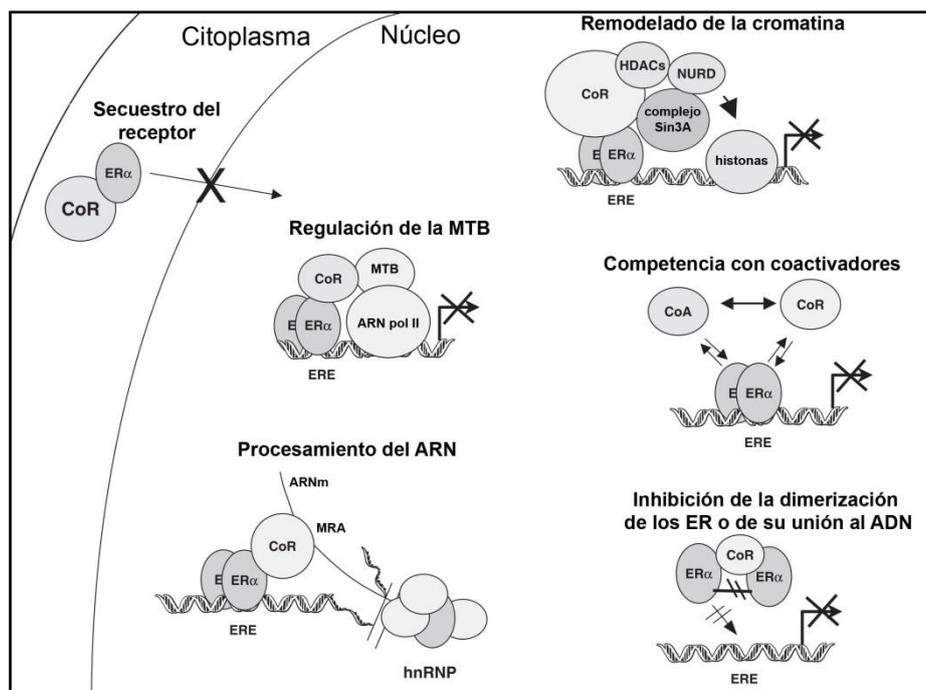


Figura 10 Mecanismos de acción de los corepresores de ER. Los mismos corepresores pueden potencialmente utilizar más de un mecanismo para llevar a cabo sus funciones. CoR, corepresor; CoA, coactivador; MRR, motivo de reconocimiento del ARN; MTB, maquinaria de transcripción basal; ARN pol II, ARN polimerasa 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).

1.2.3- Mecanismos de regulación epigenética

En los últimos años se ha prestado especial atención a los cambios de expresión que sufren los ER en el cerebro y particularmente a los mecanismos que la regulan. Como se comentó más arriba, el gen ER α se encuentra precedido por múltiples promotores que generan distintas isoformas de splicing alternativo que sólo difieren en su extremo 5' codificando para la misma proteína. Justamente estas diferencias que poseen las distintas isoformas en la región 5'UTR pueden proveer de áreas para modificaciones epigenéticas que a su vez pueden modular cambios en la expresión génica. Adicionalmente, es probable que los sitios regulatorios reconocidos por los factores de transcripción que controlan la expresión génica se encuentren localizados en estas regiones promotoras (Wilson y col., 2011).

La regulación de la expresión génica por mecanismos epigenéticos actualmente ocupa un objetivo muy importante dentro de la investigación, en la búsqueda de comprender los mecanismos de control génico neuronal. De hecho, se ha reportado que los diversos factores que modulan la formación de memorias, tales como el estrés, el abuso de drogas, la depresión y modificaciones en el medio ambiente, influyen el cerebro y la función cognitiva a través de mecanismos epigenéticos (Maze y Nestler, 2011; Hunter y col., 2009). En base a estos antecedentes, se sugiere que las alteraciones epigenéticas son críticas tanto para la formación de memoria como para la modulación de los estímulos del medio ambiente y la acción de las hormonas.

Una modificación epigenética de la cromatina involucra cambio de bases y proteínas asociadas (para revisión ver Wolffe y Matzke, 1999; Klose y Bird, 2006) en ausencia de cambios en la secuencia de ADN. Entre las modificaciones epigenéticas conocidas podemos resaltar la acetilación de histonas, metilación de las histonas y la metilación del ADN (Bird y Wolffe, 1999; Cooper y Krawczak, 1989).

El genoma está contenido en los cromosomas, los cuales se componen de una mezcla altamente organizada de ADN y proteínas histonas denominada cromatina. La estructura especializada de la cromatina asegura que las cadenas largas de ADN permanezcan empaquetadas y confinadas en el núcleo de una célula además de colaborar en los procesos de mitosis, meiosis y regulación de la expresión génica (Widom, 1998). Dos copias de cada histona componente del núcleo proteico (core) (H2A, H2B, H3 y H4) forman un octámero de histona envuelto por 147 pares de bases de ADN formando un nucleosoma, la unidad básica de construcción de la cromatina (Kornberg y Lorch, 1999). La cromatina en su estado relajado denominado *eucromatina*, está asociada con una transcripción génica activa. Los genes se encuentran silenciados cuando la cromatina se encuentra en un estado altamente condensado denominado *heterocromatina*. Las colas N-terminales de cada histona sobresalen desde los nucleosomas permitiendo modificaciones post-traduccionales para alterar la estructura de la cromatina y finalmente la expresión génica. Las modificaciones que pueden sufrir las histonas afectan la transcripción génica de dos maneras: (1) afectando las uniones electrostáticas entre el ADN y las histonas generando una cromatina laxa y de esta manera aumentando el acceso de la maquinaria transcripcional al ADN, y (2) por cambios en las interacciones histona-histona (Hansen y col.; Wolffe y Hayes, 1999), lo cual afecta el reensamble de la cromatina luego de la transcripción (Ye y col., 2005). Tales modificaciones incluyen la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación de las histonas. El impacto de las modificaciones posttraduccionales sobre la expresión génica depende tanto de la clase de modificación como de qué histona y residuos aminoacídicos son modificados. Debido a su localización en la estructura del nucleosoma, la histona H3 es la proteína que generalmente se modifica y la que recibió una mayor atención por su rol en el control epigenético de la expresión génica (Felsenfeld y Groudine, 2003). La fosforilación y acetilación de las histonas liberan el ADN de las histonas aumentando la transcripción génica (Grunstein, 1997; Lee y col., 1993). En el caso de la acetilación, la enzima histona acetiltransferasa (HAT) une covalentemente un grupo acetilo (cargado negativamente) a la cola de la histona, generando repulsión de los fosfatos (cargados negativamente) de la molécula del ADN. En este estado, la acetilación permite al ADN separarse de los nucleosomas y ser accesible para la maquinaria transcripcional. La eliminación del

grupo acetilo por una enzima histona deacetilasa (HDAC) restaura la estructura del nucleosoma (Kuo y Allis, 1998).

Un cuerpo creciente de evidencia sugiere que el incremento de la acetilación de las histonas H3 y H4 mejora la formación de varios tipos de memorias en el hipocampo (Stefanko y col., 2009; Haettig y col., 2011). Estudios realizados en ratones con mutaciones de enzimas HAT demostraron un deterioro sustancial en la memoria hipocampal y plasticidad sináptica (Maurice y col., 2008; Duclot y col., 2010).

Además de las modificaciones a las histonas, la metilación del ADN posee un profundo impacto epigenético. Este proceso actúa como una marca epigenética estable y heredable que es crítica para procesos celulares normales, incluyendo la regulación tisular, expresión genética durante el desarrollo y la reparación del ADN. Cabe destacar que los factores ambientales, incluyendo las hormonas, tienen la capacidad de alterar los patrones epigenéticos antes señalados (Fu y col., 2004). La unión covalente de un grupo metilo a un residuo de citosina en dinucleótidos CpG (denominado sitio CpG) es realizada por la enzima ADN metiltransferasa (DNMT). Los sitios CpG están comúnmente metilados a través de todo el genoma, sin embargo, normalmente no están metilados en las llamadas islas CpG, las cuales son regiones que contienen grandes cantidades de CpG en la región regulatoria 5', o promotora, de un gen (Illingworth y col., 2008). Pequeños cambios en los niveles de metilación en determinados sitios CpG en el promotor de un gen pueden tener un efecto significativo sobre la expresión génica. La metilación de los residuos de citosina es permanente, irreversible, y resultará en la represión transcripcional. El proceso de metilación del ADN impacta en la expresión génica y la estructura de la cromatina de varias maneras. Principalmente, las citosinas metiladas pueden ser usadas como sitios de acoplamiento para proteínas de unión a metilos las cuales luego reclutan complejos remodeladores de cromatina, conteniendo enzimas HDAC, resultando en el condensamiento de la estructura de la cromatina. Esto puede bloquear el acceso de la maquinaria transcripcional a los sitios de unión en el promotor de un gen (Tate y col., 1993). En genes con múltiples promotores, la metilación del ADN puede dictar la utilización de los mismos (Sasaki y col., 2001).

Se ha publicado que puede existir una relación entre la administración de E2 y el incremento de la expresión del ARNm de enzimas DNMT en el hipocampo dorsal,

sugiriendo que los eventos de metilación de ADN pueden jugar un rol importante en los efectos beneficiosos sobre la memoria inducidos por E2 (Zhao y col., 2010).

La literatura señala que la metilación del promotor del ER α de rata es importante para la regulación de la expresión génica de ER α en el cerebro. Por ejemplo, Champagne y col. indicaron que dicho promotor presentaba distintos grados de metilación en función de la atención materna en la infancia temprana (Champagne y col., 2006). Adicionalmente, estudios recientes que demuestran la regulación epigenética de ER α en tejidos periféricos de mamíferos, sugieren que la metilación del promotor de ER α puede ser un mecanismo potencial para la regulación de la expresión del ARNm de ER α en el cerebro del ratón en desarrollo (Westberry y col., 2010).

1.2.4- Influencia de los estrógenos sobre las funciones neuronales

Los receptores intracelulares de estrógenos se encuentran en amígdala, hipocampo, cíngulos, locus ceruleus, núcleos del rafe mediano y materia gris central. En el hipotálamo y la amígdala estos receptores se encuentran en mayor proporción (Toran-Allerand y col., 1992). Se ha demostrado que las neuronas piramidales hipocámpales de la rata adulta expresan ARNm para las dos isoformas del ER, α y β (Shughrue y col., 1997). Los estrógenos pueden mediar sus efectos sobre la función del hipocampo a través de la isoforma nuclear ER α . Sin embargo, existe evidencia ultraestructural que indica que los estrógenos también pueden ejercer alguno de sus efectos a través de mecanismos extranucleares, posiblemente por unión al ER α localizado en la membrana plasmática (Milner y col., 2001). Mediante el uso de inmunohistoquímica se puede constatar que los ER α aparecen en interneuronas regulatorias (neuronas que modulan los bucles de conexión, pero sin pertenecer a ellos), más que en neuronas piramidales o granulares. Estas interneuronas inmunoreactivas para el ER α están localizadas principalmente en la zona subgranular del GD y en el *stratum radiatum* de la región CA1 (Weiland y col., 1997). Los estrógenos y numerosos factores de crecimiento, incluyendo las neurotrofinas, están asociados con la diferenciación y supervivencia neuronal. Son importantes durante el desarrollo del cerebro y ejercen influencia sobre la maduración de

sistemas neurales promoviendo la formación de espinas dendríticas y nuevas sinapsis (McAllister y col., 1995). Poseen efectos sobre la fisiología y plasticidad neuronal tanto hipotalámica como hipocámpica y promueven el desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los estrógenos afectan el desarrollo del hipocampo no están todavía bien elucidados (Solum y Handa, 2002).

Estudios morfológicos han mostrado que los estrógenos aumentan la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del hipocampo de la rata hembra (Halbreich, 1997). Además, existe abundante evidencia de que estas hormonas poseen un efecto directo sobre la función y el crecimiento neuronal. Al cultivar “*in vitro*” células nerviosas en presencia de estrógenos, se observó un incremento tanto del crecimiento como de la viabilidad de las dendritas (Toran-Allerand y col., 1988). Esta acción neurotrófica de los estrógenos se ha reproducido en experimentos con animales *in vivo*. Después de la ooforectomía (extirpación de folículos ováricos) hay una involución de la región CA1 del hipocampo, región relacionada con el aprendizaje y la memoria. La arquitectura neuronal y la densidad sináptica se reestablece cuando se hace el reemplazo estrogénico (Barlow, 2003). En ratas adultas se ha observado una disfunción de tareas de memoria y aprendizaje 28 semanas después de la ooforectomía. Esta disfunción se relaciona con una disminución de la actividad neural colinérgica en la corteza frontal y el hipocampo, lográndose revertir con el reemplazo estrogénico. En el cerebro animal envejecido y en el humano, se ha visto que la atrofia neuronal se presenta principalmente en regiones colinérgicas como los núcleos de la base del cerebro, el hipocampo y la amígdala, las cuales son más sensibles a la pérdida neuronal relacionada con demencias, como la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Birge, 1997). Un posible mecanismo por el cual los estrógenos pueden atenuar el daño neuronal durante el desarrollo de la EA se relaciona con su efecto sobre el metabolismo de la proteína precursora de amiloide (*APP*, del inglés **A**myloid **P**recursor **P**rotein). El depósito de β amiloide en el parénquima cerebral es una característica distintiva de la neuropatología de la EA, pero también ocurre en grado menor en el envejecimiento. En un sistema de cultivo de células de carcinoma de mama humano (provisto de receptores estrogénicos), el E2 en concentraciones fisiológicas aumenta el metabolismo secretor del fragmento soluble de la APP sin incrementar los niveles

intracelulares. Por lo tanto los estrógenos podrían modificar benéficamente el proceso de la APP reduciendo la acumulación de fragmentos neurotóxicos de β -amiloide (Jaffe y col., 1994).

El peso del cerebro disminuye entre la quinta y sexta década de edad en mujeres y en la sexta o séptima década en el hombre. Mujeres postmenopáusicas sanas experimentan una mayor atrofia y pérdida de volumen del hipocampo y del lóbulo parietal comparado con hombres de la misma edad (Fleisher y col., 2005). En las mujeres, los niveles de estrógenos disminuyen abruptamente durante la menopausia, lo que contribuye a un deterioro cognitivo observado en la vejez normal y durante el transcurso de la EA. Esta reducción de los niveles de estrógenos compromete las funciones neuronales, la supervivencia neuronal y la sinaptogénesis, reforzando la evidencia de que la terapia hormonal de reemplazo (THR) puede disminuir el deterioro cognitivo y retrasar el comienzo de la EA (Simpkins y col., 1997; Wise y col., 2001). También, las mujeres presentan una disminución relacionada con la edad en el metabolismo de la glucosa en la región del hipocampo. En la ausencia de estrógenos, la glucopenia (hipoglucemia) es tóxica para las células cerebrales siendo las neuronas piramidales del hipocampo muy sensibles a este fenómeno. Recordemos que el transporte de la glucosa hacia el interior de las neuronas es un proceso sensible a los estrógenos circulantes, por lo tanto se podría especular que la disminución en el metabolismo de la glucosa en el hipocampo puede estar relacionado con la disminución de los niveles de estrógenos de la menopausia y contribuir, de esta manera, a la pérdida acelerada de neuronas en esta región (Aisen y col., 2003). Si este fuera el caso, sería otro mecanismo que amplía el concepto de que el reemplazo hormonal estrogénico puede contribuir al mejoramiento de la función cerebral, especialmente en áreas relacionadas con la función cognitiva.

Se ha observado que la expresión de neurotrofinas y sus receptores se encuentra regulada por estrógenos (Jeziarski y Sohrabji, 2000). Esta regulación podría explicar la influencia de los estrógenos sobre las funciones cognitivas y sus alteraciones.

1.2.5- Estrógenos y neurogénesis en estructuras hipocampales

En los mamíferos, el hombre inclusive, la neurogénesis (una manifestación de neuroplasticidad) ocurre a lo largo de toda la vida (Gonzalez-Perez, 2012). Las células precursoras neurales (CPN), localizadas en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado, proliferan y se integran en circuitos hipocámpicos y podrían estar involucradas en ciertas formas de aprendizaje dependiente del hipocampo (Shors y col., 2002; Lee y col., 2012).

Los estrógenos han sido descritos como reguladores de la plasticidad sináptica, funciones cognitivas, memoria, humor y comportamiento (McEwen y col., 2012); sin embargo, su rol en el control de la proliferación y diferenciación neuronal y glial todavía no está completamente dilucidado. Trabajos recientes han reportado que el E2 es capaz de inducir la producción celular en la formación hipocámpal del adulto (Perez-Martin y col., 2005; Tanapat y col., 2005). Una sola dosis de E2 (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 E2 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; Licht y col., 2011).

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 (Solum y Handa, 2002; Nurjono y col., 2012). Se ha demostrado que

esta molécula es capaz de regular sistemas de neurotransmisión, modular la transmisión sináptica y promover la sinaptogénesis (Nurjono y col., 2012). 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 (Artegiani y Calegari, 2012). 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 (Eriksson y col., 1998; Porter, 2008). 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).

1.3- Neurotrofinas

Las neurotrofinas, también llamadas factores neurotróficos, constituyen una familia de factores de crecimiento que pueden actuar en forma endocrina, paracrina y autocrina uniéndose a receptores de células neuronales o gliales para estimular su supervivencia, crecimiento o diferenciación. Los factores neurotróficos secretados impiden a las neuronas iniciar la muerte celular programada (apoptosis), permitiendo así que las neuronas sobrevivan. Las neurotrofinas también inducen la diferenciación de células progenitoras neurales para formar neuronas maduras post-mitóticas (Thoenen, 1995; Huang y Reichardt, 2001).

La familia de las neurotrofinas está formada por el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés, *Nerve Growth Factor*), el BDNF, la neurotrofina-1 (NT-1), la

neurotrofina-3 (NT-3), y la neurotrofina-4 (NT-4). El BDNF es una neurotrofina importante involucrada en la plasticidad sináptica y la neuroprotección, cuya expresión se encuentra regulada por los estrógenos (McAllister y col., 1999; Solum y Handa, 2002).

1.3.1- El Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)

Esta neurotrofina juega un rol muy importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas. Además está involucrada en la regulación del crecimiento de los axones y dendritas de las células nerviosas por lo que ha sido implicado en mecanismos de plasticidad neuronal en el adulto, incluyendo el aprendizaje y la memoria. Existen muchas evidencias que sugieren que el BDNF es importante para la consolidación de sinapsis dependiente de la actividad neuronal, mecanismo conocido como potenciación a largo plazo (LTP, del inglés **Long-Term Potentiation**). Este mecanismo constituye uno de los principales procesos que permiten la existencia de memorias a largo plazo, produciendo una mejora persistente en la comunicación sináptica entre dos neuronas que se estimulan simultáneamente (Messaoudi y col., 2002).

El ARNm del BDNF está presente en numerosas estructuras cerebrales con una alta expresión en las neuronas granulares del GD y en las neuronas piramidales de la región CA3 y CA2 del hipocampo (Ernfors y col., 1990). Como se comentó anteriormente, tanto en el hipocampo como en el córtex los estrógenos poseen acciones moduladoras directas e indirectas sobre ciertos sistemas de neurotransmisión, regulando la sinaptogénesis y produciendo efectos neuroprotectivos. Al igual que los estrógenos, el BDNF es capaz de regular sistemas de neurotransmisión, modular la transmisión sináptica y promover la sinaptogénesis (Bucinskaite y col., 1996; MacAllister, 1999). De hecho, los estrógenos tienen la capacidad de regular la expresión del BDNF durante el desarrollo embrionario del hipocampo y durante la vida adulta en la rata, lo que lo convierte en un factor estrógeno sensible. Este descubrimiento provee información útil a la hora de comprender los mecanismos a través de los cuales las hormonas esteroides influyen

sobre el desarrollo de las neuronas (Solum y Handa, 2002; Haraguchi y col. 2012; Kiss y col. 2012).

La estructura del gen que codifica para el BDNF es compleja, ya que contiene múltiples promotores que son usados para generar diferentes transcritos con distintos exones no codificantes en su región 5'. Dichos exones son cortados y empalmados alternativamente (splicing) con un exón codificante común. Estos distintos sets de promotores son usados para lograr un control temporal y espacial preciso de la producción de BDNF en las distintas regiones del SNC (Martinowich y col., 2003).

1.3.2- Estructura del gen del BDNF

El gen del BDNF murino contiene cinco exones no codificantes (Liu y col., 2006), nombrados Exón I al Exón V (EI al EV), corriente arriba del exón codificante, llamado exón VI (Fig. 11). Los exones I-V pueden cortarse y empalmarse alternativamente con el exón VI, formando transcritos con regiones 5' no codificantes diferentes. Cada uno de estos exones no codificantes poseen una región promotora única corriente arriba de su sitio de inicio de transcripción, denominados promotores P1-5, los cuales tienen la capacidad de promover la expresión de la correspondiente variante transcripcional.

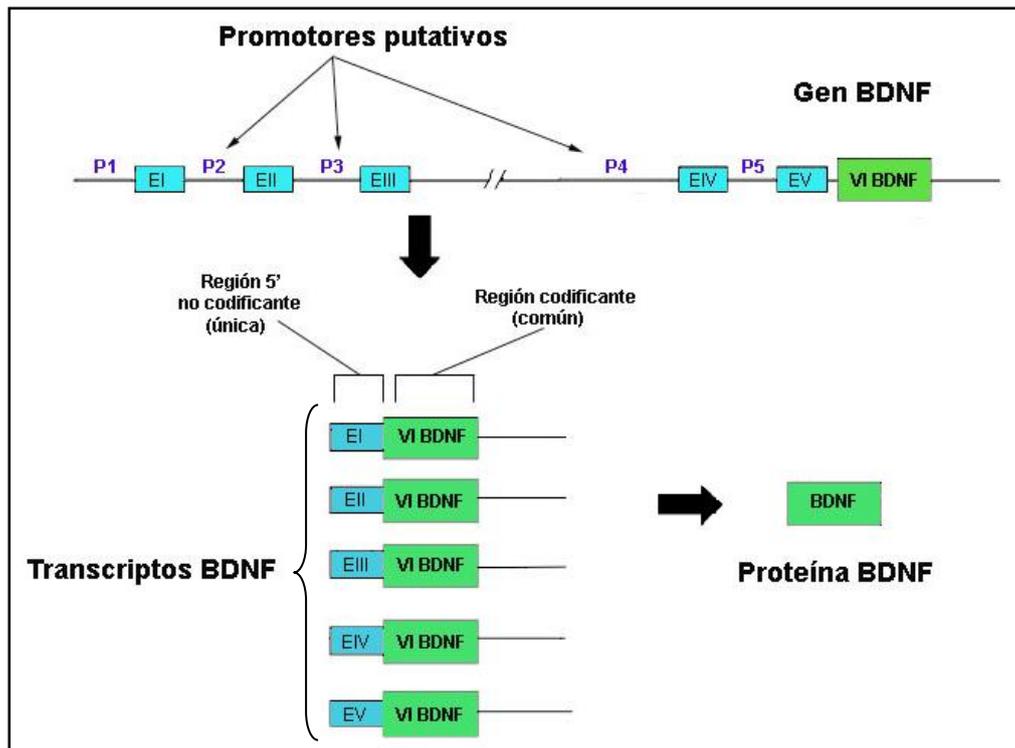


Figura 11 Estructura del gen del BDNF de ratón. (P1-5), promotores; (E I-V), exones no codificantes; (VI BDNF), exón codificante. Los promotores de los exones no codificantes controlan la transcripción del gen del BDNF para dar lugar a una variedad de transcritos de corte alternativo que culminan en la traducción de la misma proteína.

Algunos de los efectos neurotróficos de los estrógenos pueden deberse al incremento de la transcripción del gen BDNF. Si bien el mecanismo usado por esta hormona en la regulación de la expresión de BDNF es aún desconocido se ha descrito un ERE no palindrómico ubicado en el inicio del exón VI, sin embargo su funcionalidad *in vivo* aún no ha sido demostrada (Berchtold y col., 2001). Además de su posible regulación directa, se han postulado muchos mecanismos de regulación indirecta de los estrógenos sobre el gen de BDNF. Se ha observado que los efectos facilitadores de los estrógenos sobre la adquisición de memorias espaciales pueden estar mediados por la regulación positiva de la expresión y la fosforilación de la proteína CREB (del inglés *Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) Response Element – Binding protein*) (Zhou y col., 2005). Teniendo en cuenta que en el promotor del exón IV del gen de BDNF murino existe un elemento de respuesta a AMP cíclico (sitio CRE), es posible que esta neurotrofina sea el intermediario responsable de la acción estrogénica. Además de este sitio CRE, el promotor IV

presenta otros tres sitios regulatorios ubicados todos ellos en la región -170 a +1pb, tomando como +1 el sitio de inicio de transcripción del exón IV (Fig. 12):

- El **elemento de respuesta a Calcio 1** (CaRE 1, del inglés **Ca²⁺-Responsive Elements 1**). CaRE 1: **5'-CTATTT**CGAG**-3'**, localizado entre -72 pb y -63 pb;
- Un **sitio de union corriente arriba para Factores Estimulatorios** (UFS, del inglés **Upstream stimulatory Factor-binding Site**). E-box: **5'-ATCATAT**GAC**-3'**, localizado entre -51 pb y -42 pb;
- Un sitio de **metilación dependiente de despolarización** (DMS, del inglés **Depolarization-dependent Methylation Site**), ubicado entre las bases -111 y -109.

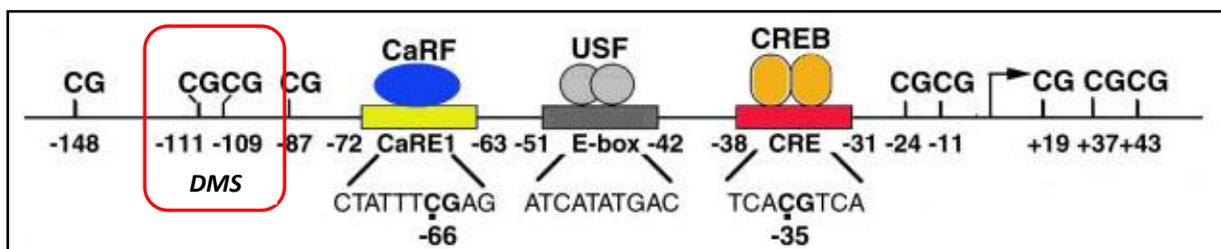


Figura 12 Representación esquemática de los elementos regulatorios en el promotor del exón IV de ratón que son importantes para la transcripción dependiente de la actividad neuronal. (Adaptado de Martinowich y col., 2003).

1.3.3- Regulación epigenética de la expresión de BDNF por metilación del ADN

La regulación epigenética de la expresión de los genes a través de la metilación/demetilación de ADN y modificación de histonas demostró ser un mecanismo crucial para el desarrollo y la función del sistema nervioso. Estos procesos abarcan desde la diferenciación celular a la plasticidad neuronal, desde el aprendizaje y la memoria a la conducta (Feng y col., 2007). Los mecanismos epigenéticos han demostrado modular el gen del BDNF. Por ejemplo, la

transcripción a partir del promotor IV puede suprimirse por la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2), que pertenece a una familia de proteínas de unión a metilcitosina y contribuye al efecto de silenciamiento de genes en los procesos de metilación del ADN (Chao y Zoghbi, 2009). En ausencia de estimulación, MeCP2 ocupa un sitio en el promotor de BDNF que reprime la transcripción de BDNF (Martinowich y col., 2003). La despolarización neuronal disocia a MeCP2 del promotor de BDNF resultando en su demetilación (Chen y col., 2003). La actividad neuronal es un importante regulador epigenético del gen BDNF, de tal manera que el comportamiento de tipo depresivo en ratones resulta en la metilación de la histona H3 y supresión de la transcripción a través de los promotores IV y VI del BDNF en el hipocampo (Tsankova y col., 2006). El uso de un modelo roedor de maltrato infantil demostró que la falta de cuidado maternal induce un déficit en la expresión de BDNF mediado por un aumento de la metilación de sus promotores. Dichos niveles de metilación se conservaron a lo largo de la vida y a través de las generaciones (Roth y col., 2009).

1.4- Terapia hormonal de reemplazo y neuroprotección

Como reflejo de las mejoras en las condiciones sociales y sanitarias, la población de ancianos crece rápidamente, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, aumentando consecuentemente patologías frecuentes de la edad avanzada, como la EA.

La deficiencia de estrógenos en la mitad de la vida ha sido postulada como la causa, al menos en parte, de la mayor incidencia de EA en mujeres, comparada con los hombres constituyendo un factor de riesgo para el padecimiento de la EA (Paganini-Hill y Henderson, 1996).

En la última década se han realizado estudios que muestran que, las THR, brindan efectos neuroprotectores en mujeres post-menopáusicas disminuyendo el riesgo de padecer la EA o las pérdidas de sus capacidades mnemónicas (Henderson, 1997; Baldereschi y col., 1998). Además, se han observado efectos beneficiosos de las THR en mujeres jóvenes y ancianas sobre la memoria verbal y el aprendizaje asociativo, produciendo además una reducción en la declinación en las capacidades

mnemónicas asociadas a la edad cronológica (Phillips y Sherwin, 1992; Duff y Hampson, 2000).

1.4.1.- El Estudio sobre la Memoria del Programa de Promoción de la Salud de la Mujer (WHIMS)

Durante los años 2003 y 2004 se publicaron varios trabajos pertenecientes al Estudio sobre la Memoria del Programa de Promoción de la Salud de la Mujer (WHIMS, del inglés **Women's Health Initiative Memory Study**) de Estados Unidos. WHIMS fue llevado a cabo para evaluar si la THR en mujeres adultas puede disminuir el riesgo de demencia (Craig y col., 2005).

Se estudiaron 7.510 mujeres por encima de los 65 años. Debido a que los estrógenos sin combinar están asociados a hiperplasia endometrial y está comúnmente contraindicado en mujeres con útero intacto, las participantes fueron aleatorizadas acorde a su status uterino. Se seleccionaron al azar 4.532 mujeres con útero intacto y se les administraron estrógenos combinados (0,625 mg de *estrógenos equinos conjugados* (EEC) junto a 2,5 mg de *acetato de medroxiprogesterona* (AMP) por día) de forma continua, o placebo (pastilla sin hormona). También se seleccionaron al azar 2.947 mujeres con una histerectomía previa para administrarles estrógenos sin combinar (0,625 mg de ECC) de forma continua, o placebo. Los EEC fueron elegidos debido al frecuente uso clínico que se hacía de este fármaco en las THR al momento en que se diseñó el estudio. Se incluyeron mujeres ancianas debido a que era necesario contar con un número suficiente de personas con alto riesgo en el padecimiento de demencias y poder así evaluar los efectos del tratamiento sobre la prevención de este tipo de enfermedades neurodegenerativas (Espeland y col., 2004; Maki, 2004; Craig y col. 2005).

WHIMS, programado para 9 años de seguimiento, terminó prematuramente. El grupo de EEC más AMP del estudio se terminó antes, después de aproximadamente 5 años, porque el seguimiento registró un *aumento del riesgo* de demencia en este grupo de mujeres y ningún beneficio para el trastorno cognitivo leve o cognitivo global. A 40 de 2.229 mujeres (1,8%) en el grupo con tratamiento combinado y 21 de 2.303 mujeres (0,9%) del grupo placebo se les diagnosticó demencia, de manera

que la proporción de mujeres con demencia en el grupo con tratamiento combinado fue el doble respecto al grupo placebo. Además, en el año 2004, el grupo de tratamiento con EEC fue también suspendido después de aproximadamente 7 años de seguimiento. En este caso la suspensión se debió a que las mujeres pertenecientes al estudio que ya habían sido diagnosticadas con EA, *no mostraron* efectos clínicos o cognitivos benéficos pero, por el contrario, mostraron evidencias significativas de un efecto deletéreo en la función cognitiva (Fig. 13). Estos resultados fueron suficientes para informar a la práctica clínica que el uso de EEC para mujeres con EA, al menos en dosis de 0.625 mg por día o mayores, eran inefectivas, o posiblemente dañinas, y por lo tanto contraindicadas.

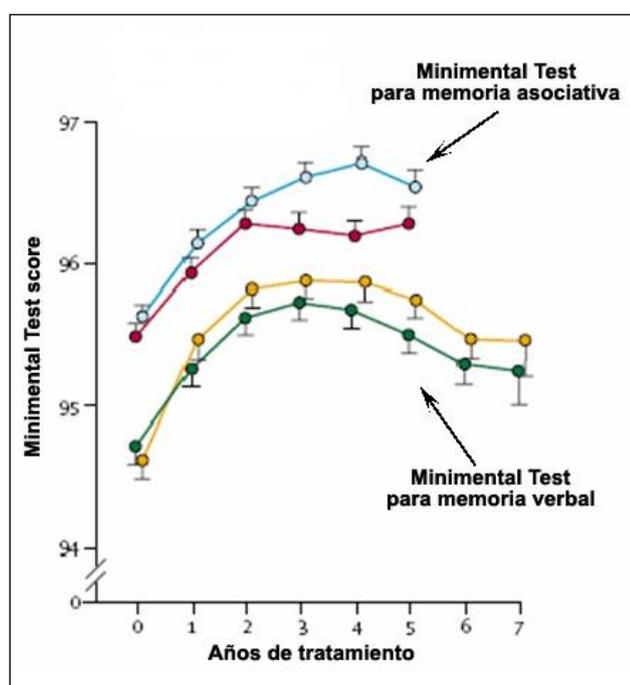


Figura 13 Resultados obtenidos en los estudios de memoria verbal y asociativa (Minimental Test) para los grupos correspondientes a mujeres tratadas con placebo o con EEC. Obsérvese como en ambos estudios se obtuvo un puntaje menor en las mujeres tratadas con EEC (● y ●) respecto a las que recibieron placebo (○ y ○) (adaptado de Craig y col., 2005).

Estos sorprendentes resultados del estudio WHIMS describen no sólo la *falta* de efecto neuroprotector de las THR sobre el padecimiento de demencias o declinación cognitiva sino que dichas terapias *augmentaban* el riesgo de padecerlas (Sherman y

col., 2003; Espeland y col., 2004; Shumaker y col., 2004). Estos estudios han puesto en duda el paradigma clásico de los efectos neuroprotectores de las THR sobre la prevención del Alzheimer y la declinación cognitiva asociada a la edad y no apoyan el uso de la THR para reducir el riesgo de EA en mujeres por encima de los 65 años de edad.

Para poder comenzar a explicar estas discordancias entre los diferentes estudios clínicos se ha postulado la hipótesis que indica que los estudios que presentan resultados negativos fueron realizados en forma aleatoria, es decir que los sujetos elegidos para la prueba presentaban un grado elevado de aleatoriedad en cuanto a su origen social, tiempo desde el comienzo de la menopausia hasta el inicio de la THR, número de embarazos y lactancias, nivel educativo, entre otros, mientras que los estudios que presentan resultados positivos fueron observacionales y realizados a partir de sujetos que habían sido previamente seleccionados para una THR por sus condiciones clínicas, culturales, económicas, etc (Rapp y col., 2003; Maki, 2004; Craig y col., 2005). De este modo es posible que los estudios positivos presenten tendencias (*bias*) debido a la falta de aleatoriedad en la selección de los sujetos. Esta interpretación ha puesto en marcha un nuevo programa de investigación que posee 2 ejes fundamentales:

- 1) La necesidad de conocer el efecto de variables asociadas a las características endocrino-reproductivas de los sujetos sobre el éxito o fracaso de las THR. Por ejemplo es imprescindible realizar estudios que permitan establecer si la edad de comienzo de la menopausia, el tiempo que transcurrió entre la menopausia y el inicio de la THR, el número de embarazos, etc. influyen o modulan la acción neuroprotectora de las THR.
- 2) El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares básicos de la acción de las hormonas sobre diversas áreas del cerebro involucradas en funciones cognitivas y mnemónicas.

1.4.2- Hipótesis del período crítico

Los intentos de reconciliar los resultados inesperados de WHIMS con los resultados de investigaciones anteriores se han centrado en las discrepancias metodológicas entre los estudios, incluyendo las formas de hormonas utilizadas, de regímenes, y vías de administración. Además, se ha centrado mucha atención en la importancia de la sincronización de inicio de la THR. En contraste con la mayoría de los otros estudios clínicos, la THR en WHIMS fue administrada a mujeres de 65 años o más (promedio de 73 años), que es un promedio de más de dos décadas después de que los niveles de hormonas ováricas se han reducido en la menopausia.

La hipótesis del período crítico, que propone que *“los beneficios cognitivos de los estrógenos sólo pueden ser evidentes si se administran cerca del momento de la menopausia”*, está siendo investigada como una posible explicación de los resultados discrepantes entre los estudios (Frick, 2012; Scott y col., 2012). Por otra parte, el *“sesgo por célula saludable”* de acción de los estrógenos propone que los estrógenos proporcionan neuroprotección cuando la exposición tiene lugar antes de que la neurodegeneración se presente (Brinton, 2008). Sin embargo, si la exposición se lleva a cabo después del proceso de neurodegeneración la THR resulta perjudicial para las neuronas. Existen pruebas que apoyan la hipótesis del período crítico en los efectos del estrógeno sobre la cognición en mujeres. La THR iniciada durante o después de la menopausia pronto ejerce efectos positivos sobre la función cognitiva en las mujeres, mientras que después de la iniciación del tratamiento no se asoció con efectos o deterioro (MacLennan y col., 2006; Scott y col., 2012). Además, hay pruebas preliminares que sugieren que una exposición transitoria a una THR cerca del momento de la menopausia puede generar beneficios a largo plazo sobre la cognición (Smith y col., 2011). Los estrógenos administrados 10 semanas después de la ovariectomía fueron menos efectivos en aumentar la densidad de espinas hipocampales CA1 en comparación con el E2 administrado inmediatamente después de la ovariectomía (McLaughlin y col., 2008), por lo tanto el momento de la administración de E2 es un importante factor en la determinación de su eficacia. Estos resultados proporcionan apoyo a la hipótesis del período crítico con respecto a la capacidad de los estrógenos de afectar la estructura del hipocampo.

Otro experimento determinó si el tratamiento con E2 en ratas OVX de mediana edad se ve afectado por la edad en la cual en que se inicia, la duración de la exposición y de manera importante, por el tiempo de deprivación hormonal transcurrido antes de

la administración (Daniel y col., 2006; Daniel, 2013). Los resultados indicaron que la administración crónica de E2 fue eficaz para mejorar los déficits inducidos por la ovariectomía sobre la memoria de trabajo cuando se inició inmediatamente después de la ovariectomía, pero no cuando se inició después de un período de 5 meses de privación hormonal. Curiosamente, factores tales como la duración del tratamiento y la edad a la que los animales fueron OVX no influyeron en la eficacia del tratamiento con E2. Estos resultados proporcionan apoyo para la hipótesis del período crítico e indican que la capacidad de tratamiento con estrógenos para afectar el comportamiento dependiente del hipocampo es atenuada luego de una privación hormonal ovárica de largo plazo.

1.5- Actividad transcripcional de la vía estrogénica hipocampal durante el envejecimiento del ratón

1.5.1- Niveles de estrógenos durante el envejecimiento y deterioro cognitivo

En las mujeres, la menopausia es una consecuencia inevitable del envejecimiento, y esta transición se produce, en promedio, alrededor de los 51 años. La menopausia es un proceso gradual de cambio (típicamente en el transcurso de 2-7 años) que resulta en el cese de la menstruación, reducciones profundas en los niveles de hormonas ováricas e insuficiencia ovárica irreversible (Bellantoni y col., 1996). El impacto de la menopausia, y la pérdida de las hormonas ováricas sobre la memoria ha sido objeto de una importante cantidad de estudios. Numerosos informes han vinculado la menopausia con la pérdida de memoria, en particular los estudios de mujeres quirúrgicamente menopáusicas, la mayoría de los cuales experimentan un deterioro significativo de la memoria verbal después de la eliminación de los ovarios (Sherwin, 2006; Sherwin y Henry, 2008). Entre las mujeres con menopausia natural, aquellas que poseen bajos niveles de estrógenos endógenos muestran una memoria verbal empeorada y un mayor riesgo de adquirir deterioro cognitivo en relación con aquellas que poseen altos niveles de estrógeno (Wolf y Kirschbaum, 2002; Yaffe y col., 2000). Según se informa, las mujeres también tienen un mayor riesgo de desarrollar la EA en relación con los hombres (Launer y col., 1999; Yaffe y col.,

1998; Zandi y col., 2002), lo que sugiere que los estrógenos y/o deficiencia de progesterona durante la mediana edad puede ser un factor crítico en el desarrollo de la demencia.

Debido a que el hipocampo depende de factores tróficos hormonales tales como los estrógenos durante la edad adulta (Brinton, 2001), la deficiencia de estrógenos durante la menopausia puede hacer que estas neuronas sean más vulnerables al deterioro y exacerbar déficits de memoria emergentes relacionados con la edad. Los estudios en roedores apoyan esta hipótesis. Con respecto al envejecimiento reproductivo, hay varias diferencias clave entre roedores y humanos. Por ejemplo, a diferencia de las mujeres, donde la menopausia conduce a una pérdida total de folículos primordiales (Richardson y col., 1987), las ratas y los ratones no experimentan pérdida completa de folículos (Lu y col., 1979; Wise, 2000). Además, mientras que los efectos de retroalimentación negativa de E2 sobre las gonadotropinas están disminuidos en mujeres menopáusicas, lo que conduce a niveles elevados de gonadotropina (Crowley y col., 1985; Yen, 1999), tal retroalimentación permanece intacta en ratas pseudopreñadas acíclicas viejas, lo que conduce a niveles de gonadotropina relativamente normales (Lu, 1983; Wise, 2000). Sin embargo, la senescencia reproductiva en roedores (estropausia) es similar a la menopausia en varios aspectos críticos, incluyendo alteraciones similares en la liberación pulsátil de LH y en el pico de LH, la variabilidad de la duración del ciclo antes de la aciclicidad, y el cese definitivo de la ciclicidad hormonal (LeFevre y McClintock, 1988; Nelson y col., 1995). Además, el inicio del declive reproductivo tanto en roedores de mediana edad como en seres humanos se caracteriza por el aumento de los niveles circulantes de FSH y E2 (Lu, 1983). Seguidamente, los niveles circulantes de E2 disminuyen en mujeres y ratones (Fig. 14, Conn, 2006; Nelson y col., 1995), aunque tienden a permanecer elevados en ratas de mediana edad durante bastante tiempo (Morrison y col., 2006). En promedio, las alteraciones reproductivas en diferentes cepas de ratones comienzan a los 13-14 meses de edad (Nelson y col., 1995); a los 17 meses, aproximadamente el 80% de los ratones hembra tienen ciclos irregulares o son acíclicos, y en general se vuelven acíclicos a los 25 meses (Frick y col., 2000). A pesar de las diferencias entre humanos y roedores arriba mencionadas, las consideraciones prácticas, incluyendo su pequeño tamaño y corta vida, hacen de los roedores un importante modelo con el cual evaluar

los efectos de la pérdida de E2 y la acción de los E2 exógenos sobre la pérdida de memoria relacionada con la edad (Frick, 2009).

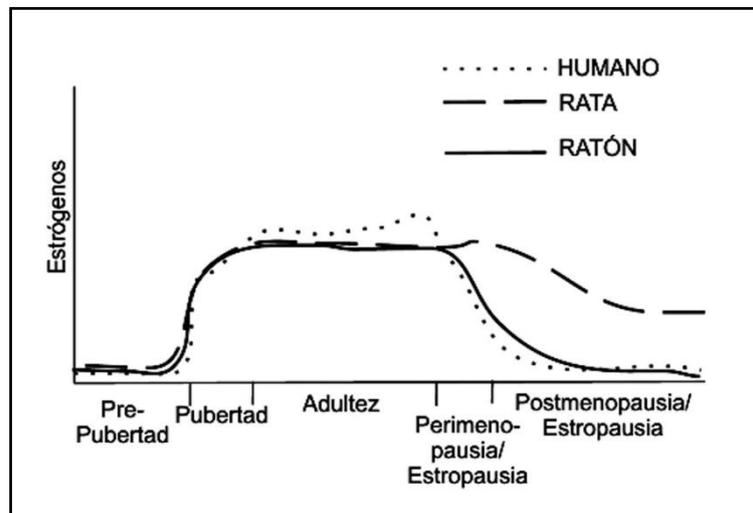


Figura 14 Liberación de E2 a lo largo de la vida en humanos, ratas y ratones. En estas especies la concentración de estrógenos se incrementa durante la pubertad y llegan a su pico durante la adultez. Hacia la madurez de la vida la disminución de los niveles de estrógenos es abrupta en humanos y ratones mientras que en ratas la estropausia está caracterizada por tener niveles altos de estrógenos y un estrógeno persistente en la citología vaginal (adaptado de Conn, 2006).

Ciertas regiones del cerebro, tales como el hipocampo, el cerebro anterior basal, la corteza entorrinal y la corteza prefrontal, son excepcionalmente vulnerables a los efectos perjudiciales del envejecimiento. El deterioro de estas regiones del cerebro relacionado a la edad ha sido ampliamente documentado en varias especies de mamíferos, incluyendo humanos, primates no humanos, ratas y ratones (Burke y Barnes, 2006). Numerosas alteraciones relacionadas con la edad en el hipocampo de roedores se han asociado con deterioro de la memoria espacial (Wilson y col., 2003), elevados niveles de neurotrofinas y proteína quinasa (Bimonte y col., 2003; Columbo y col., 1997), densidad de área postsináptica y proteínas sinápticas reducidas (Nicholson y col., 2004; Frick y Fernández, 2003; Smith y col., 2000) y deterioro de la potenciación a largo plazo (Bach y col., 1999).

1.5.2- Regulación de la expresión del $ER\alpha$ en el hipocampo a través del envejecimiento y sus implicancias

Los mecanismos por los que la privación de las hormonas ováricas a largo plazo altera la respuesta del cerebro a la administración de estrógenos aún son desconocidos, pero existe evidencia que implican a los ER, en particular el ER α . Recientemente se ha observado que los cambios en la expresión y señalización del ER α relacionados con la edad se han visto íntimamente relacionados con el deterioro cognitivo asociado a la edad (Foster, 2012). En las mujeres, se encontró una relación lineal entre la función cognitiva y los niveles de ER α de la corteza frontal de pacientes con EA (Kelly y col., 2008). En ratas, se encontró que, en comparación con las hembras jóvenes, las hembras envejecidas tenían una reducción del 50% en el número de sinapsis de las neuronas hipocampales inmunoreactivas al ER α . A su vez, los niveles de ER α de las ratas jóvenes respondían al tratamiento con E2 pero no el de las ratas viejas (Adams y col., 2002). La expresión y la función del ER α se ven afectadas por el envejecimiento en las áreas del cerebro importantes para la cognición incluyendo el hipocampo. Hay datos que sugieren que, los cambios en la expresión o función de ER α asociados al envejecimiento, están asociados con cambios relacionados a la edad en la capacidad del E2 para afectar la plasticidad del hipocampo, así como el sistema colinérgico septohipocámpico. Por ejemplo, en paralelo a la disminución de la expresión del ER α asociada a la edad en espinas dendríticas de ratas viejas (Adams y col., 2002) existe un cambio en la respuesta de dichas espinas al E2. Específicamente, el evidente incremento de la densidad de espinas y sinapsis inducidos por E2 en ratas hembras jóvenes no se observó en las envejecidas (Adams y col., 2001b).

Los resultados experimentales en roedores proporcionan evidencia convincente de que, la deficiencia de hormonas ováricas a largo plazo, afectará la posterior capacidad del E2 para disminuir el riesgo de neurodegeneración y el deterioro cognitivo asociado a la edad.

1.5.3- Los tratamientos conductuales y su utilidad para revertir los efectos de la edad: la exposición a ambientes enriquecidos

La disfunción del hipocampo y de la neocorteza que son características del envejecimiento normal (Rosenzweig y Barnes, 2003) conduce a una variedad de trastornos cognitivos. Estos incluyen deficiencias en la navegación espacial, reconocimiento de objetos, la memoria de trabajo (es decir, a corto plazo), planificación y función ejecutiva (Arnsten, 1993).

Los tratamientos conductuales, incluyendo la estimulación cognitiva y el ejercicio físico, pueden ser especialmente útiles para mejorar la cognición en las personas mayores. En general las personas de edad avanzada consumen múltiples medicamentos recetados para afecciones como la hipertensión y el colesterol alto (Jorgensen y col., 2001). Muchos de estos medicamentos pueden afectar negativamente la cognición (Weston y col., 2010). En cambio, la estimulación cognitiva (por ejemplo, la lectura extensiva, los viajes y la educación continua) y el ejercicio físico (por ejemplo, caminar, jardinería, baile, tenis) pueden proporcionar beneficios significativos para la salud en general y la función cognitiva, siendo además, tratamientos simples de aplicar a cualquier edad.

Por ejemplo, las ocupaciones cognitivamente estimulantes (como la enseñanza universitaria) pueden prevenir la disminución de la memoria verbal y de trabajo, en comparación a la población general de adultos mayores (Shimamura, 1995), y los mayores niveles de educación están fuertemente asociados con un riesgo reducido de padecer deterioro cognitivo asociado a la edad, la demencia y la EA (Launer y col., 1999).

Los datos más recientes muestran que las actividades de ocio cognitivamente estimulantes para el adulto mayor (por ejemplo, lectura, crucigramas, grupos de discusión, eventos culturales) pueden reducir el riesgo de demencia (Verghese y col., 2003) y retrasar la aparición de la pérdida de memoria en personas ancianas sanas que posteriormente desarrollan demencia (Hall y col., 2009). El ejercicio físico (por ejemplo, caminar, subir escaleras, actividades recreativas) también se ha asociado con una reducción de la disminución cognitiva global (Middleton, 2008). En hombres de edad avanzada y mujeres, se ha visto un efecto positivo incluso cuando este tratamiento se inicia muy tarde en la vida. Aunque estos datos son convincentes, se han realizado relativamente pocos estudios en seres humanos como para comprender los mecanismos celulares y moleculares en el cerebro que subyacen a los beneficios cognitivos de la estimulación enriquecedora. Dada la

similitud del deterioro cognitivo neurobiológico relacionados con la edad en roedores como en humanos, los modelos animales pueden ser extremadamente útiles. Con ellos se pueden diseñar estudios para entender el potencial de la estimulación cognitiva y física sobre la prevención y/o reducción de la declinación cognitiva relacionada con la edad (Frick y Benoit, 2010).

Para estos estudios, se utilizan condiciones de mantenimiento de los animales en ambientes enriquecidos. Esto implica generalmente que se alojen en grupos sociales grandes y exponerlos a una variedad de objetos de estímulo que pueden proporcionar tanto estimulación cognitiva (por ejemplo, juguetes, túneles, viviendas) como ejercicio físico (por ejemplo, correr dentro de ruedas). El enriquecimiento ambiental se desarrolla en jaulas especiales mientras que los animales controles se alojan en jaulas de laboratorio convencionales, ya sea individualmente (controles aislados) o en pequeños grupos (control social) (Bennett y col., 2006; Frick y col., 2003).

Diferentes trabajos han demostrado ampliamente los efectos beneficiosos del enriquecimiento ambiental sobre la función cerebral. En la corteza cerebral de ratas y ratones enriquecidos en edad adulta, el tratamiento aumentó los niveles de varios factores neurotróficos (Torasdotter y col., 1998) y la expresión de genes relacionados con la señalización y el crecimiento neuronal (Rampon y col., 2000). En el hipocampo, el enriquecimiento en la edad adulta aumentó la potenciación a largo plazo (Duffy y col., 2001), la fuerza sináptica (Irvine y Abraham 2005), y la neurogénesis (Nilsson y col., 1999). Además se detectaron aumentos de los niveles de factores de crecimiento y proteínas sinápticas (Gresack y Frick, 2004). En consecuencia, muchas de estas alteraciones del hipocampo se asociaron con un aumento de la memoria espacial y contextual dependiente del hipocampo (Nilsson y col., 1999; Gresack y Frick, 2004).

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que el enriquecimiento ambiental iniciado en la edad adulta, produce una respuesta multifacética en el hipocampo que conduce a un aumento de la plasticidad sináptica y mejora de varios tipos de memoria.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo General

Conocer, mediante el uso de modelos animales *in vivo*, los mecanismos moleculares por los que ciertas variables neuroendocrino-conductuales pueden modular la acción neurotrófica de los estrógenos en estructuras del cerebro relacionadas con la memoria (hipocampo y sus relaciones corticales y septales).

Nos interesa determinar si la regulación de la expresión de moléculas claves para la acción estrogénica en el hipocampo (*ER α* y *BDNF*), se modifica por factores tales como: el período que un animal pasa privado de su función ovárica, la edad y la exposición a ambientes enriquecidos.

2.2- Objetivos Particulares

- *Evaluar la influencia de un tratamiento agudo con E2 sobre la regulación transcripcional y postranscripcional de la expresión del ER α en el hipocampo de ratones hembra ovariectomizadas (OVX). Para ello se determinarán:*

- a) La expresión del ARNm total y la proteína ER α .
- b) La actividad transcripcional relativa de los promotores del gen ER α .
- c) La expresión de isoformas de delección del ER α .
- d) La expresión de proteínas coreguladoras de la transcripción de ER α (REA y SMRT).
- e) El nivel de acetilación de histonas H3 y H4 en las inmediaciones de los promotores del gen ER α cuya actividad sea alterada por el tratamiento con E2.
- f) Las modificaciones por el tratamiento con E2 en la expresión de genes estrógeno-sensibles (BDNF).
- g) Los niveles séricos de E2.

- *Conocer si el tiempo que el ratón hembra pasa privado de su función ovárica modifica la capacidad transcripcional de la vía estrogénica en el hipocampo, determinando:*

a) La eficacia de una THR para aumentar la expresión de BDNF en las distintas regiones del hipocampo.

b) La expresión del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$).

c) Si se producen alteraciones epigenéticas en las regiones reguladoras del gen de BDNF.

d) La expresión de marcadores de neuroplasticidad como sinaptofisina (SYN), una proteína presente en las vesículas presinápticas que posee un papel muy importante en la plasticidad sináptica y la función cognitiva.

- *Evaluar si la exposición de ratones hembra a un ambiente enriquecido modifica los efectos del envejecimiento natural sobre la expresión del $ER\alpha$.
Determinaremos:*

a) La expresión de la proteína $ER\alpha$.

b) La expresión del ARNm del $ER\alpha$ y la actividad transcripcional relativa de los promotores A, C y F.

c) El grado de metilación de secuencias ricas en dinucleótidos CpG en los promotores modificados como una medida de las posibles modificaciones epigenéticas

d) Los niveles séricos de E2.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Regulación estrogénica de la expresión del ER α en el hipocampo del adulto

3.1.1- Animales y modelo experimental

Utilizamos ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa Swiss-Rockland de aproximadamente 3 meses de edad pertenecientes al bioterio del Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL). De acuerdo a la capacidad de producción y cría del bioterio, se trabajó con un número de 15-20 animales para cada grupo experimental. Los animales fueron mantenidos durante todo el experimento en un ambiente de luz y temperatura controladas (período de luz desde las 06.00 h hasta las 20.00 h y temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con acceso libre a comida y bebida (alimento balanceado en forma de pellets provenientes de Alimentos Cooperación, Rafaela, Santa Fe). Todos los animales utilizados fueron manipulados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio editada por la Academia Nacional de Ciencias (USA). Los animales del experimento se sometieron a ovariectomía bilateral, con el fin de quitar la principal fuente natural de estrógenos y progesterona. La ovariectomía se realizó utilizando éter etílico como anestesia y se procedió de acuerdo a la técnica quirúrgica de acceso dorsal. Se desinfectó con alcohol 70° el campo de cirugía y se realizó una incisión de 1,5 cm en la línea media de la piel dorsal, diversionando luego para separar la piel del tejido muscular. Para ingresar a la cavidad abdominal se debió atravesar la pared muscular y el peritoneo, para lo cual se realizó una incisión 0,5 cm a la derecha e izquierda de la columna vertebral y 0,5 cm hacia abajo de la última costilla. Con pinza anatómica de punta roma se localizaron los órganos genitales internos, manipulando con pinzas la grasa circundante para evitar lesionar los órganos. Una vez localizado el ovario se ligó con hilo quirúrgico el hilio ovárico al nivel de la unión útero-tubárica asegurando la obstrucción completa de la arteria principal ovárica y se seccionó por arriba de la ligadura, extrayendo el ovario y oviducto. Luego de la extracción se utilizaron puntos

simples para los planos musculares y puntos de doble vuelta en U para los planos de la piel. Los animales se dejaron recuperar en jaulas individuales por un período de 15 días luego de la cirugía. Pasados los 15 días se realizaron extendidos vaginales para controlar los efectos de la ausencia de esteroides ováricos, solamente los ratones que presentaron extendidos consecutivos con características atróficas fueron utilizados en el experimento. Luego, los animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo E2 2 h:** animales tratados con una única inyección subcutánea (sc) de 0,05 μg E2/g de peso corporal (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) y sacrificados a las 2 h post-inyección.
- **Grupo E2 4 h:** animales tratados con una única inyección sc de 0,05 μg E2/g de peso corporal y sacrificados a las 4 h post-inyección.
- **Grupo C (control):** tratados con una única dosis del vehículo de la hormona (aceite de maíz).

La dosis de E2 utilizada en este trabajo fue la indicada por Kazi y col. (Kazi y col., 2005) con la cual se logró analizar la cinética de activación del ER α y el consiguiente reclutamiento de la maquinaria transcripcional a los promotores de genes blanco.

Todos los animales fueron inyectados con 100 μl de aceite de maíz solo o con la cantidad apropiada de E2.

3.1.2- Obtención de las muestras

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación con guillotina. Se colocó la cabeza del animal en una tabla de disección, y se procedió a retirar la piel y la musculatura cefálica mediante el uso de una tijera quirúrgica. Seguidamente se separaron los huesos craneales mediante un corte sagital-medial del cráneo a través de la sutura sagital. Rápidamente se procedió a la extracción del cerebro separándolo del cráneo por corte de los nervios ópticos con la ayuda de una pinza. 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 -20°C hasta su utilización. Para inmunohistoquímica (n=5 por grupo), los

cerebros fueron micro-diseccionados (Fig. 15) y fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 24 h a 4°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 hipocampo en el plano coronal (Paxinos y Watson, 2005) fueron montados en portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltriethoxisilano (Sigma) y secados a 37°C durante 24 h. Para la extracción de ácidos nucleicos (n=8 por grupo) y los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, n=5 por grupo), el cerebro completo se colocó sobre una tabla de microdissección en posición ventral hacia arriba. Mediante la ayuda de una lupa estereoscópica y un bisturí se realizaron dos cortes coronales; el primero a la altura del cuarto anterior del hipotálamo y el segundo a la altura del cerebelo (Fig. 15). Seguidamente se colocó la fracción resultante en posición rostral respecto del operador y mediante cortes en sentido distal se separó el córtex para lograr descubrir el hipocampo, el cual se retiró con la menor cantidad de tejido circundante posible y se colocó en un tubo eppendorf estéril previamente pesado para su inmediata congelación en nitrógeno líquido. Los tejidos destinados a la extracción de ácidos nucleicos fueron conservados directamente en freezer a -80°C hasta su procesado. Los hipocampos diseccionados para ChIP fueron inmediatamente fijados en 10 ml de formaldehído al 1% en rotación orbital a temperatura ambiente. Para detener la fijación se adicionaron 1,5 ml de glicina 1 M y se incubó por 5 min en rotación orbital y a temperatura ambiente. Luego centrifugamos a 2000 g por 5 min y a 4°C y descartamos el sobrenadante. Finalmente las muestras se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío y centrifugación a 2000 g por 5 min y a 4°C. En este punto las muestras se pueden mantener por un año a -80°C.

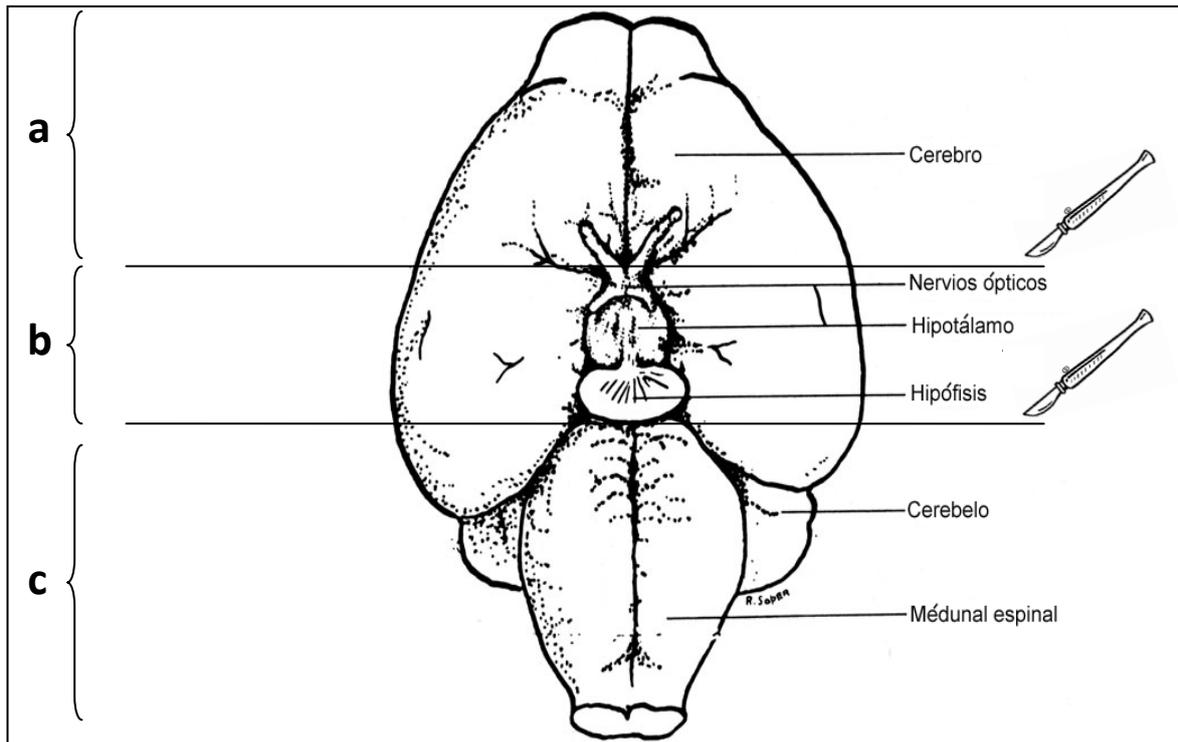


Figura 15 Cortes coronales sobre el cerebro con la posición ventral hacia arriba. (a) Corte a la altura del tracto óptico; (b) Segmento utilizado para diseccionar el hipocampo dorsal; (c) Corte del cerebelo. Modificado de <http://www.informatics.jax.org/greenbook/figures/figure13-11.shtml>.

3.1.3- Extracción de ARN total, transcripción reversa y análisis de la expresión de *ER α* , sus promotores transcripcionales y *BDNF* mediante PCR en tiempo real

Las muestras de hipocampo dorsal de cada grupo experimental fueron homogenizadas individualmente 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.

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 x. La transcripción reversa 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.

Se utilizó un protocolo optimizado de PCR en tiempo real para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de ER α y de los transcritos de ER α conteniendo los exones no-traducidos A, B, C, F1 y F1F2. Además se describen los oligonucleótidos utilizados para determinar la expresión del ARNm de BDNF (utilizado como molécula inducida por E2). Como control interno de carga (housekeeping gene) se determinó la expresión de la subunidad 18S ribosomal. En la Tabla 2 se detallan los oligonucleótidos cebadores utilizados para este estudio.

TABLA 2. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real

Gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplificación (pb)	Número de Genbank
<i>ERα</i>	Sentido: ACTACCTGGAGAACGAGCCC Antisentido: CCTTGGCAGACTCCATGATC	153	M38651.1
<i>ERα-A</i>	Sentido: AGTACTCGTGCCAAGGGGAA Antisentido: AGGCTTTGGTGTGAAGGGTC	135	AJ276597
<i>ERα-B</i>	Sentido: CGAATCCAGCAGCGAAGACC Antisentido: CATTCCCGAGGCTTTGGTGT	133	AJ276597
<i>ERα-C</i>	Sentido: CGAGCACATTCTTCCTTCC Antisentido: AGGCTTTGGTGTGAAGGGTC	192	AJ276597
<i>ERα-F1/</i>	Sentido: CTCCATGCTCAGCAGCCTTG	180 (F1)	AJ272164 (F1)
<i>ERα-F1F2</i>	Antisentido: GTCATGGTAAGTGGCAGCCG	289 (F1F2)	AJ272165 (F2)
<i>18S ARN</i>	Sentido: TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA Antisentido: ATCCGAGGGCCTCACTAAAC	71	NR_003278.3
<i>BDNF</i>	Sentido: ACCATAAGGACGCGGACTTG Antisentido: GAGGAGGCTCCAAAGGCAC	69	AY057908

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 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, 5 μ l de cada ADNc fueron combinados con una mezcla conteniendo 2,5 U de polimerasa de ADN Taq (Invitrogen), MgCl₂ 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 de SYBR Green I PCR Taq. Luego de una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, la mezcla de reacción fue sometida a 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg, hibridación a 59°C (para todas las variantes transcripcionales del ER α), 60°C (ER α), 53°C (BDNF) o 57°C (18S ARN) por 15 seg, y extensión a 72°C por 15 seg. 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. La eficiencia de las reacciones de PCR se evaluó para cada par de cebadores por la amplificación de ocho diluciones en serie de los ADNc y posterior construcción de la recta C_t versus log de la dilución (eficiencia= $10^{(1/\text{pendiente})-1}$). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la eficiencia varió de 98% a 102%. 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 18S ARN entre los grupos experimentales.

3.1.4- Análisis de la expresión de isoformas de delección del ER α mediante RT-PCR de punto final

Con el objetivo de analizar la posible expresión de las isoformas de delección $\Sigma 2$, $\Sigma 3$, $\Sigma 4$, $\Sigma 5$, $\Sigma 6$ y $\Sigma 7$ del ER α realizamos una PCR de punto final con un cebador sentido que hibride en exón codificante aguas arriba del exón a estudiar y un cebador antisentido que hibride en el siguiente exón codificante aguas abajo del exón en cuestión (Tabla 3; Varayoud y col., 2005). La transcripción reversa del ARNm total y las mezclas de reacción fueron desarrolladas como se describió en la sección 3.1.3.

Para la amplificación de los ADNc, 5 µl de cada ADNc (diluidos 1:2) 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 PCR *Taq*. Luego de una desnaturalización inicial de 3 min a 96°C, la mezcla de reacción fue sometida a 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 59°C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min seguidos de una extensión final a 72°C por 2 min.

TABLA 3. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR de punto final

Gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplicón (pb)	Número de Genbank
<i>ERα-Σ2</i>	Sense: CTGCACCAGATCCAAGGGAAC	Completo: 682	M38651.1
	Antisense: GGCAACTCTTCTCCGGTTCT	Delecionado: 491	
<i>ERα-Σ3</i>	Sense: TGCCAAGGAGACTCGCTACTGT	Completo: 440	M38651.1
	Antisense: GCGGTTTCAGCATCCAACAAG	Delecionado: 326	
<i>ERα-Σ4</i>	Sense: AGAACCGGAGGAAGAGTTGCC	Completo: 456	M38651.1
	Antisense: AGGCACACTCGAGAAGGTGGA	Delecionado: 117	
<i>ERα-Σ5</i>	Sense: ATAGCCCTGCCTTGTCCTTGA	Completo: 412	M38651.1
	Antisense: TGCAGGTTTCATCATGCGGA	Delecionado: 273	
<i>ERα-Σ6</i>	Sense: GTGTGCCTGGCTGGAGATTCT	Completo: 291	M38651.1
	Antisense: CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT	Delecionado: 157	
<i>ERα-Σ7</i>	Sense: GTCGGTTCCGCATGATGAAC	Completo: 344	M38651.1
	Antisense: GTGGGCATCCAACATCTCCA	Delecionado: 160	

Los fragmentos de ADNc generados fueron resueltos en geles de agarosa al 1,5% conteniendo el colorante GelRed (Biotium) y sus tamaños moleculares fueron determinados por comparación con patrones de ADN (Cien Marker; Biodynamics, Buenos Aires, Argentina). En todos los ensayos fueron incluidos controles sin ADNc los cuales no produjeron amplificación consistente.

3.1.5- Detección de la expresión a nivel proteína del *ERα*, sus coreguladores transcripcionales *REA* y *SMRT* y *BDNF* mediante inmunohistoquímica

Se utilizó una técnica optimizada en nuestro laboratorio de inmunohistoquímica para visualizar la expresión hipocámpica de las proteínas mencionadas (Muñoz-de-Toro y

col, 1998). Las muestras fueron pretratadas en horno microondas para la recuperación antigénica, seguido por un bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena y de las uniones inespecíficas. Luego fueron incubadas con cada anticuerpo primario a 4°C durante 14-16 h, y luego con anticuerpos secundarios biotinilados, generados y validados en nuestro Laboratorio. La dilución utilizada fue 1:200 y se incubó durante 30 min. Los controles negativos se realizaron mediante el reemplazo del anticuerpo primario con suero de conejo no-inmune (proveniente de nuestro laboratorio). Para el revelado de la reacción se utilizó una dilución 1:150 del reactivo estreptavidina-peroxidasa (Sigma) en una solución al 1% de albúmina sérica bovina en buffer de fosfatos. La reacción de color fue desarrollada utilizando diaminobencidina como sustrato cromógeno (Sigma) para evaluar la expresión de BDNF. Para determinar la expresión de ER α y sus cofactores, se realizó una intensificación de la reacción mediante la utilización de NiCl₂ en la solución de diaminobencidina, de acuerdo a lo descrito en nuestros trabajos (Varayoud y col., 2001). Las muestras obtenidas fueron deshidratadas y montadas en medio de montaje permanente (PMMyR, Buenos Aires, Argentina).

3.1.6- Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica

Los anticuerpos policlonales utilizados para la detección del ER α (dilución 1:25), REA (dilución 1:100) y SMRT (dilución 1:100) fueron generados y validados en nuestro Laboratorio (Monje y col., 2009; Varayoud y col., 2008) (Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), FFCB, UNL, Argentina). Para la evaluación de la expresión de BDNF las muestras fueron incubadas con el anticuerpo policlonal comercial (N-20, sc-546, dilución 1:800, Santa Cruz, CA, USA).

3.1.7- Cuantificación de la expresión de ER α , REA, SMRT y BDNF en el hipocampo 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. Las regiones hipocampales fueron identificadas mediante la tinción de Nissl de un portaobjeto por serie y fueron delimitadas 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 (REA y SMRT en las regiones GD, CA3 y CA1) o se midió la densidad óptica integrada (DOI) como una combinación lineal de la intensidad promedio y el área relativa ocupada por la marcación positiva ($ER\alpha$ y BDNF en las regiones GD, PZ, CA3 y CA1). Al menos dos 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).

3.1.8- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el análisis de histonas acetiladas H3 y H4

La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, Fig. 16A) es una técnica poderosa y ampliamente aplicada para la detección de la asociación de proteínas individuales a regiones genómicas específicas *in vivo*. En esta técnica, las células vivas se fijan utilizando formaldehído para generar enlaces cruzados (*cross-links*) proteína-proteína y ADN-proteína entre las moléculas próximas a la cromatina *in vivo*. Luego se prepara un extracto de células en el cual la cromatina fijada se fragmenta por sonicación para reducir el tamaño promedio de los fragmentos de ADN a ~ 500 pb. El material resultante se inmunoprecipita con un anticuerpo contra una proteína

deseada, la cual puede estar modificada (por ejemplo, acetilada, fosforilada, metilada). Las secuencias de ADN que se encuentran fijadas directa o indirectamente por enlaces cruzados a una proteína dada son selectivamente enriquecidas en la muestra inmunoprecipitada. Por lo tanto, el método no se limita al estudio de proteínas de unión a secuencias específicas de ADN. La reversión de la fijación con formaldehído por calentamiento permite la recuperación y el análisis cuantitativo del ADN inmunoprecipitado. Las cantidades de determinadas regiones genómicas en las muestras control e inmunoprecipitadas son determinadas individualmente por PCR cuantitativa. Los resultados proporcionan información cuantitativa acerca del nivel relativo de asociación de una proteína dada con diferentes regiones genómicas (Aparicio y col., 2004).

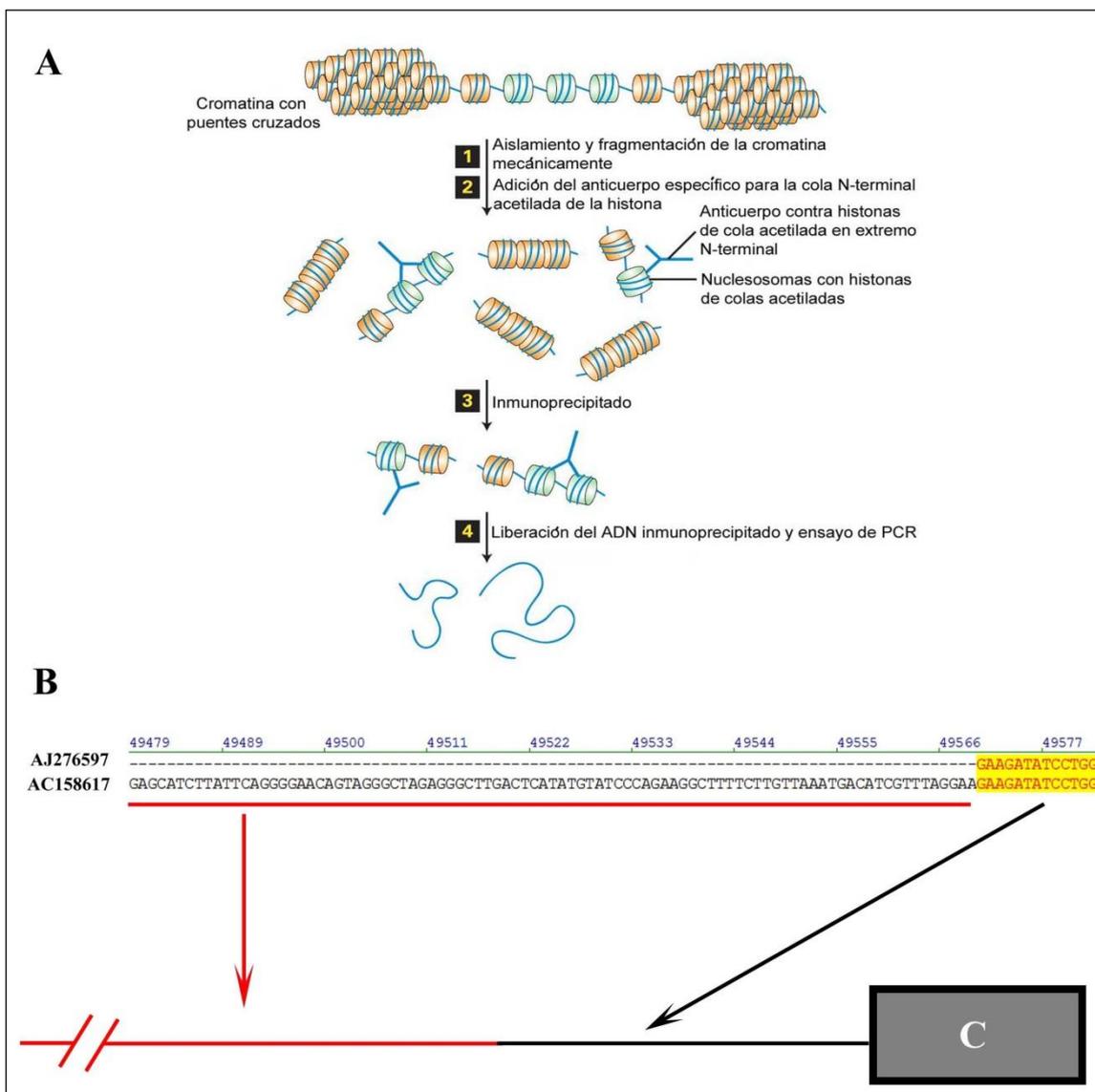


Figura 16 Experimento de ChIP. (A) Esquema de un ensayo de ChIP para la inmunoprecipitación de proteínas histonas acetiladas. *Puentes cruzados*: enlaces cruzados generados por fijación con formaldehído. Modificado de <http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/default.asp>. (B) Alineamiento entre una secuencia incompleta del gen ER α de ratón (AJ 276597) y la secuencia del cromosoma 10 donde se encuentra el mismo (AC158617). Esta herramienta bioinformática nos permitió conocer la secuencia completa del promotor C de manera de obtener 2000 pb corriente arriba del SIT del exón C y realizar un estudio de ChIP más amplio. La región resaltada en amarillo indica homología entre secuencias.

Para realizar los ensayos de ChIP utilizamos el kit EZ-MAGNA ChIP G (Millipore, Temecula, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El procedimiento se desarrolla durante dos días, en los cuales:

- ✓ **Día 1:** se procedió a la lisis celular y nuclear de aproximadamente 12 mg de hipocampo fijado en formaldehído al 1% (ver punto 3.1.2). Luego sonicamos la cromatina de manera de obtener fragmentos en el rango de los 200-1000 pb (chequeados por electroforesis en geles de agarosa). Previo a la inmunoprecipitación, separamos una alícuota de cada muestra sonicada diluida y la tratamos el día siguiente de igual manera que las muestras inmunoprecipitadas (muestra de *ADN Input*). La cromatina fragmentada se sometió a inmunoprecipitación con 6 μ l del anticuerpo policlonal anti-acetil histona H3 o anti-acetil histona H4 (Millipore) durante toda la noche a 4°C y en rotación. Como *control negativo* realizamos la inmunoprecipitación de cada muestra con suero normal de conejo (especie donde se generaron los anticuerpos usados para inmunoprecipitar).
- ✓ **Día 2:** se separaron los complejos ADN-proteína de la mezcla de reacción y se revirtieron los entrecruzamientos generados inicialmente por el formaldehído para liberar el ADN. Finalmente los fragmentos de cromatina sonicada e inmunoprecipitada fueron purificados y conservados a -20° C para su posterior uso en PCR cuantitativa en tiempo real.

Nuestro interés se centró en analizar los niveles de enriquecimiento en proteínas histonas acetiladas en las inmediaciones de los promotores 5'UTR del ER α , específicamente de las variantes A y C, cuya expresión se vio afectada por el tratamiento con E2. Para estudiar las regiones promotoras completas del gen ER α

realizamos un alineamiento bioinformático (Software Vector NTI 11, Invitrogen) de la secuencia incompleta AJ276597 (Genebank) del gen ER α de ratón con la secuencia genómica del cromosoma de ratón que lo contiene (cromosoma 10, AC158617, Genebank) (Fig. 16B). De esta manera conseguimos obtener la secuencia de 2000 pb corriente arriba respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT) del exón C para completar su promotor. El análisis epigenético (mediante el uso del software MethylPrimer Express, Applied Biosystems) de las secuencias de los promotores develó que en las inmediaciones del sitio de inicio de la transcripción del exón C existe una isla CpG (ver sección 1.2.3 de la Introducción) de 259 pb, que decidimos incluir en el estudio. En resumen, definimos evaluar 2 regiones regulatorias del exón A (definidas como Promotor A e Isla A) y 3 del exón C (definidas como Promotor C-I, C-II y C-SIT). Los pares de cebadores utilizados se muestran en la Tabla 4.

Los niveles de ADN inmunoprecitado amplificado fueron detectados utilizando el sistema Rotor-Gene Q[®] Real Time PCR (Qiagen, Hilden, Alemania). Para la amplificación del ADN, 5 μ l de cada muestra fueron combinados con una mezcla conteniendo 1 \times HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l. Luego de una desnaturalización inicial de 15 min a 95°C, la mezcla de reacción fue sometida a 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 58°C (Promotor A e Isla A), 48°C (Promotor C-I) o 54°C (Promotor C-II y C-SIT) por 30 seg, y extensión a 72°C por 30 seg. La fluorescencia del colorante EvaGreen fue medida durante el paso de extensión. 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 ADN fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación consistente. El C_t de cada muestra fue calculado utilizando el programa de análisis Rotor-Gene Q[®] Series versión 2.0.2 (Qiagen). El análisis de los resultados se hizo mediante el método de la curva estándar relativa que consiste en la construcción de una curva estándar con el logaritmo de las diluciones sucesivas (log D) de ADN *input* (muestra no inmunoprecitada) versus su C_t (calculado por PCR en tiempo real con los cebadores descritos en la Tabla 4, que fueron utilizados para amplificar muestras inmunoprecitadas). Con estos datos se obtiene la correspondiente fórmula de la recta por regresión lineal. Para cada muestra inmunoprecitada y su ADN *input* se

obtendrán datos de C_t con los que se ingresará a las rectas obtenidas para calcular la dilución correspondiente. Las cantidades relativas de una secuencia inmunoprecipitada son calculadas dividiendo el valor D de la muestra inmunoprecipitada por el valor D de su muestra *input* (normalización). Finalmente, al valor D normalizado de cada muestra se le resta el valor D normalizado correspondiente a su control negativo (sustracción de la señal de fondo o *background*).

TABLA 4. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplicón (pb)	Distancia respecto del SIT del Exón 5'UTR (pb)
<i>Promotor A</i>	Sense: AAAGTTGGAGAACCCGGGAG Antisense: WAGTYCCCCTTGGCACGAGTAC	127	-68 a +57
<i>Isla A</i>	Sense: AGTACTCGTGCCAAGGGGAAC Antisense: ATGGTCATGGTAAGTGGCAGC	145	+35 a +179
<i>Promotor C- I</i>	Sense: TTGTTGAGGGAACTTGTCTA Antisense: GGCAGTTACCAAGAGATATA	154	-1106 a -952
<i>Promotor C- II</i>	Sense: AGTAGGGCTAGAGGGCTTGAC Antisense: GGGAAACTGAGATGGCTGTG	170	-439 a -269
<i>C-SIT</i>	Sense: AGTCCCTGCCACTCCACATA Antisense: CAAGAGCGTCTTTCCAGAAA	107	-39 a +68

Los cebadores C-SIT amplifican una región que contiene al sitio de inicio de la transcripción (SIT) del exón C.

3.1.9- Niveles séricos de 17β -estradiol

La concentración de 17β -estradiol fue determinada por RIA mediante el uso del kit DPC ^{125}I (17β -estradiol double antibody, KE2D, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY). De acuerdo al fabricante este método posee un límite de detección de 0,665 pg/mL y un coeficiente de variación intraensayo de 3.7% en el rango de medida de 1-8 pg/mL. Para la determinación se utilizaron los sueros de, al menos, quince animales por grupo de tratamiento.

3.1.10- Análisis estadístico

Todos los datos fueron calculados como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Las diferencias entre los distintos parámetros estudiados fueron obtenidas aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn (Siegel, 1956). Para el análisis estadístico entre dos grupos experimentales se utilizó el test de Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas significativas sólo si $P < 0,05$.

3.2- Influencia del tiempo de privación de estrógenos endógenos sobre la eficacia de una THR basada en E2

3.2.1- Animales y modelo experimental

En esta etapa de trabajo utilizamos ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa Swiss-Rockland de aproximadamente 3 meses de edad pertenecientes al bioterio del LETH (UNL). Todos los animales fueron manipulados y sometidos a ovariectomías, de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.1. Los ratones OVX fueron asignados al azar a cada uno de los grupos experimentales diseñados utilizando un mínimo de 12 animales en cada grupo:

- **Grupo LPE (OVX Largo Plazo-Estradiol):** animales OVX a los 3 meses de edad y tratados a partir de los 10,5 meses de edad durante 15 días con E2. Este grupo representa a los animales que reciben THR luego de un *tiempo largo* (7,5 meses) de privación de su función ovárica.
- **Grupo LPC (OVX Largo Plazo-Control):** animales controles del grupo LP-E. Estos animales fueron OVX a los 3 meses de edad y tratados a partir de los 10,5 meses de edad durante 15 días con aceite de maíz (vehículo del E2).

- **Grupo CPE (OVX Corto Plazo-Estradiol):** animales OVX a los 10 meses de edad y tratados a partir de los 10,5 meses de edad durante 15 días con E2. Este grupo representa a los animales que reciben THR luego de un *tiempo corto* (15 días) de privación de su función ovárica.
- **Grupo CPC (OVX Corto Plazo-Control):** animales controles del grupo CP-E, OVX a los 10 meses de edad y tratados a partir de los 10,5 meses de edad durante 15 días con aceite de maíz.

Como se puede observar, los animales de todos los grupos se sacrificaron a la misma edad cronológica, es decir cuando cumplieron 11 meses de vida. Además los grupos de animales tratados con E2 recibieron la THR a la misma edad y con la misma duración. De este modo se evita la asociación de variables (*confounding effects*) tal como se describe en trabajos previos (Gibbs, 2000).

3.2.2- Terapia hormonal de reemplazo

La terapia estrogénica consistió en una inyección sc diaria de 1,75 µg de E2/animal durante un período total de 15 días. El rango de dosis que ha sido utilizado previamente para producir niveles fisiológicos de E2 se encuentra entre los 0,5 a 10 µg (Edwards, 1970). Particularmente, Gibbs (1999) encontró que el uso de este tratamiento afecta los niveles relativos de ARNm de BDNF y de la proteína en diferentes regiones del cerebro de la rata adulta. Teniendo en cuenta a su vez que una dosis de tratamiento habitual en mujeres la constituyen 0,033 mg E2/Kg de peso corporal, la dosis empleada en este diseño experimental cumple un doble propósito: 1º) es similar a la empleada en humanos (considerando que los ratones OVX de 10 meses poseen un peso promedio de 50 g) y 2º) es capaz de mantener niveles fisiológicos de la hormona ya que imita los niveles detectados en la etapa del proestro del ciclo estral de los roedores (Saito y col., 2009; Gibbs, 1998). Previamente se ha observado que este tratamiento es eficaz para mejorar la performance cognitiva de animales en el laberinto acuático de Morris (Frye y col., 2005) y para aumentar la proliferación celular en la zona ZSG del hipocampo (datos provenientes de experimentos piloto realizados en nuestro laboratorio). En el

contexto experimental, dicha THR se utilizó como una dosis que induce la expresión de BDNF en el hipocampo.

3.2.3- Obtención de las muestras

La obtención del hipocampo a partir del cerebro y su procesamiento se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.2. Las muestras de cada grupo fueron asignadas al azar a las distintas técnicas utilizadas. Para inmunohistoquímica utilizamos 5 cerebros por grupo experimental, acondicionados como se describe en 3.1.2. Para la extracción de ARNm utilizamos 8 hipocampos por grupo, y para la extracción de ADN genómico utilizamos 5 hipocampos por grupo.

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

Se utilizó un protocolo optimizado de RT-PCR en tiempo real (ver punto 3.1.3) para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de BDNF y de sus transcritos conteniendo los exones no-traducidos I, II, III, IV y V (Tabla 5, Fig. 17).

TABLA 5. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real

Gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplicón (pb)	Número de Genbank
<i>BDNF</i>	Sentido: ACCATAAGGACGCGGACTTG Antisentido: GAGGAGGCTCCAAAGGCAC	69	AY057908
<i>18S ARN</i>	Sentido: TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA Antisentido: GATCCGAGGGCCTCACTAAAC	71	NR_003278.3
<i>BDNF I</i>	Sentido: CCTGCATCTGTTGGGGAGAC	175	AY057908
<i>BDNF II</i>	Sentido: CTAGCCACCGGGGTGGTGTA	144	AY057911
<i>BDNF III</i>	Sentido: CTTCTTGAGCCCAGTTCC	126	AY057912
<i>BDNF IV</i>	Sentido: CAGAGCAGCTGCCTTGATGTT	159	AY057913
<i>BDNF V</i>	Sentido: TTGGGGCAGACGAGAAAGC	222	AY057914
<i>BDNF antisentido</i>	Antisentido: GCCTTGTCCGTGGACGTTTA	-	-

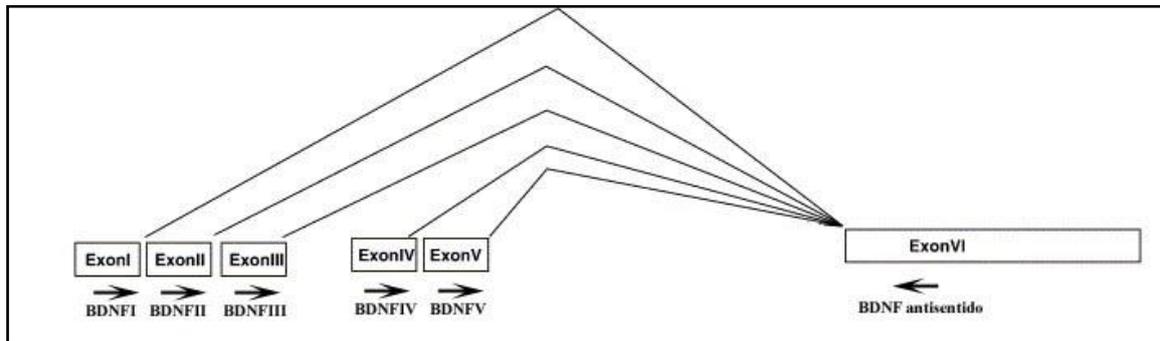


Figura 17 Posición relativa y orientación de los cebadores específicos diseñados para ser utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real específica de los promotores (se indican con **flechas negras**). Como se observa en el esquema, se utilizaron diferentes oligonucleótidos sentido para identificar cada promotor en estudio y un mismo oligonucleótido antisentido que hibrida en la región común a todos los exones 5'UTR señalada como exón VI.

Los niveles de ADNc fueron detectados de acuerdo a lo detallado en el punto 3.1.3. Como molécula normalizadora se evaluó la expresión de la subunidad 18S ribosomal (18S ARN). El protocolo de amplificación de los ADNc se detalla a continuación: luego de una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, la mezcla de reacción fue sometida a 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg, hibridación a 53°C (BDNF), 55°C (variantes I-IV), 59°C (variante V) o 57°C (18S ARN) por 15 seg, y extensión a 72°C por 15 seg. El cambio en los niveles de expresión fue determinado de acuerdo a lo descrito en 3.1.3.

3.2.5- Extracción de ADN genómico y modificación mediante bisulfitación

El ADN fue extraído a partir del de tejido de animales individuales 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) 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.

3.2.6- 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 BDNF 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.18), en ADN genómico tratado con bisulfito de sodio 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.18).

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.

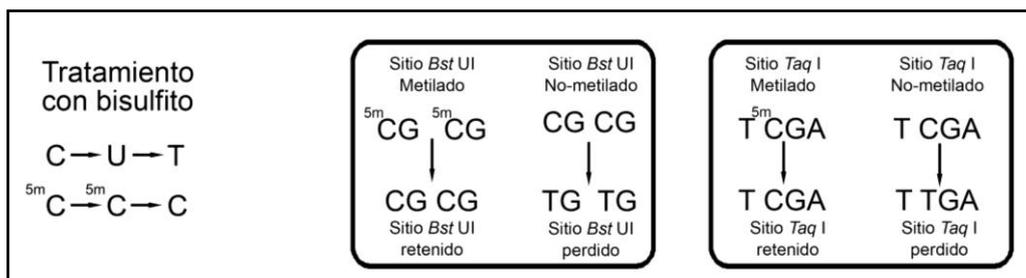


Figura 18 Diagrama del análisis combinado de bisulfitación-restricción (COBRA). En el procedimiento de COBRA, el bisulfito convierte las citosinas no-metiladas (C) a uracilo dejando intactas las citosinas metiladas (^{5m}C). En la figura se ilustran los cambios esperables en los sitios de restricción luego de la reacción del ADN genómico con bisulfito.

Utilizando el programa bioinformático TESS (*Transcription Element Search System*, <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) se estudiaron las secuencias reguladoras existentes en el promotor IV que incluían dinucleótidos CpG (y por ende pasibles de metilación) y luego se determinó si estas secuencias contenían sitios de reconocimiento para las enzimas *Bst*UI, *Taq*I y/o *Maell* (secuencias de reconocimiento con dinucleótidos CpG). En esta técnica, la digestión de los fragmentos de ADN amplificados por PCR ocurrirá solamente en aquellos sitios de restricción en los que el dinucleótido CpG fue retenido durante la modificación química (debido a un residuo de citosina metilado). Para amplificar las secuencias

de interés a partir de ADN modificado por bisulfito, se diseñaron cebadores de PCR mediante el uso del programa MethPrimer (Li y Dahiya, 2002) de la UCSF (*University of California San Francisco*) disponible online (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>, Tabla 6). Para la amplificación por PCR, 1 µl de cada ADN modificado químicamente fueron combinados con una mezcla conteniendo MgCl₂ 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 × PCR Taq. 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 40 ciclos (30 seg 95°C, 30 seg 60°C y 45 min 72°C), seguido de un ciclo de extensión final de 8 min a 72°C. Para cada par de cebadores se realizaron controles con ADN genómico sin modificar y controles sin ADN.

TABLA 6. Cebadores utilizados en los experimentos de COBRA

Sitio regulador	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplicón (pb)
DMS	Sentido: TAATGATAGGTTTGGTTTTGTGTG Antisentido: AACTATCATATAATACCTCCTCTACCTC	193
CaRE	Sentido: TTATAAAGTATGTAATGTTTTGGAA Antisentido: AATAAAAAATAAATAAAAAATCCAC	188
CRE	Sentido: TGTGTTGTTGTTGTTTAGATAATGATAG Antisentido: CAAAACTAAAAATTTTCATACTAACTC	342

Para asegurar que la digestión con enzimas de restricción en el paso posterior a la PCR fuera completa, cada producto de PCR (20 µl) 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 purificado de PCR fueron digeridos por separado con las enzimas *Bst*UI (*secuencia reconocida* CGCG), *Taq*I (*secuencia reconocida* TCGA) y/o *Ma*ell (*secuencia reconocida* ACGT). A continuación, los fragmentos digeridos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3%. En estos geles, la relación de intensidad entre la fracción digerida de las bandas y las intensidades combinadas de las fracciones digeridas y no digeridas, refleja los

niveles de metilación del ADN en los sitios de restricción (Vladimirova y col., 2009; Su y col., 2011). La intensidad de las bandas fue calculada mediante análisis de imágenes digitalizadas de los geles mediante el uso del programa Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics).

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 *Msel* (secuencia reconocida: TTAA), la cual cortó los productos de PCR en varios fragmentos más 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).

Como control positivo de la técnica se procedió a obtener ADN metilado *in vitro*. Para tal fin se utilizó la enzima CpG methyltransferase (M.Sssl) (New England BioLabs Inc.; Tost y Gut, 2007). Se preparó un tubo conteniendo 7,5 μ l de solución amortiguadora NE Buffer 2, 0,4 μ l de SAM (equivalente a 10 nmoles de S-adenosilmetionina), 1,5 μ l de Sssl (equivalente a 6 U de Sssl) y 4,5 μ g de ADN genómico de ratón. Se llevó a un volumen final de 67,5 μ l. Luego se incubó 3 horas a 37° C en baño seco y finalmente se agregó al tubo 0,4 ml de SAM y 1,5 μ l de Sssl, dos veces (cada dos horas). Seguidamente se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente se inactivó la enzima por incubación en termociclador durante 5 min a 95°C. El ADN metilado *in vitro* se sometió a bisulfitación y a continuación se realizó el análisis de restricción con las enzimas correspondientes. Como control negativo utilizamos ADN genómico de ratones jóvenes stock (donde las secuencias de interés fueron corroboradas por no estar metiladas mediante análisis COBRA).

3.2.7- PCR en tiempo real específica de metilación (MSP)

La PCR específica de metilación (MSP, del inglés **Methylation-Specific PCR**) tiene como objetivo estudiar la metilación de secuencias CpG repetitivas y se basa en la modificación del ADN genómico por bisulfitación seguida de PCR cuantitativa en

tiempo real. Para llevar a cabo esta técnica son necesarios dos pares de oligonucleótidos: un par específico para ADN metilado (M) y otro par de cebadores que no contengan dinucleótidos CpG para cuantificar la cantidad de ADN total en la muestra (no discrimina secuencias metiladas de no metiladas). La cantidad de productos de PCR obtenidos a partir de estos oligonucleótidos indicarán los niveles de metilación de la secuencia en estudio.

Mediante el uso del software bioinformático MethPrimer identificamos una secuencia rica en dinucleótidos CpG en la región 5'UTR del exón V del gen BDNF de ratón. Esta isla CpG se encuentra en la región comprendida entre -140 y -80 pb, considerando como +1 el sitio de inicio de la transcripción. Luego de la conversión con bisulfito de sodio el ADN genómico fue analizado usando 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 se diseñó un set de cebadores (con el software MethPrimer) capaz de hibridar únicamente a la secuencia metilada (M) (Tabla 7) y se empleó un set de referencia que carezca de CpG (cebadores utilizados para el estudio por COBRA del sitio regulador DMS en el promotor IV). Para la amplificación, 1 μ l de cada ADN modificado químicamente fueron combinados con una mezcla conteniendo $MgCl_2$ 4 mM (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP (Promega), y 20 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 5 min antes de agregar 2,5 U de polimerasa de ADN Taq (Invitrogen). Las amplificaciones se llevaron a cabo durante 35 ciclos (15 seg 95°C, 15 seg 57°C (M) o 60°C (DMS) y 15 seg 72°C). Específicamente para esta técnica, la lectura de fluorescencia fue realizada a 75°C debido a la baja temperatura de fusión de los productos de PCR. Para cada par de cebadores se realizaron controles con ADN genómico sin modificar y controles sin ADN. Las reacciones fueron corridas por triplicado para cada muestra. La especificidad de las reacciones para ADN metilado fue confirmado por separado utilizando ADN genómico de ratones jóvenes stock (donde las secuencias de interés fueron corroboradas por no estar metiladas mediante análisis por MSP) y ADN genómico de ratón hipermetilado *in vitro* (por tratamiento con Sssl). No obtuvimos producto de amplificación cuando el ADN hipometilado fue amplificado con el set de cebadores M.

Para realizar la cuantificación de los niveles de metilación se utilizó el método de la curva estándar relativa. En primer lugar se construyeron curvas estándares, generadas mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADN metilado *in vitro* (mediante el uso de los cebadores M) con cantidades crecientes de ADN hipometilado. Se tuvo en cuenta que la concentración final del ADN total: metilado + no metilado, fuera exactamente la misma en cada tubo de reacción. Las curvas estándares fueron usadas para cuantificar el grado de metilación de cada muestra experimental de ADN expresado como la proporción ADN metilado (medido con los cebadores M) respecto a la cantidad de ADN modificado obtenido por cuantificación con los cebadores DMS.

TABLA 7. Cebadores utilizados en los experimentos de MSP

Nombre	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplicón (pb)
M	Sentido: GTGTAAGGCGATTAGGGATATTTTC Antisentido: ATAACACTTAAAAAACGACGCG	106
DMS	Sentido: TAATGATAGGTTTGGTTTTTGTGTG Antisentido: AACTATCATATAATACCTCCTCTACCTC	193

3.2.8- Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica

El anticuerpo utilizado para la detección de BDNF (N-20, sc-546, dilución 1:800), fue comprado a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo para detectar SYN (clon SY38, dilución 1:3000) fue comprado a Millipore. El anticuerpo policlonal utilizado para la detección del ER α (dilución 1:25), fue generado y validado en nuestro Laboratorio (Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), FBCB, UNL, Argentina). El anticuerpo secundario anti-conejo (conjugado a biotina, dilución 1:200) fue comprado a Zymed (San Francisco, CA, USA). Por otro lado, el anticuerpo secundario anti-ratón (dilución 1:200) que utilizamos fue generado y validado en nuestro Laboratorio (Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), FBCB, UNL, Argentina).

3.2.9- Cuantificación de la expresión hipocámpica de BDNF, SYN y ER α 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 3.1.5. El análisis de imágenes fue realizado según lo descrito en la sección 3.1.7. Para la cuantificación, se obtuvieron imágenes de las regiones hipocámpicas CA1, CA3, PZ y GD de cinco animales por grupo (n=5). La expresión del ER α fue representada como densidad espacial de células positivas (número de células/mm² de área evaluada).

3.2.10- Análisis estadístico

Todos los datos fueron calculados como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Las diferencias entre los distintos parámetros estudiados fueron obtenidas aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn (Siegel, 1956) y fueron consideradas significativas sólo si $P < 0,05$.

3.3- Influencia de la edad y la presencia de un ambiente enriquecido de largo plazo (9 meses) sobre la expresión del ER α en el hipocampo del adulto

3.3.1- Animales y modelo experimental

Para evaluar la influencia de la edad y la exposición a un ambiente enriquecido sobre la expresión del ER α diseñamos un modelo experimental con ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa CF-1 de aproximadamente 2 meses de edad pertenecientes al bioterio del LETH (UNL). De acuerdo a la capacidad de producción y cría del bioterio, se trabajó con un número de 22 animales para cada grupo experimental. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.1. Al iniciar el experimento, los animales fueron seleccionados al azar y mantenidos en ambiente enriquecido o estándar (control) conformando un total de 3 grupos experimentales:

- **Controles jóvenes (CJ):** animales mantenidos en jaulas rectangulares estándar durante 2 meses y sacrificados a los 4 meses de edad.
- **Controles de mediana edad (C):** animales mantenidos en jaulas rectangulares estándar durante 9 meses y sacrificados a los 11 meses de edad.
- **Enriquecidos de mediana edad (E):** animales mantenidos en jaulas con ambiente enriquecido durante 9 meses y sacrificados a los 11 meses de edad.

3.3.2- Exposición a ambiente enriquecido o estándar

Los animales controles fueron mantenidos en jaulas blancas alargadas de plástico sin exposición a condiciones de enriquecimiento ($n = 3/\text{jaula}$, Figura 20 C y D). Por otro lado, un total de veintidós ratones separados al azar para el grupo E se alojaron en dos grandes jaulas de acrílico transparente de 58 cm de largo x 42,5 cm de ancho x 25 cm de alto ($n=11/\text{jaula}$, Acrimev, Santa Fe, Argentina) equipadas con tapas blancas ventiladas (con 75 pequeños agujeros para la ventilación) (Frick y Fernández, 2003) y mantenidas en la misma sala del bioterio que las jaulas estándar. Las condiciones de enriquecimiento utilizadas en esta etapa de trabajo fueron las descritas por Harburger y col. (Harburger y col., 2007). Las jaulas contenían distintos objetos con nuevas configuraciones cada día (formas, colores y disposiciones distintas dentro de la jaula, Figura 19 A y B) y cuidamos de no incluir la misma rueda de ejercicios o juguete más de una vez por semana. El acceso al agua fue proporcionada por una botella de agua montada en un lado interno de la jaula, lo que permitió que el pico de acceso se encuentre a 7 cm por encima de la base de la jaula. La comida se colocó en un comedero enrejado de acero en el suelo de la jaula. Cada jaula de enriquecimiento se limpió dos veces por semana, colocando en cada limpieza nuevos objetos de enriquecimiento en diferentes configuraciones. La estimulación cognitiva y el ejercicio fueron proporcionados por una variedad de objetos que siempre incluyeron una rueda para correr, una vivienda de roedores, 4-6 juguetes varios y laberintos de tubos plásticos en distintas configuraciones.

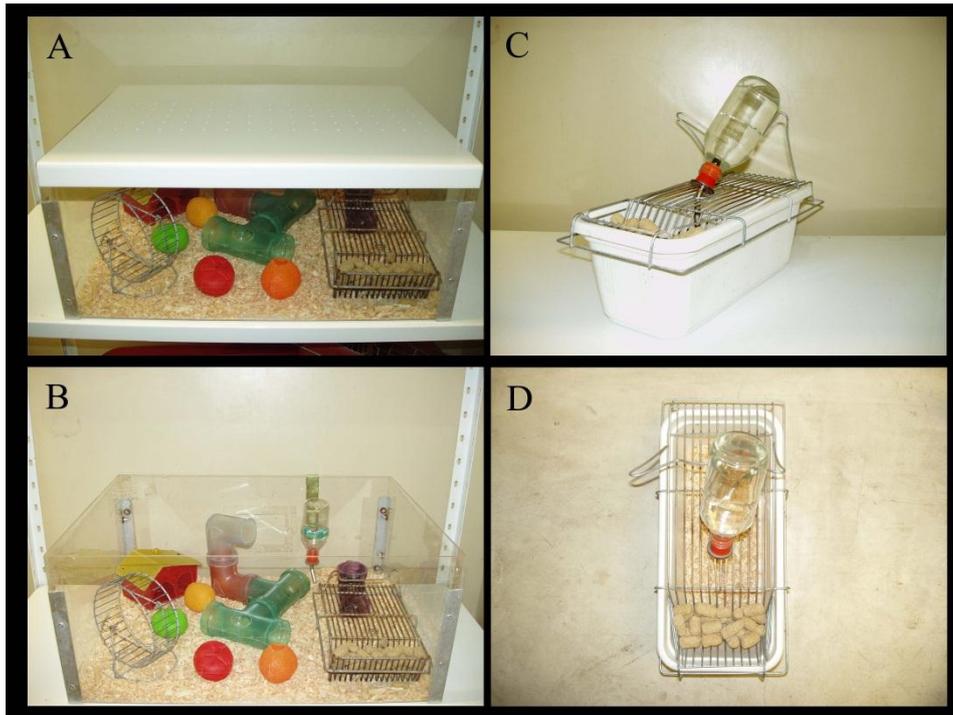


Figura 19 Jaulas utilizadas en el estudio de la influencia de la edad y la presencia de un ambiente enriquecido de largo plazo sobre la expresión del ER α en el hipocampo del adulto. A y B corresponden a las utilizadas para la exposición a ambiente enriquecido. C y D imágenes de jaulas estándar.

3.3.3- Obtención de las muestras

La disección del hipocampo a partir del cerebro y su conservación de acuerdo a su uso posterior se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.2. Las muestras de cada grupo fueron asignadas al azar a las distintas técnicas utilizadas. Para inmunohistoquímica utilizamos 6 cerebros por grupo experimental. Para la extracción de ácidos nucleicos usamos 16 hipocampos por grupo (n=8 para extracción de ARN y n=8 para extracción de ADN genómico).

3.3.4- Transcripción reversa y análisis de la expresión de ER α y sus promotores transcripcionales mediante PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo optimizado de RT-PCR en tiempo real y cuantificación (ver punto 3.1.3) para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de ER α y de

los transcritos de ER α conteniendo los exones no-traducidos A, C, F1 y F1F2 (Tabla 2). Para la amplificación de los ADNc seguimos el mismo diseño de tubos y condiciones de reacción que los descritos en la sección 3.1.3.

3.3.5- Expresión de la proteína ER α en el hipocampo de ratones expuestos a ambiente enriquecido o estándar

Para visualizar la expresión de ER α en el hipocampo se utilizó una técnica estándar de inmunohistoquímica de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.5. El anticuerpo policlonal utilizado para la detección del ER α (dilución 1:25) y el anticuerpo secundario anti-conejo (dilución 1:200) fueron generados y validados en nuestro Laboratorio (Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), FBCB, UNL, Argentina). Los controles negativos se realizaron mediante el reemplazo del anticuerpo primario con suero de conejo no-inmune (LETH). La reacción de color fue desarrollada utilizando diaminobencidina-níquel (Varayoud y col., 2001). Las muestras obtenidas fueron directamente deshidratadas y montadas en medio de montaje permanente (PMyR, Buenos Aires, Argentina). La cuantificación de la expresión de ER α detectada por IHQ fue realizada por análisis de imágenes de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.7, determinando el porcentaje de área inmuno-marcada en las regiones GD, PZ, CA3 y CA1 del hipocampo.

3.3.6- Extracción de ADN genómico y modificación mediante bisulfitación

El ADN fue extraído a partir del de tejido de animales individuales de cada grupo experimental utilizando el kit de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La modificación del ADN mediante bisulfito se llevó a cabo mediante el uso del kit comercial CpGenome Modification Kit (Millipore). El ADN bisulfitado fue resuspendido en buffer TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7.5) y utilizado inmediatamente o conservado a -80°C .

3.3.7- Análisis combinado de bisulfitación-restricción (COBRA)

Debido a la ausencia de sitios de restricción evaluables por COBRA en las inmediaciones de los exónes F y A, el análisis del estado de metilación se realizó para el exón C y para la región 5'UTR del exón codificante 1 (Figura 20). Dado que esta última es común a todas las variantes transcripcionales de ER α , su estado de metilación podría afectar la transcripción global del gen. En estas regiones, identificamos fragmentos ricos en dinucleótido CpG mediante el uso del programa bioinformático Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA) (Figura 20) y chequeamos que contuvieran al menos un sitio de restricción para la enzima *Bst*UI. Seguidamente diseñamos cebadores para amplificar las zonas de estudio usando el mismo programa de Applied Biosystems (Tabla 8). Para la amplificación del ADN, 2 μ l de cada muestra de ADN bisulfitado fueron combinados con una mezcla conteniendo 1 \times HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l.

Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante una estrategia de ciclado *touchdown* (Shen y col., 2007) que consiste en iniciar la reacción con pocos ciclos y temperaturas de hibridación (T[°]a) superiores a la calculada para el amplicón de interés. Conforme se aumenta la cantidad de ciclos se va disminuyendo la T[°]a. Finalmente al llegar a la T[°]a del amplicón se incrementa el número de ciclos al total estándar (38 a 40 ciclos) consiguiendo de esta manera aumentar la eficiencia de amplificación de secuencias problemáticas como son las modificadas por tratamiento con bisulfito. En nuestro trabajo el programa de ciclado consistió en el siguiente orden: 1[°]): calentamiento por 15 min a 95[°]C; 2[°]) tres ciclos de 30 seg 95[°]C, 45 seg 53[°]C y 1 min 72[°]C; 3[°]) cinco ciclos de 30 seg 95[°]C, 45 seg 51[°]C y 1 min 72[°]C; 4[°]): seis ciclos de 30 seg 95[°]C, 45 seg 49[°]C y 1 min 72[°]C y 5[°]) treinta y ocho ciclos de 30 seg 95[°]C, 45 seg 47[°]C y 1 min 72[°]C seguido de un ciclo de extensión final de 10 min a 72[°]C. Luego de la obtención del producto de PCR el análisis se continuó de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2.6.

TABLA 8. Cebadores utilizados en los experimentos de COBRA

Nombre	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplicón (pb)
5'UTR Exón 1	Sentido: GATTTGGAAAGTTAAGTTTAAGG Antisentido: TAATACAACAAAACCATTC	429
Exón C	Sentido: GGTTGGAGTTTTTTTTAGGAAT Antisentido: CCTTCTCCAATAAAAAACAAA	444

3.3.8- PCR en tiempo real basada en enzimas de restricción sensibles a metilación (MSRE-PCR)

Con el objetivo de poder cuantificar los resultados del análisis cualitativo que realizamos por COBRA decidimos utilizar la técnica de PCR en tiempo real basada en enzimas de restricción sensibles a metilación (MSRE-PCR, del inglés ***Methylation-Sensitive Restriction Enzymes - PCR***). Estas enzimas fallan en cortar el ADN si un residuo de citosina del sitio de reconocimiento se encuentra metilado. Mediante el uso de cebadores que delimiten una región que contenga sitios de restricción para estas enzimas se logrará cuantificar la cantidad de sitios no cortados y por ende metilados. La proporción de ADN digerido respecto de la cantidad de ADN total (amplificado con los cebadores *Input*), reflejará el estado de metilación de los dinucleótidos CpG en los sitios de restricción en estudio (Dorak, 2006). Antes de comenzar, las muestras de ADN genómico de cada grupo experimental se mezclaron dando lugar a tres muestras finales: CJ, C y E. Para reducir su tamaño molecular y facilitar los procesos siguientes, las muestras de ADN genómico fueron digeridas previamente con una enzima de restricción que no interfiriera por sus cortes los análisis posteriores (*HindIII*, Promega). Seguidamente, 130 ng (Bruce y col., 2008) de este ADN fue digerido con 2 U de la MSRE *BstUI* (New England BioLabs, Beverly, MA) en 50 μ l de volumen de reacción y a 60°C durante toda la noche para asegurar una digestión completa. Seguidamente fue purificado mediante el uso del kit comercial Wizard SV Gel and clean-up System (Promega, Madison, WI). Los niveles de ADN amplificado fueron detectados utilizando el sistema Rotor-Gene Q[®] Real Time PCR (Qiagen). Los cebadores fueron diseñados (mediante el

software Vector NTI 11, Invitrogen) para estudiar metilación de ADN en las mismas regiones estudiadas por COBRA (Figura 20 y Tabla 9). Para la amplificación del ADN, 2 μ l de ADN purificado fueron combinados con una mezcla conteniendo 1 \times HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l. Cada muestra fue cuantificada por duplicado. Luego de una desnaturalización inicial de 15 min a 95°C, la mezcla de reacción fue sometida a 40 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 57°C (5'UTR Exón 1), 58°C (Input) o 52°C (Exón C) por 30 seg, y extensión a 72°C por 30 seg. La fluorescencia del colorante EvaGreen fue medida durante el paso de extensión. La cantidad total de ADN por reacción (input) se cuantificó a partir de tubos de digestión simulada (sin *Bst*UI) con cebadores que amplificaron una región que no poseía sitios de restricción para *Bst*UI ni para *Hind*III (Figura 20 y Tabla 9). 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 ADN fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación consistente. El C_t de cada muestra fue calculado utilizando el programa de análisis Rotor-Gene Q[®] Series versión 2.0.2 (Qiagen). En este estudio particular, la metilación de los sitios CpG bloquea la digestión con *Bst*UI y permite la amplificación del fragmento resultando en un valor de C_t bajo. Por el contrario, si el sitio CpG no está metilado *Bst*UI puede cortar el ADN y así bloquear la amplificación del fragmento resultando en altos valores de C_t . El grado relativo de metilación en la región 5'UTR en estudio fue calculado mediante curvas estándar de C_t vs diluciones de ADN input (control interno) como se describe en la sección 3.1.8 (sin considerar la sustracción del control negativo detallada para ChIP).

Como parte de la optimización de esta técnica, evaluamos la recuperación cuantitativa de las medidas de metilación antes de realizar la comparación entre los grupos experimentales. Para esto, metilamos 1 μ g de ADN de fago λ (Promega) con 4 U de *Sss*I en 20 μ l de volumen de reacción con 1 \times NEBuffer 2 y 160 μ mol/L de S-adenosilmetionina (todos los reactivos de New England BioLabs, Beverly, MA) por 2 h a 37°C y luego inactivamos la enzima a 65°C por 20 min. El ADN 100% metilado fue diluido con ADN no metilado para realizar diluciones seriadas de 75%, 50% y 25% de metilación. Finalmente digerimos estas diluciones con *Bst*UI y medimos el

porcentaje de metilación como fue descrito por Bruce y col. (2008), utilizando el protocolo de amplificación por PCR en tiempo real descrito en esta sección para las muestras experimentales (T°a de cebadores λ (tabla 9): 57°C).

Tabla 9. Cebadores utilizados en los ensayos de MSRE-PCR.

Nombre	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Amplión (pb)
5'UTR	Sentido: AGTACTCGTGCCAAGGGGAAC	145
Exón 1	Antisentido: ATGGTCATGGTAAGTGGCAGC	
Exón C	Sentido: AGTCCCTGCCACTCCACATA Antisentido: CAAGAGCGTCTTTCCAGAAA	157
Input	Sentido: AAAGTTGGAGAACCCGGGAG Antisentido: WAGTYCCCCTTGGCACGAGTAC	127
λ	Sentido: CATCGTGGCATCTCGTTGAAG Antisentido: CTGCTTCCGTATCCTTCACCC	174

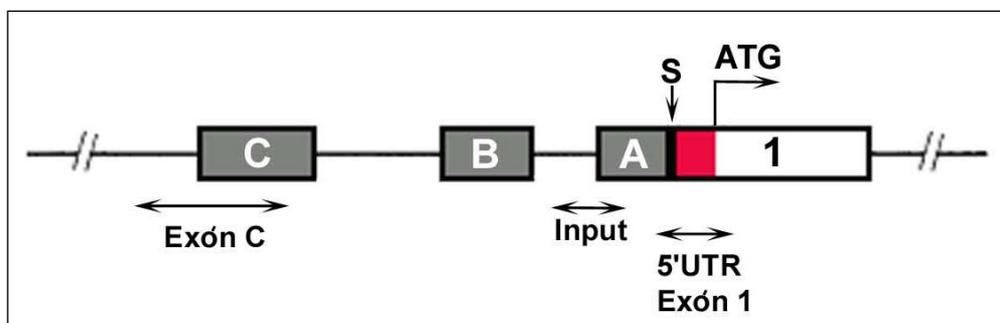


Figura 20 Regiones del gen ER α evaluadas por COBRA y MSRE-PCR. S, sitio común aceptor de corte y empalme del ARNm. En rojo se destaca la región 5'UTR del exón codificante 1, común a todas las variantes transcripcionales (adaptado de Kos y col., 2000).

3.3.9- Niveles séricos de 17 β -estradiol

La concentración de 17 β -estradiol fue determinada por RIA mediante el uso del kit DPC ¹²⁵I (17 β -estradiol double antibody, KE2D, Siemens Healthcare Diagnostics

Inc., Tarrytown, NY). De acuerdo al fabricante este método posee un límite de detección de 0,665 pg/mL y un coeficiente de variación intraensayo de 3.7% en el rango de medida de 1-8 pg/mL. Para la determinación se utilizaron los sueros de al menos quince animales por grupo de tratamiento.

3.3.10- Análisis estadístico

Todos los datos fueron calculados como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Las diferencias entre los distintos parámetros estudiados fueron obtenidas aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn (Siegel, 1956). Las diferencias fueron consideradas significativas sólo si $P < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Regulación estrogénica de la expresión del ER α en el hipocampo del adulto

4.1.1- Efectos del tratamiento con E2 sobre la expresión del ARNm del ER α en el hipocampo del ratón hembra adulto

Para evaluar los efectos de un tratamiento agudo con E2, ratones hembra adultos fueron OVX y tratados con una única inyección sc de 0,05 μ g E2/g de peso corporal. La respuesta se determinó a las 2 y 4 h post-inyección. Sólo se observó una disminución de la expresión del ARNm del ER α ($P < 0,05$, Fig. 21A) a las 4 h post inyección. A partir de este resultado, nos propusimos evaluar cuáles son los cambios moleculares que podrían explicar esta disminución de la expresión de ER α , analizando sólo los hipocampos de los animales a las 4 h post-inyección. De esta manera, determinamos si se producían cambios en la actividad relativa de los promotores transcripcionales del ER α evaluando, mediante RT-PCR en tiempo real, la expresión de los distintos transcritos con su respectivo exón 5'UTR. Para tal fin, se diseñaron cebadores-sentido específicos para los exones 5'UTR A, B, C, F1 y F1F2 y un cebador-antisentido específico para el exón 1 del gen ER α (descrito en la Tabla 2, ver sección *Materiales y Métodos*). Las condiciones óptimas de reacción fueron evaluadas en primer lugar utilizando un ADNc obtenido a partir de una muestra de útero de un ratón adulto, observando para todos los pares de cebadores una sola banda del peso molecular esperado (Fig. 22A).

En el hipocampo, detectamos que la expresión del gen ER α está regulada a través de los promotores A, C y F (Fig. 22B). No detectamos expresión de transcritos conteniendo el exón B en ninguno de los grupos estudiados en esta etapa del trabajo. En las hembras tratadas con E2 y sacrificadas a las 4 h post-inyección se observó una disminución de los transcritos ER α -A y ER α -C de aproximadamente 0,6 veces respecto de los controles ($P < 0,05$; Fig. 21B).

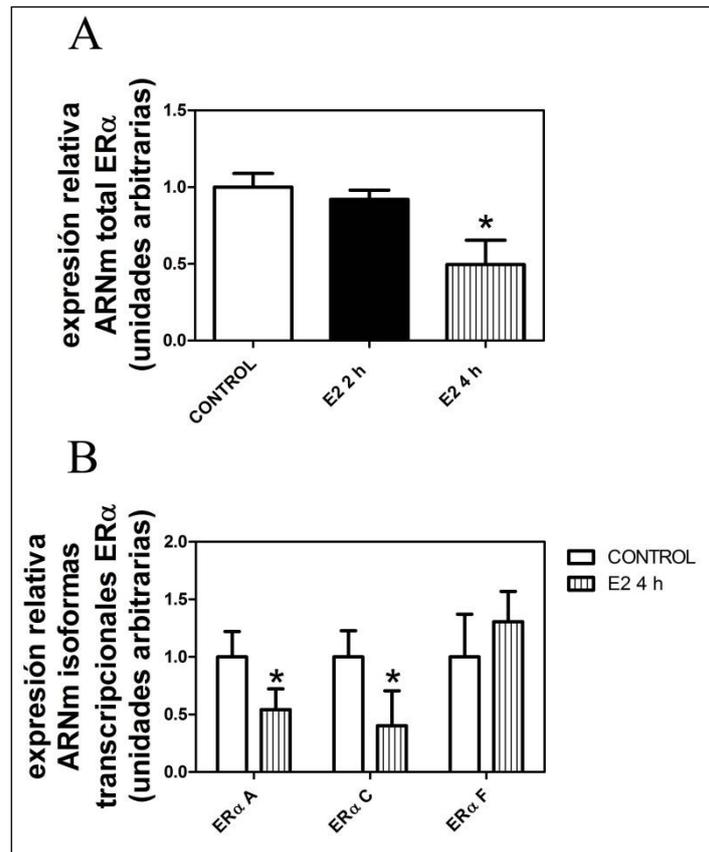


Figura 21 Efectos de un tratamiento con E2 sobre la expresión del ER α en el hipocampo de ratones hembra adultos OVX. (A) Cinética de la expresión del ARNm del ER α a las 2 y 4 h post-tratamiento. (B) Expresión de las distintas variantes transcripcionales del ER α durante el proceso de regulación hacia abajo del ARNm total a las 4 h post-tratamiento. 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 calcularon 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).

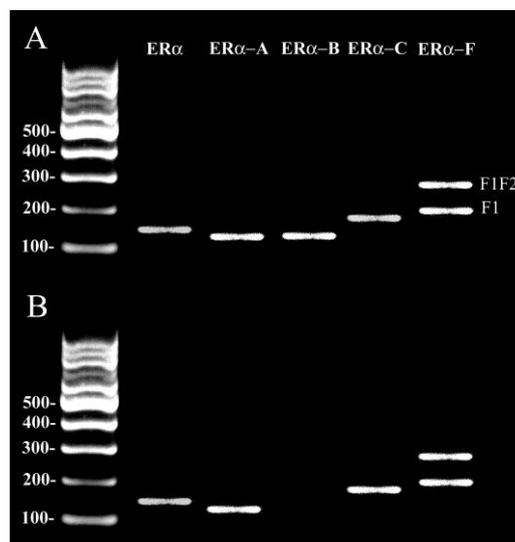


Figura 22 Promotores del gen ER α estudiados en el ratón. (A) Como control positivo de las reacciones de PCR específicas para los promotores se utilizó ADNc de útero de ratón adulto no experimental. (B) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio representativo de las especies de ARNm de ER α conteniendo los distintos exones 5'UTR en el hipocampo de ratones hembra adultos. En esta región no se detectaron transcritos provenientes del promotor B en ningún grupo experimental.

4.1.2- Expresión de variantes de delección del ER α en ratones hembras OVX

Conociendo que el tratamiento con E2 a las 4 h post inyección generaba una regulación hacia abajo del ARNm del ER α (cambios en la región 5'UTR del gen), determinamos si además se producía un cambio en la expresión de isoformas de delección del receptor en dichos animales (cambios en la región codificante del gen). Mediante RT-PCR de punto final con cebadores que flanqueaban el exón codificante cuya delección deseábamos estudiar, amplificamos fragmentos que luego fueron resueltos en gels de agarosa. En el análisis de los resultados de electroforesis sólo observamos una banda del tamaño molecular esperado para todos los amplímeros no delecionados (variantes $\Sigma 2$, 3, 4, 5, 6 y 7; Fig. 23) en todos los animales experimentales.

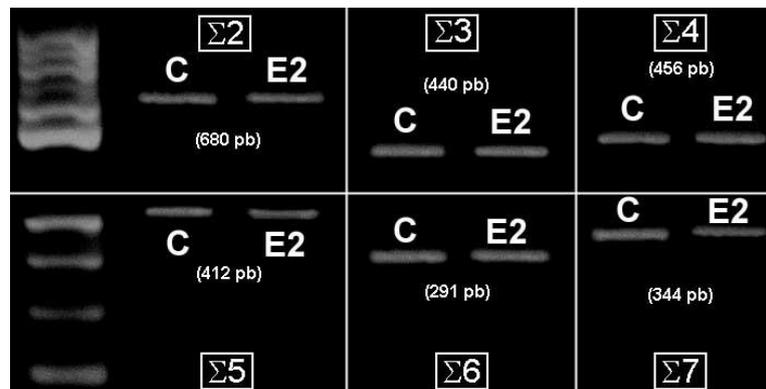


Figura 23 Expresión de isoformas de delección del ER α durante el proceso de regulación hacia abajo del ARNm total del receptor a las 4 h post-tratamiento con E2. La presencia de una única banda obtenida tanto a partir de ADNc de animales C como de E2 indicó la ausencia de expresión de variantes delecionadas tanto en animales controles como tratados.

4.1.3- Efectos del tratamiento con E2 sobre la expresión de la proteína ER α en el hipocampo a las 4 h post-inyección

Para determinar si las alteraciones producidas por el tratamiento con E2 a nivel de la expresión del ARNm de ER α son extensivas a la síntesis de la proteína determinamos por IHQ la expresión de ER α en diferentes regiones celulares del hipocampo (Fig. 24). Las regiones que presentaron una mayor inmunotinción para ER α en nuestro modelo experimental fueron las células del GD y la región CA1 del hipocampo. La inmunotinción observada con el anticuerpo anti-ER α fue claramente núcleo-citoplasmática en la capa celular granular (CCG) del GD mientras que en la región CA1 fue mayormente nuclear. En las hembras tratadas con E2 y sacrificadas a las 4 h, los niveles de proteína de ER α fueron menores en las regiones mencionadas ($P < 0,005$; Fig. 24B).

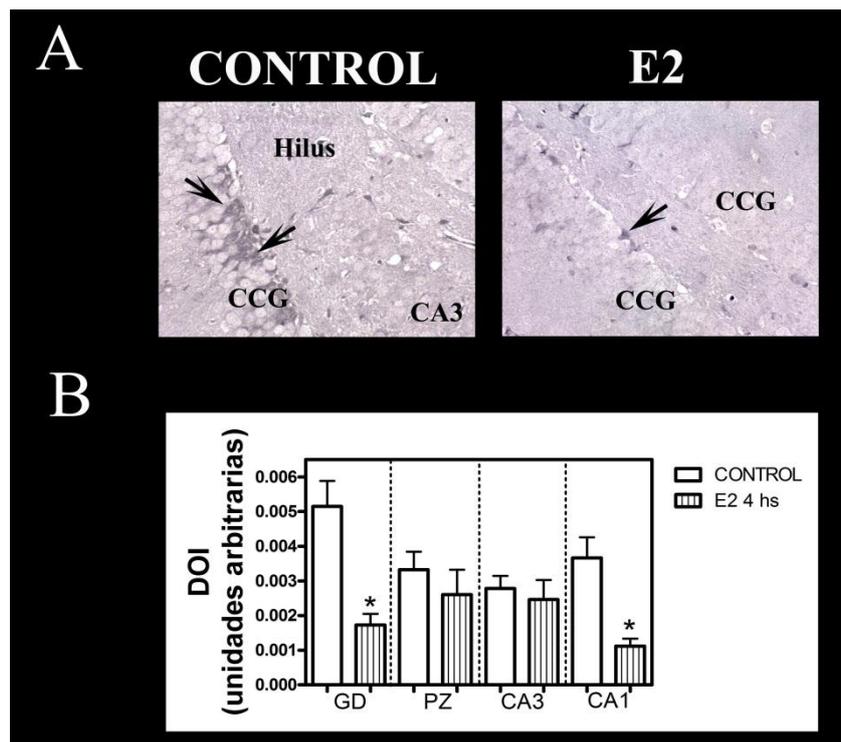


Figura 24 Efectos sobre la traducción del gen de ER α en el hipocampo a las 4 h del tratamiento con estrógenos. (A) Fotomicrografías representativas de la detección del ER α mediante inmunohistoquímica en el hipocampo de ratones control y ratones tratados con E2. El hipocampo fue identificado mediante la tinción de Nissl de un corte por serie y delimitado de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Las flechas negras indican marcación positiva. CCG, capa celular granular del giro dentado. Aumento original: 400x. (B) Cuantificación de los resultados obtenidos por inmunohistoquímica de la expresión de la proteína ER α . 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 hipocampo ocupada por las células positivas. Cada columna representa la media \pm E.E.M. de al menos seis secciones seriales por animal (n=5/grupo) (*, $P < 0,05$ vs. hembras control).

4.1.4- Efectos del tratamiento con E2 sobre la expresión de los cofactores de transcripción SMRT y REA en el hipocampo a las 4 h post-inyección

Un punto muy interesante de estudiar en la cascada de eventos de la respuesta estrogénica, es la expresión de factores de transcripción específicos. Para alcanzar este objetivo, se seleccionó a SMRT y REA como representantes de las familias de coactivadores-represores y represores, respectivamente, y se evaluó su expresión en el hipocampo mediante el uso de inmunohistoquímica.

La inmunotinción para el represor REA fue mayormente nuclear en el GD y núcleo-citoplasmática en las regiones CA3 y CA1. La expresión del cofactor SMRT fue mayor en el GD, presentando el mismo patrón de marcación núcleo-citoplasmático que el ER α (Fig. 25). Además, observamos una clara marcación de SMRT en fibras (probablemente las fibras musgosas provenientes de las células granulares del GD) ubicadas en el *stratum lucidum* de la región CA3 de todos los animales experimentales.

Los animales tratados con E2 y sacrificados a las 4 h presentaron un aumento de los niveles de expresión de la proteína REA en la región CA3 del hipocampo, y además una modificación en la localización de la proteína de citoplasmática a fuertemente nuclear. De manera contraria, la expresión de SMRT disminuyó en el GD como respuesta al tratamiento con E2 (Fig. 25).

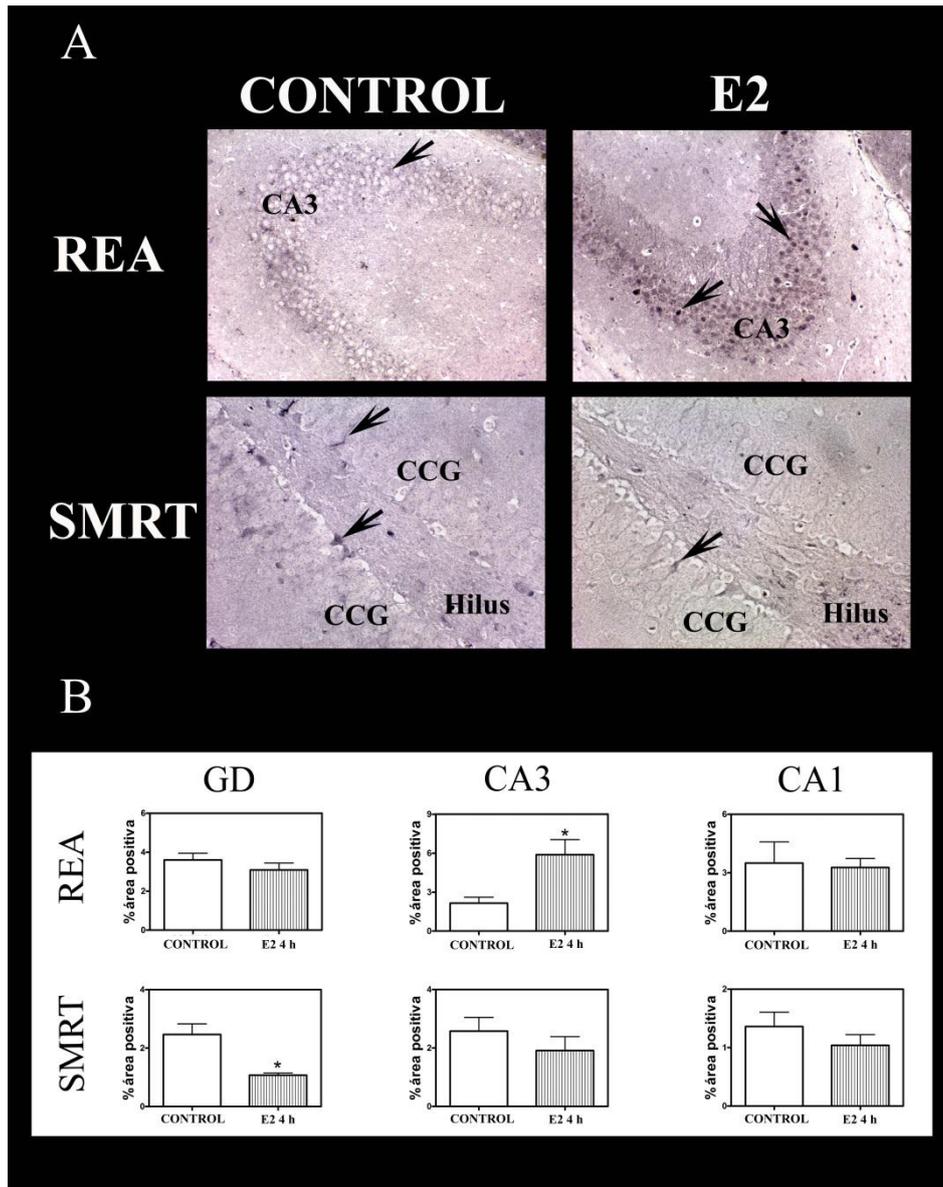


Figura 25 Expresión hipocámpal de los coreguladores de transcripción REA y SMRT durante la regulación hacia abajo del ARNm del ER α a las 4 h post-tratamiento. (A) Fotomicrografías representativas de la detección de REA y SMRT mediante inmunohistoquímica en el hipocampo de ratones control y ratones tratados con E2. El hipocampo fue identificado mediante la tinción de Nissl de un corte por serie y delimitado de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Las flechas negras indican marcación positiva. CCG, capa celular granular del giro dentado. Aumento original: REA, 200x; SMRT, 400x. (B) Cuantificación de los resultados obtenidos por inmunohistoquímica de la expresión de REA y SMRT. Los datos se expresan como el área relativa ocupada por las células positivas (% área +), y cada columna representa la media \pm E.E.M. (n=5/grupo experimental) (*, $P < 0,05$).

4.1.5- Análisis epigenético del estado de acetilación de las histonas H3 y H4 a las 4 h post-tratamiento con E2

La estructura de la cromatina desempeña un papel fundamental en la función del ADN. Regula procesos que se dan sobre la estructura nucleosomal como la transcripción, la replicación y la recombinación. Por lo tanto, determinar la distribución de las modificaciones específicas de las histonas puede proporcionar información valiosa acerca de cómo funcionan estas proteínas (y sus modificaciones) dentro del contexto de la cromatina. La Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) es un método bioquímico usado principalmente para determinar la localización en el genoma de histonas modificadas y de otras proteínas *in vivo*. En este contexto, dado que observamos una disminución de la expresión del ARNm del ER α a expensas de las variantes transcripcionales A y C, quisimos indagar si en dicho proceso regulatorio estaba involucrado un mecanismo epigenético de acetilación de histonas. Para esto estudiamos el grado de acetilación de las histonas H3 y H4, en tres regiones circundantes al exón C y dos regiones en el exón A. Para ambos exones se seleccionaron regiones ricas en CpG (Fig. 26).

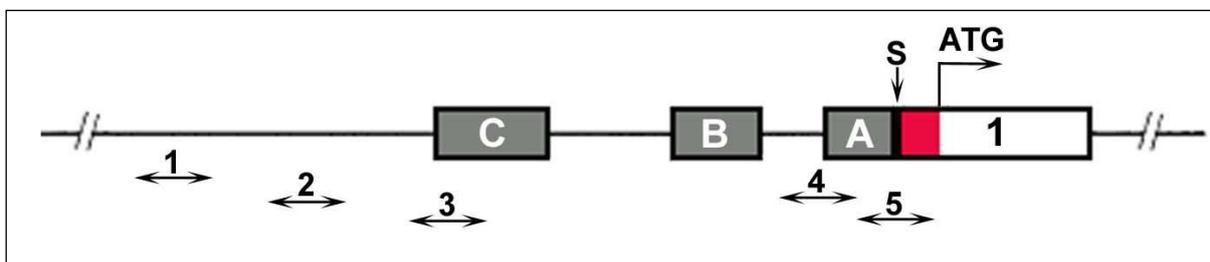


Figura 26 Esquema de la región 5'UTR del gen ER α evaluada por ChIP. Los fragmentos amplificados a partir del ADN inmunoprecipitado con flechas horizontales de doble punta: 1, 2 y 3 corresponden a los fragmentos amplificados por los cebadores Promotor C-I, Promotor C-II y C-SIT respectivamente. 4 y 5 corresponden a los amplímeros obtenidos con los cebadores Promotor A e Isla A respectivamente. Los fragmentos 3 y 5 incluyen regiones ricas en dinucleótido CpG los cuales podrían ligarse a procesos de metilación de ADN y reclutamiento de deacetilasas de histonas. S, sitio común aceptor de corte y empalme del ARNm. En rojo se destaca la región 5'UTR del exón codificante 1, común a todas las variantes transcripcionales (adaptado de Kos y col., 2000).

El estudio de ChIP develó que los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 en las regiones inmunoprecipitadas estudiadas no presentaban diferencias a las 4 h post-tratamiento con E2 (Fig. 27).

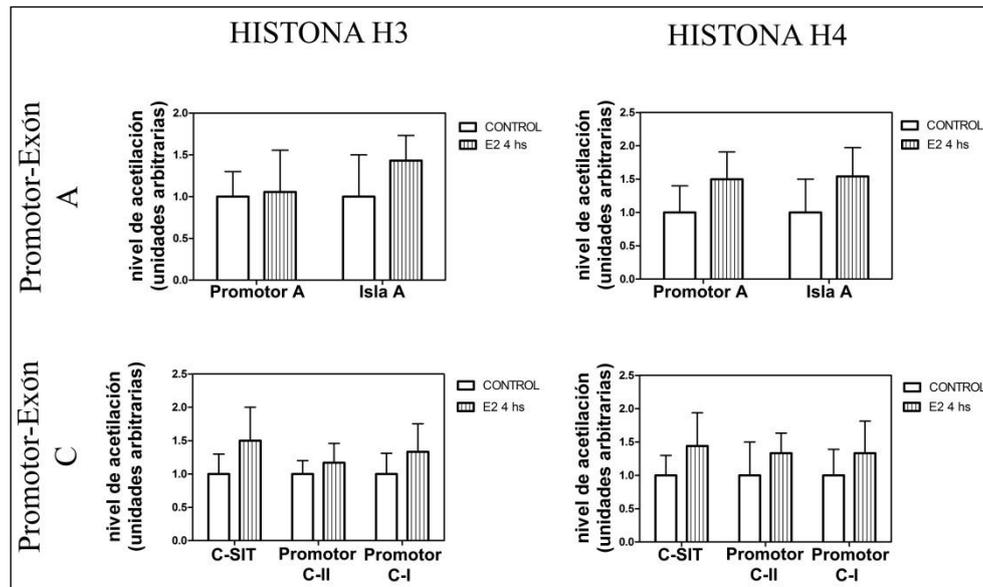


Figura 27 Grado de acetilación de las histonas H3 y H4 analizado por ChIP en las inmediaciones de los exones 5'UTR A y C de los animales E2 4 h. Las regiones amplificadas se muestran como pares de bases respecto al sitio de inicio de la transcripción del exón 5'UTR. Cada columna representa la media \pm E.E.M. (n=5/grupo).

4.1.6- Modificaciones en la expresión de genes estrógeno-sensibles a las 4 h post-tratamiento con E2

Sabemos que los estrógenos tienen la capacidad de regular la expresión del BDNF durante el desarrollo embrionario del hipocampo y durante la vida adulta en la rata, lo que lo convierte en un factor estrógeno sensible. Este descubrimiento provee información útil a la hora de comprender los mecanismos a través de los cuales las hormonas esteroides influyen sobre el desarrollo de las neuronas (Solum y Handa, 2002). En esta etapa de trabajo nos propusimos evaluar la cinética de expresión del ARNm del BDNF en el hipocampo, en respuesta al tratamiento agudo con E2. Para esto analizamos la expresión de BDNF en los animales controles, E2 2 h y E2 4h. La expresión del ARNm de BDNF presentó diferencias cinéticas en relación a los cambios en la expresión de $ER\alpha$ en los mismos animales. A las 2 h post-inyección con E2, mientras la expresión del $ER\alpha$ no se modificó, BDNF aumentó su expresión respecto a los controles. A las 4 h-post tratamiento la expresión del ARNm del BDNF disminuyó, alcanzando el nivel de expresión de los animales controles (Fig. 28). Esta

regulación hacia abajo de la expresión de BDNF coincide con la disminución de la expresión del ER α a las 4 h post-tratamiento.

Para conocer si el aumento en los niveles de expresión del ARNm de BDNF a las 2 h post-tratamiento se traducen en modificaciones a nivel de la proteína de BDNF, determinamos por IHQ la DOI de de la proteína en las diferentes regiones celulares del hipocampo (Fig. 29). La proteína se detectó en el citoplasma celular y mayormente en la zona polimórfica (hilus) del GD y el *stratum lucidum* de la región CA3. No observamos diferencias en la expresión proteica de BDNF a las 2 h post-inyección de E2 respecto de los controles.

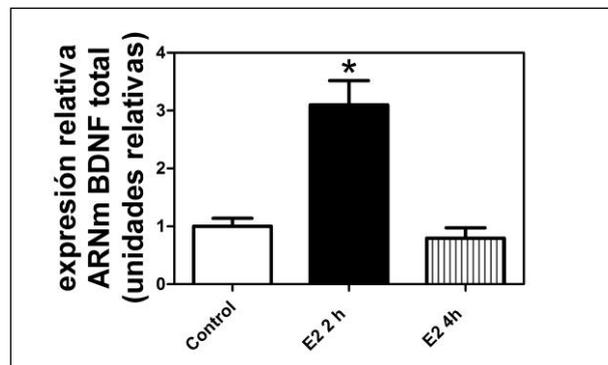


Figura 28 Cinética de la expresión del ARNm del BDNF a las 2 y 4 h post-tratamiento. A los controles se les asignó el valor de referencia de 1 y todos los valores se expresaron como la media \pm E.E.M de al menos tres determinaciones independientes (*, $P < 0,05$).

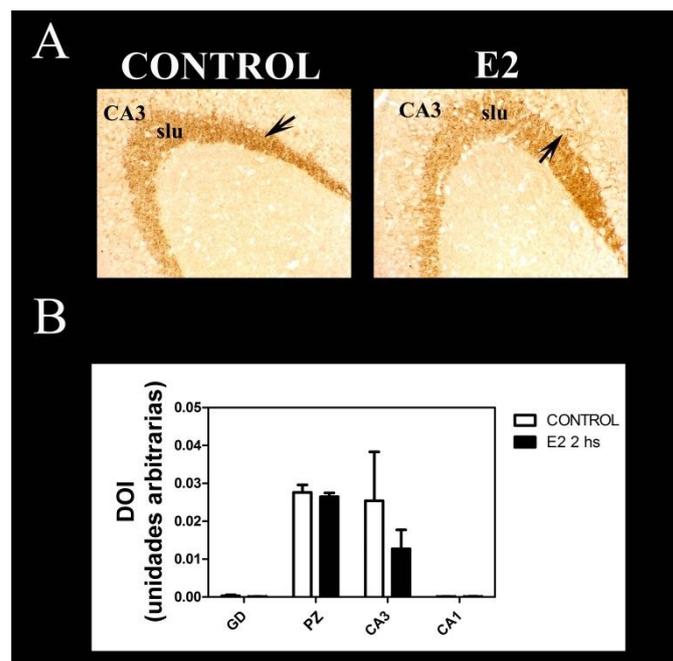


Figura 29 Efectos del tratamiento agudo con E2 (2 h) sobre la expresión del BDNF en el hipocampo de ratones hembra adultos OVX. (A) Fotomicrografías representativas de la detección del BDNF mediante inmunohistoquímica en el hipocampo de ratones control y ratones tratados con E2. El hipocampo fue identificado mediante la tinción de Nissl de un corte por serie y delimitado de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Las flechas negras indican marcación positiva. *slu*, stratum lucidum de CA3 . Aumento original: 200x. (B) Cuantificación de los resultados obtenidos por inmunohistoquímica de la expresión de BDNF. 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 hipocampo ocupada por las células positivas. Cada columna representa la media \pm E.E.M. de al menos seis secciones seriales por animal (n=5/grupo).

4.1.7- Niveles séricos de 17β -estradiol a las 4 h post-tratamiento

El ensayo de RIA confirmó que los animales castrados y tratados con E2 alcanzaron una concentración de 73 ± 9 pg E2/ml suero (similares a los detectados en el proestro del ciclo estral murino), mientras que los animales controles castrados no superaron los $4,0 \pm 3,3$ pg E2/ml suero (Fig. 30).

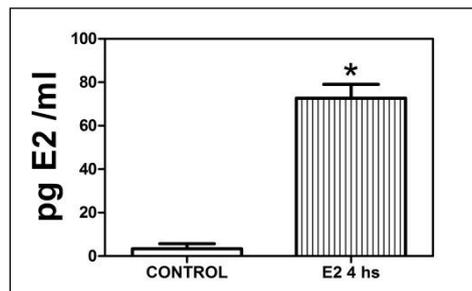


Figura 30 Niveles de estradiol sérico a las 4 h post-tratamiento. La sangre troncal fue recogida y se analizaron los niveles de 17β -estradiol por RIA. Cada columna representa la media \pm E.E.M. (n=15/grupo experimental).

4.2- Influencia del tiempo de privación de estrógenos endógenos sobre la eficacia de una THR basada en E2

4.2.1- El tiempo post-OVX transcurrido antes de la administración de la THR es crítico para la inducción estrogénica de proteínas neurotróficas

La expresión de BDNF, SYN y $ER\alpha$ fue determinada en la formación hipocampal mediante IHQ (Fig. 31). La inmunotinción para BDNF fue observada en el soma y las

proyecciones axonales de neuronas localizadas en las regiones CA1, CA3, PZ y GD. Se observó una inducción estrogénica de la expresión de BDNF específicamente en los animales que pasaron un corto período antes de empezar la THR (CPE), comparado con sus controles (CPC) (Fig. 32, $P < 0,01$). El incremento de BDNF fue observado en las regiones CA3 y PZ del giro dentado. Cuando la THR fue administrada 7,5 meses post-OVX, el E2 no fue capaz de inducir la expresión de la proteína BDNF (LPC vs LPE, Fig. 32).

También se determinó la expresión de SYN para conocer si el tiempo transcurrido antes de la administración de la THR podría afectar la plasticidad sináptica. Los animales que pasaron un corto periodo de castración (CPE) al momento de recibir E2 mostraron un incremento en la expresión de SYN en la región CA3 (Fig. 32, $P < 0,01$). En contraste, el tratamiento con E2 no indujo la expresión de SYN cuando fue iniciado 7,5 meses post-OVX (Fig. 32).

Las regiones hipocampales que mostraron mayor inmunotinción para ER α fueron CA3 y CA1. En la PZ y GD, las células ER α (+) fueron observadas sólo en forma dispersa (Fig. 31). El tratamiento con E2 resultó en una regulación hacia abajo del ER α , tanto en los animales CPE como en los LPE (Fig. 32).

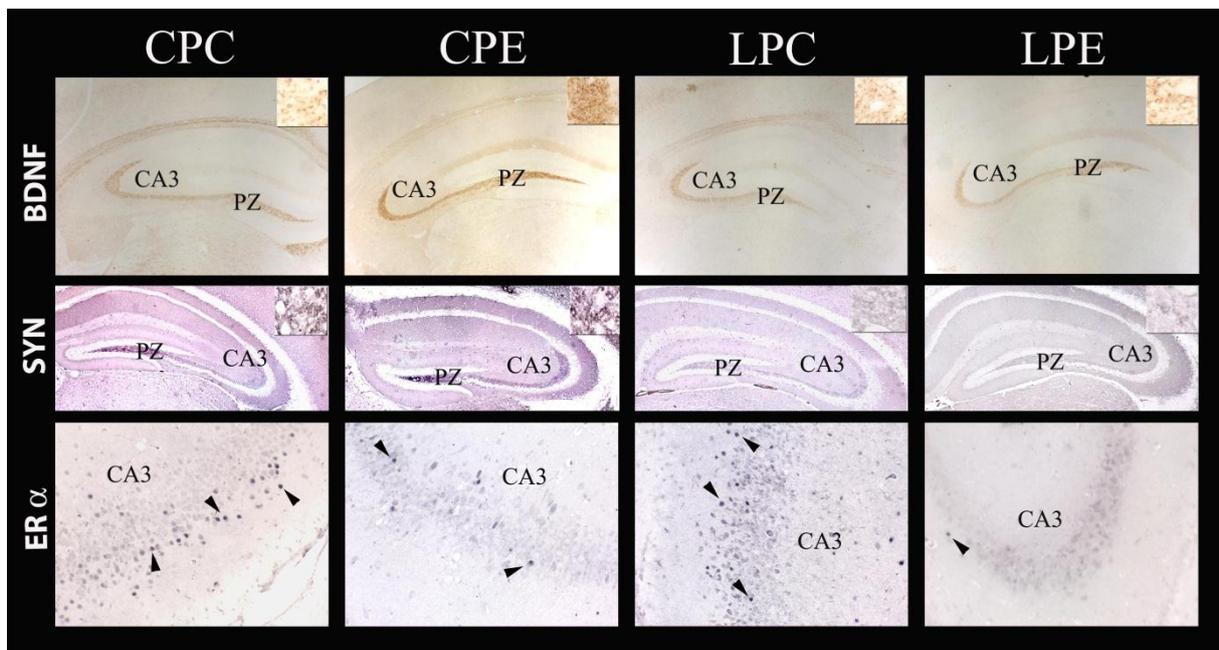


Figura 31 Fotomicrografías representativas de la detección por inmunohistoquímica de BDNF, SYN y ER α en el hipocampo de los animales CP y LP. Para el ER α la marcación nuclear positiva se indica por flechas negras. BDNF y SYN, aumento original: 40x; ER α , aumento original: 200x. Insets: 1000x.

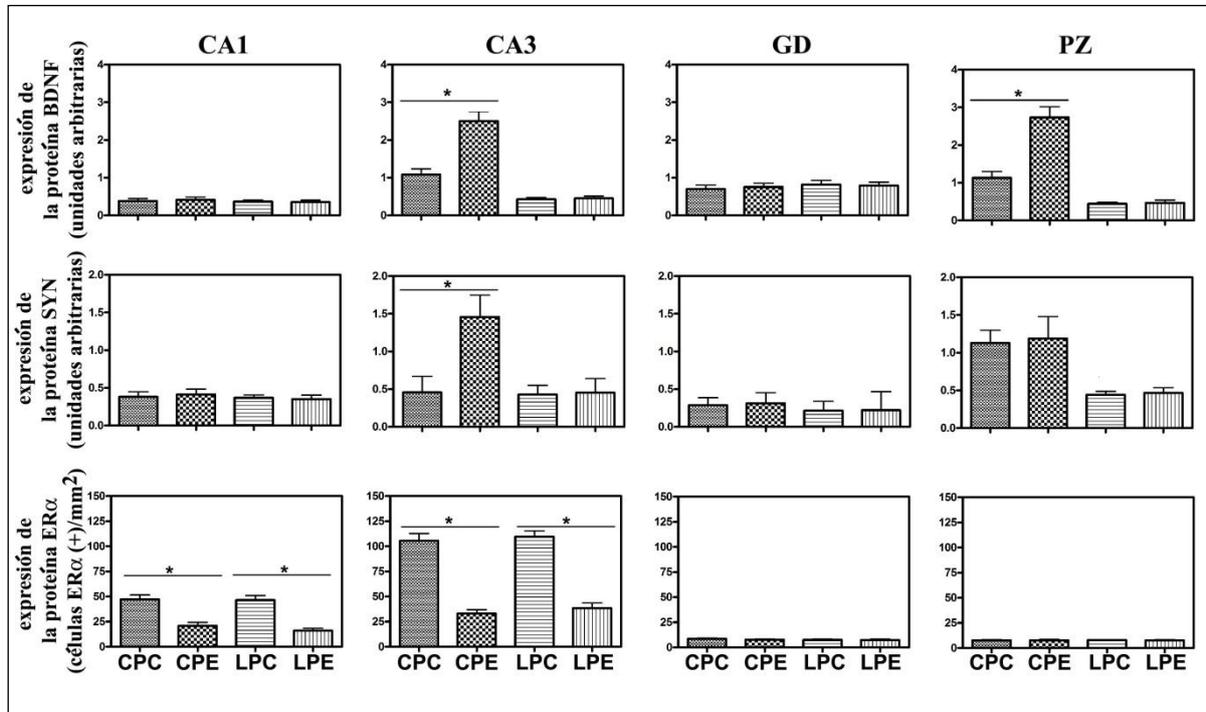


Figura 32 Cuantificación por IHQ de BDNF, ER α y SYN en las diferentes regiones del hipocampo. Un incremento significativo en la expresión de BDNF y SYN fue observado en la región CA3 de los animales CPE. El tratamiento con E2 produjo una regulación hacia abajo de ER α en las regiones CA3 y CA1. Las barras representan los valores promedio (\pm SEM) de seis animales por grupo (*, $P < 0.01$).

4.2.2- El tiempo post-OVX transcurrido antes de la administración de la THR afecta los niveles del ARNm de BDNF y sus variantes de splicing alternativo

La cuantificación de los niveles de ARNm total de BDNF fue realizada por RT-PCR en tiempo real mediante el uso de cebadores que hibridaron en la región codificante del exón VI (común a todas las variantes de splicing alternativo). En paralelo a los cambios observados en la expresión proteica, detectamos que el tratamiento con E2 produjo un incremento en la expresión del ARNm de BDNF de aproximadamente 2,5 veces en los animales CPE (Fig. 33, $P < 0,05$ vs CPC). Por el contrario, en los animales en los que el tiempo post-OVX transcurrido antes de la administración de E2 fue largo (LP), no se observaron diferencias en la expresión del ARNm de BDNF por el tratamiento con E2 (Fig. 33, LPC vs LPE).

Un análisis detallado de la expresión de ARNm reveló cambios en tres de los cinco transcriptos de BDNF (Fig. 33). De esta manera encontramos que la regulación hacia arriba del ARNm total de BDNF (observado en el grupo CPE) estaba mediada por el incremento en la expresión de las variantes IV y V (EIV-BDNF y EV-BDNF; $P < 0,01$). Adicionalmente, la variante EII-BDNF mostró un pequeño pero significativo incremento en el grupo CPE ($P < 0,01$ vs CPC). En el grupo LPE, esta variante EII-BDNF también mostró un incremento en su expresión ($P < 0,01$ vs LPC), sin embargo las demás variantes transcripcionales no se modificaron en los animales LP.

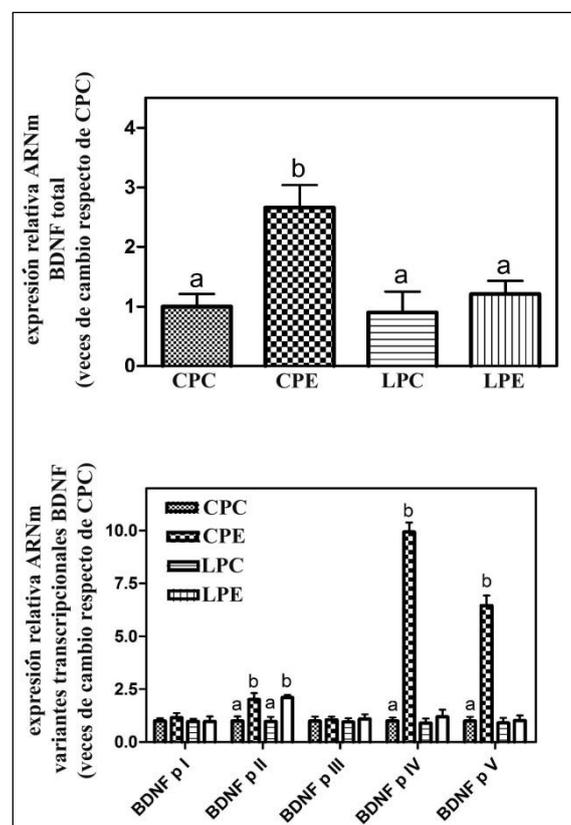


Figura 33 Efectos del tiempo de castración sobre la efectividad de la THR con E2 para incrementar los niveles de expresión de ARNm del BDNF en el hipocampo de ratones OVX. Los niveles relativos de ARNm fueron medidos por PCR en tiempo real y los resultados se calcularon mediante la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A los valores controles se les asignó el nivel de referencia 1. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$ vs. control) y los valores corresponden a la media \pm E.E.M (n=5 ratones/grupo).

4.2.3- Modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias de BDNF están asociadas a la pérdida de la respuesta estrogénica

Debido a que los animales que transcurrieron un tiempo post-OVX más prolongado antes de iniciar la THR, no mostraron un aumento en la expresión de BDNF por E2, investigamos los mecanismos epigenéticos que podrían estar implicados en la pérdida de respuesta al E2. Planteamos como hipótesis, que los niveles de metilación de regiones regulatorias en los promotores IV y V podrían estar afectados en los grupos LP. Las regiones estudiadas en el promotor IV se describen en la Fig. 34A.

Como mencionamos en la sección de Materiales y Métodos, para determinar los niveles de metilación optimizamos diferentes estrategias de estudio. Una de ellas fue el análisis mediante COBRA. En esta metodología utilizamos como muestra control positivo un ADN de ratón tratado con Sssl (este ADN presenta todos sus sitios CpG metilados, y lo definimos como M). Esta muestra fue digerida completamente por las enzimas de restricción, mientras que el ADN no metilado usado como control negativo (U) permaneció sin cambios (Fig. 34B). Dos regiones regulatorias en el promotor IV, los sitios DMS y CaRE, estaban completamente demetilados en todos los grupos experimentales debido a que no se observó digestión enzimática con las enzimas respectivas. Por el contrario, el sitio CRE del promotor IV mostró un alto nivel de metilación ($75 \pm 4\%$, $P < 0,05$) de manera independiente al tratamiento en los animales LP. Los grupos CP (CPE y CPC) presentaron los sitios CRE completamente demetilados (Fig. 34B).

El análisis epigenético de metilación en el promotor V de BDNF fue llevado a cabo utilizando la metodología de MSP en tiempo real. En la Fig. 34C se describe la región regulatoria analizada. Los resultados mostraron que la isla CpG estudiada presentaba un alto grado de metilación en los animales LP respecto a los animales CP ($P < 0,05$; Fig. 34D). En conjunto, esta información indicó que el hipocampo de los animales que transcurrieron un largo tiempo post-OVX presentó un incremento global en la metilación de regiones ricas en CpG de ambos promotores del gen BDNF. El tratamiento con E2 no produjo cambios en los niveles de metilación en ambos promotores.

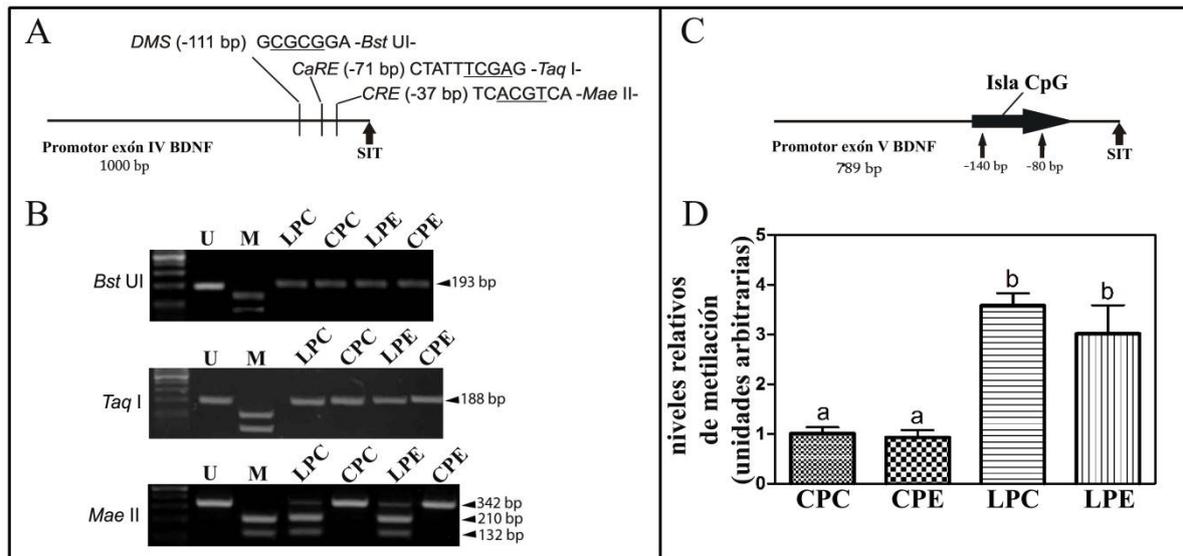


Figura 34 Estudio de los diferentes niveles de metilación en los promotores IV y V de BDNF. (A) Organización genómica de los sitios regulatorios en el promotor IV del gen BDNF de ratón. (B) Electroforesis en gel de agarosa (3%) representativa del ensayo COBRA con las enzimas de restricción *Bst*UI, *Taq*I y *Mae*II, utilizadas para evaluar los sitios DMS, CaRE y CRE respectivamente. Los gels muestran el patrón de tamaño molecular y las muestras control negativo (U) y positivo (M) utilizadas. Como se puede observar en el tercer gel los animales de ambos grupos LP presentan su ADN digerido, lo que indica un nivel de metilación del $75 \pm 4\%$. En contraste los grupos CP no presentan su ADN digerido (C) Posición de los dinucleótidos CpG en la isla CpG analizada en el promotor V del gen BDNF. (D) Evaluación cuantitativa de la metilación en el promotor V de BDNF por MSP en tiempo real. Los resultados se expresan como niveles relativos de metilación. Los valores de CPC fueron asignados al nivel de referencia 1. En el promotor V los niveles de metilación en los grupos LP son mayores que los de los grupos CP. Cada columna representa la media \pm E.E.M. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$ vs. CPC). bp: pares de bases; SIT: sitio de inicio de la transcripción del exón 5'UTR; DMS: sitio de metilación dependiente de despolarización; CaRE: elemento de respuesta a Ca^{2+} ; CRE: elemento de respuesta a AMP cíclico.

4.3- Influencia de la edad y la exposición a un ambiente enriquecido de largo plazo (9 meses) sobre la expresión del $ER\alpha$ en el hipocampo del adulto

4.3.1-El envejecimiento produce una caída del ARNm de $ER\alpha$ que no se revierte con el enriquecimiento

En esta etapa del trabajo comparamos la expresión del ARNm del $ER\alpha$ en animales controles jóvenes (CJ) de 4 meses de edad y animales de mediana edad (controles, C) de 11 meses. Mediante el uso de RT-PCR cuantitativa en tiempo real a partir de

muestras de ARN de hipocampo, encontramos que los niveles de expresión del ARNm total del ER α se encontraban disminuidos en los animales de mediana edad (Fig. 35B, $P=0,001$). Adicionalmente, evaluamos los efectos de la exposición a un ambiente enriquecido en animales sacrificados a los 11 meses de edad (enriquecidos, E). Estos animales no presentaron cambios en la expresión de ER α en relación a los animales controles de la misma edad (Fig. 35B, $P=0,46$). También determinamos mediante RT-PCR en tiempo real las isoformas transcripcionales de los respectivos exones 5'UTR del ER α de ratón (estos se esquematizan en la Fig. 35A). De manera similar al ARNm total, los niveles de expresión de las isoformas transcripcionales del ER α se encontraban disminuidos en los animales de mediana edad (ER α A ($P=0,02$), ER α C ($P=0,03$) y ER α F ($P=0,01$)). La exposición a un ambiente enriquecido no produjo efectos significativos sobre esta disminución ($P=0,99$, Fig. 35B). La actividad relativa de los demás promotores no fue examinada debido a que no se encontraron activos en el hipocampo.

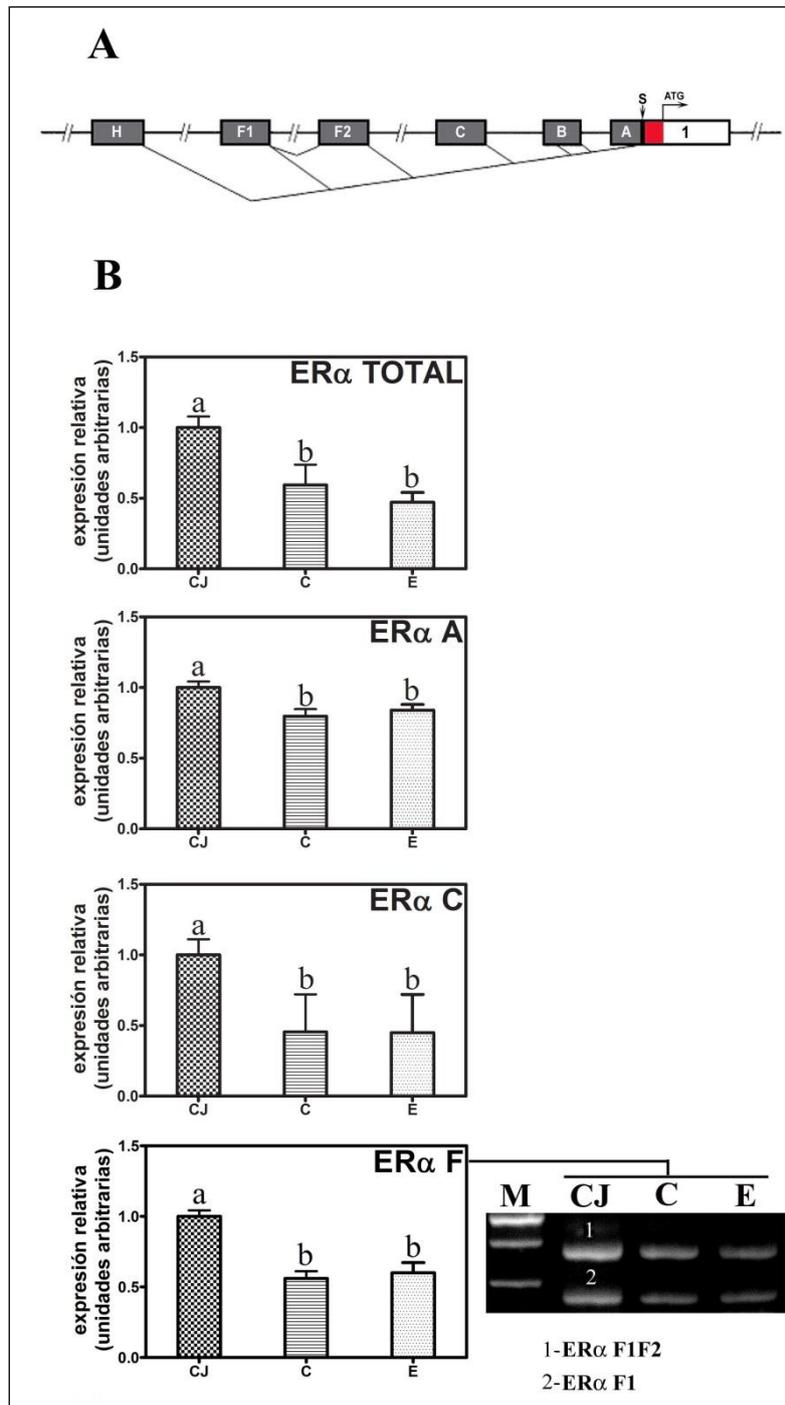


Figura 35 Efectos del envejecimiento y la exposición a un ambiente enriquecido sobre los niveles de expresión del ARNm del ER α en el hipocampo de ratones hembra. (A) Esquema de los exones 5'UTR del ER α . Todos los exones son cortados y empalmados a un sitio común (S) ubicado aguas arriba y cercano al sitio de inicio de la traducción y generan el mismo producto proteico. En rojo se destaca la región 5'UTR del exón codificante 1, común a todas las variantes transcripcionales. (B) Encontramos una disminución de la expresión del ARNm total del ER α de los animales de mediana edad que se mantuvo sin cambios frente a la exposición a un ambiente enriquecido. Las isoformas ER α A, C y F disminuidas permitieron explicar la caída de ER α a nivel ARNm total en los animales de edad avanzada (C). En el caso de la isoforma F, se muestra un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, donde se observan dos productos como resultado de la reacción de PCR

correspondientes a las isoformas F1 y F1F2. M, marcador de tamaño molecular. A los valores de los animales controles se les asignó un nivel de referencia de 1. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales ($P < 0,05$ vs. Control) y los valores se graficaron como la media \pm E.E.M (n=5 ratones/grupo).

4.3.2- El envejecimiento aumenta los niveles de metilación en la región 5'UTR del exón 1 y en el exón C del ER α y éstos no se modifican por la exposición a un ambiente enriquecido de largo plazo

La metilación de las citosinas de dinucleótidos CpG es un marcador estable sobre el ADN que se encuentra asociado con una disminución de la expresión génica y ha sido propuesto como un posible mecanismo que subyace a los efectos del envejecimiento sobre los mecanismos de expresión de los genes. Este estudio fue diseñado para evaluar la hipótesis de que los cambios en la expresión del ARNm del ER α durante el envejecimiento se corresponden con cambios en el patrón de metilación de la región 5'UTR del gen ER α (Fig. 36A). De esta manera, el análisis epigenético de metilación de ADN fue llevado a cabo mediante el análisis COBRA y sus resultados fueron confirmados y cuantificados por MSRE-PCR en tiempo real.

Debido a la ausencia de sitios de restricción evaluables por COBRA en las inmediaciones de los exones A y F, el análisis del estado de metilación se realizó para el exón C y para la región 5'UTR del exón codificante 1. Dado que esta última es común a todas las variantes transcripcionales de ER α , su estado de metilación podría afectar la transcripción global del gen. Los amplímeros digeridos por la enzima *Bst*UI en COBRA demostraron que los sitios de restricción estudiados tanto en la región no codificante del exón 1 como en el exón C se encontraban metilados en los animales de mediana de edad (grupo C) (Fig. 36B). Esto fue confirmado y cuantificado por MSRE-PCR en tiempo real. Esta metodología consiste en una simple digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación seguida de PCR cuantitativa en tiempo real. Como parte de la optimización de esta técnica, evaluamos la recuperación cuantitativa de las medidas del porcentaje de metilación, previo a la realización de la comparación entre los grupos experimentales. Para esto, sometimos diluciones seriadas (de 75%, 50% y 25% de metilación) de ADN de fago λ metilado *in vitro* (100% de metilación) a digestión con *Bst*UI y luego

cuantificamos por PCR por cuadruplicado. De esta manera comparamos el nivel de metilación detectado con el nivel de metilación esperado. El análisis de regresión lineal de los datos presentó una pendiente de 1,196 y un ajuste (R^2) de 0,988 (Fig. 36C).

Mediante esta metodología detectamos que la cantidad relativa de alelos metilados en los mismos sitios *Bst*UI evaluados por COBRA se encontraba incrementada en los animales de mediana edad (C) respecto de los animales jóvenes (CJ) (Fig. 36D y E). Adicionalmente, no encontramos diferencias en el nivel de metilación de las regiones estudiadas del gen $ER\alpha$ cuando comparamos los grupos de mediana edad E y C, es decir que la exposición al ambiente enriquecido no produjo cambios en el patrón de metilación estudiado.

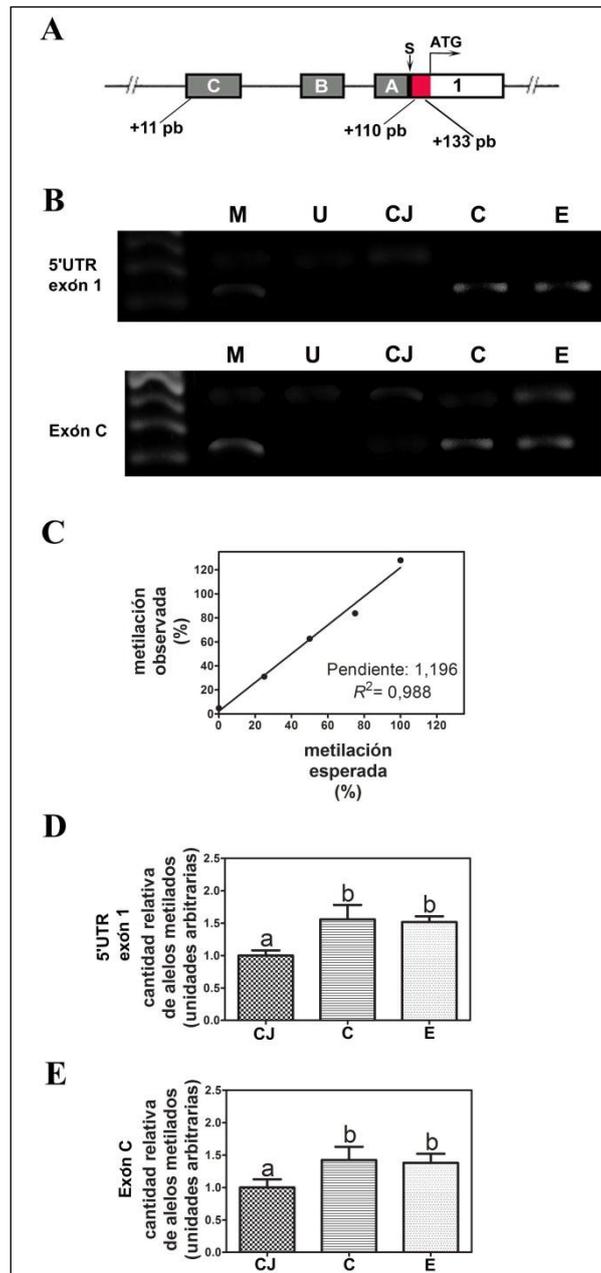


Figura 36 Cambios en el patrón de metilación de los exones 5'UTR del ER α durante el envejecimiento. (A) Localización genómica de los sitios *Bst*I evaluados en la región 5'UTR del exón 1 y en el exón C. Los dinucleótidos CpG pertenecientes a las islas CpG analizadas por COBRA se indican respecto al sitio de inicio de la transcripción de cada exón. S, sitio común aceptor de corte y empalme del ARNm. En rojo se destaca la región 5'UTR del exón codificante 1, común a todas las variantes transcripcionales. (B) Electroforesis en gel de agarosa (3%) proveniente del ensayo de COBRA con la enzima *Bst*I. M, control positivo proveniente de ADN metilado *in vitro*; U, control negativo de COBRA proveniente de ADN genómico no metilado de ratón. (C) Recuperación cuantitativa de las medidas del porcentaje de metilación. El porcentaje de metilación observado fue graficado contra el porcentaje de metilación esperado (proveniente de diluciones seriadas de ADN metilado *in vitro* en ADN no metilado). La línea sólida corresponde al resultado de la regresión lineal. (D y E), ensayo de MSRE-PCR en tiempo para la región 5'UTR del exón 1 y para el exón C respectivamente. Los resultados se expresan como los niveles relativos de alelos metilados. A los

valores controles (animales CJ) se les asignó un nivel de referencia de 1 y cada valor se grafica como la media \pm E.E.M. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ vs. CJ).

4.3.3- *El ambiente enriquecido revirtió la caída de ER α a nivel proteína que se produce por el envejecimiento*

Mediante IHQ se determinó el porcentaje de área inmuno-marcada para ER α . Se encontraron cambios entre los distintos grupos experimentales en las regiones hipocampales GD, PZ, CA3 y CA1, detectándose una mayor tinción en las neuronas piramidales del *cornus ammonis* del hipocampo (CA3 y CA1, Fig. 37A). Cuando comparamos la expresión de ER α entre animales controles jóvenes y de mediana edad (CJ y C) detectamos una caída de ER α de manera similar a lo observado para el ARNm de esta molécula. Sin embargo, sorpresivamente, la expresión de la proteína de ER α en los animales expuestos al ambiente enriquecido, se recuperó alcanzando valores de expresión similares a los animales jóvenes en las regiones GD y PZ. Es interesante resaltar que en las regiones CA1 y CA3 el enriquecimiento ambiental también produjo un aumento de la expresión del ER α pero llevándola a niveles superiores a los del grupo CJ (Fig. 37B). A pesar de esto, no encontramos diferencias significativas (CJ vs E, $P > 0,05$). Esto puede responder a que el $n = 6$ no nos permitió analizar la distribución normal de los datos, por lo que debimos evaluar los resultados con un test estadístico no paramétrico con menor potencia para detectar diferencias significativas.

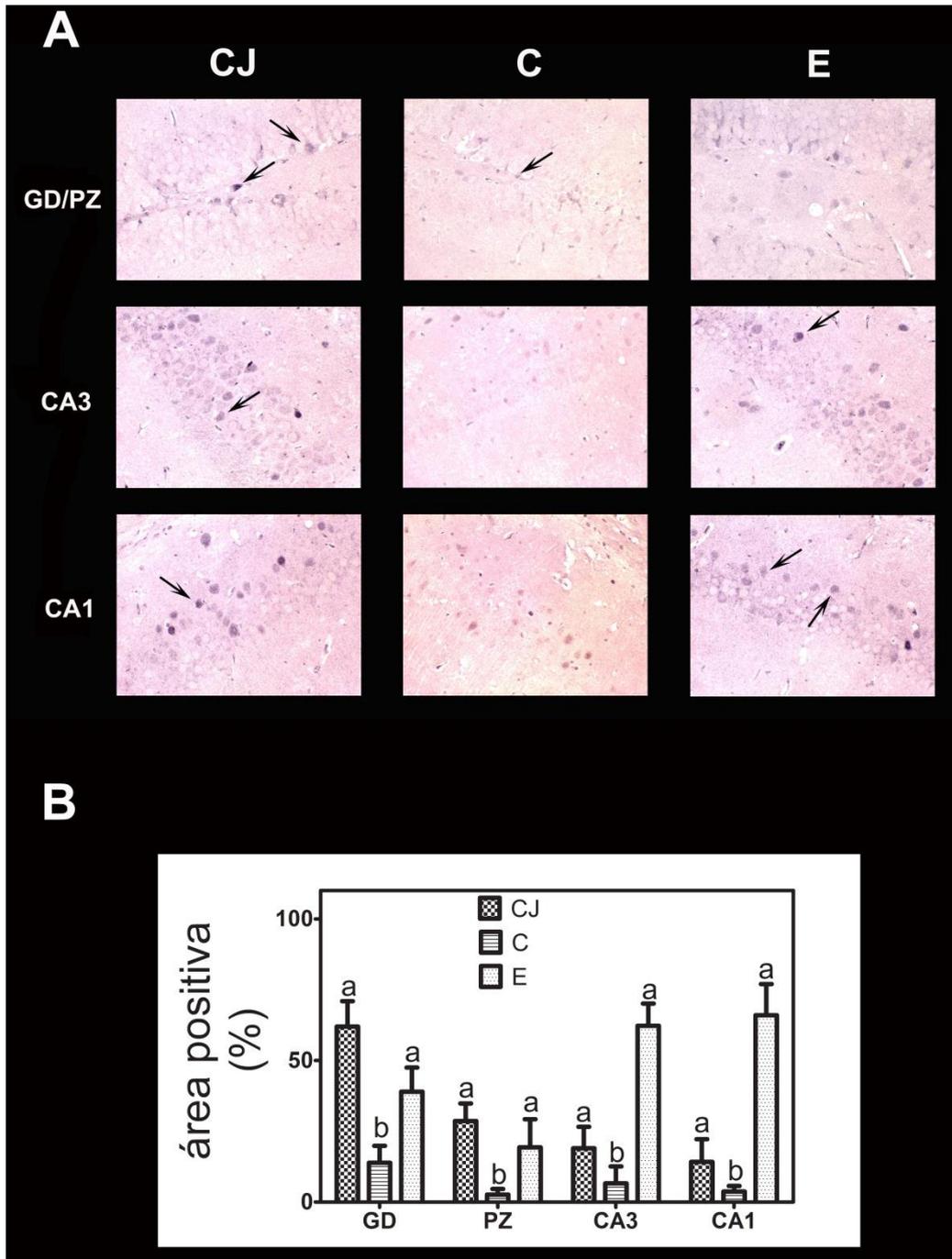


Figura 37 Análisis de IHQ para la cuantificación del ER α . (A) Fotomicrografías representativas de la detección del ER α en el hipocampo de ratones hembra jóvenes (CJ), de mediana edad controles (C) y de mediana edad expuestos a un ambiente enriquecido (E). Las flechas negras indican marcación positiva. Aumento original: 200x. (B) Resultados de la cuantificación del ER α en las diferentes regiones del hipocampo. GD, giro dentado del hipocampo. PZ: zona polimórfica del hipocampo. Las barras representan los valores de la media (\pm E.E.M.) de 6 animales por grupo. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ vs. CJ).

4.3.4- Los niveles séricos de E2 permanecieron inalterados en los ratones CF-1 de mediana edad

Para evaluar si el envejecimiento en nuestro modelo experimental se encontraba acompañado por una disminución de los niveles séricos de estradiol realizamos un ensayo de RIA para 17β -estradiol en los sueros de los animales experimentales. No encontramos diferencias entre los niveles séricos de E2 de todos los animales experimentales ($P=0,8$; Fig. 38). Los valores promedios detectados fueron de $4\pm 0,23$ pg/ml.

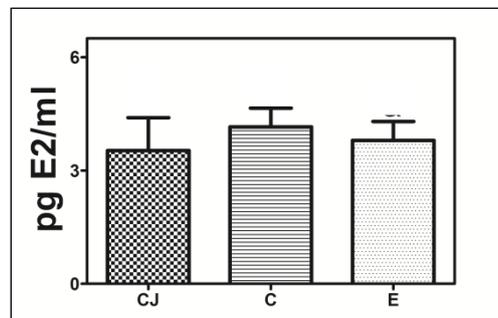


Figura 38 Niveles séricos de 17β -estradiol en los animales experimentales. Las barras representan la media \pm E.E.M de quince muestras de suero por grupo experimental.

5- Discusión

5.1- Regulación estrogénica de la expresión del ER α en el hipocampo del adulto

La diferenciación y plasticidad de las neuronas del hipocampo está regulada por los estrógenos. Estas hormonas influyen de forma general sobre funciones neurobiológicas tales como destrezas espacio-perceptuales, aprendizaje y memoria (Solum y Handa, 2002). Como mencionamos previamente, estas acciones hormonales pueden ser ejercidas a través del ER α en el hipocampo. Es importante destacar que los mecanismos que controlan la expresión del ER α son poco conocidos. Se ha sugerido que los promotores individuales, los elementos genómicos cis-reguladores, los factores de transcripción, el ER α en sí mismo y el contexto celular, podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de ER α en los distintos tipos celulares, pero esto aún no se ha dilucidado completamente (Lopez-Tarruella y Schiff, 2007; Wilson y col. 2011).

En la primer etapa de trabajo analizamos la influencia de un tratamiento agudo con E2 sobre la regulación transcripcional y postranscripcional (a las 2 y 4 hs post-tratamiento) de la expresión del ER α en el hipocampo de ratones hembra ovariectomizadas. Mediante RT-PCR en tiempo real encontramos que a las 2 hs post-tratamiento los niveles del ARNm total del ER α no presentaban cambios, mientras que a las 4 hs post-tratamiento mostraron una disminución. Las variaciones en la tasa de transcripción del ARNm del ER α asociadas a cambios en los niveles de E2 circulantes han sido documentadas para otras regiones cerebrales y modelos experimentales. Shughrue y col. (1992) demostraron que los niveles de ARNm del ER α en el hipotálamo de rata pueden variar durante el ciclo estral y aumentar después de una OVX. En el núcleo preóptico medial la transcripción del ER α fue más alta durante el estro y metaestro, se atenuó durante el diestro y bajó en proestro (mayores niveles de E2 circulantes). Por otro lado, el incremento de la expresión del ER α en las hembras OVX se observó en todas las regiones cerebrales investigadas (Shughrue y col., 1992). Otro estudio en corteza cerebral de ratón demostró una reducción de la expresión del ER α en hembras adultas OVX tratadas con E2

respecto a sus controles (Thakur y Sharma, 2007). Investigaciones previas utilizando hibridación *in situ* también revelaron que el tratamiento con estrógenos reduce notablemente el nivel de expresión de ARNm del ER α en el hipotálamo de ratas OVX, en comparación con la animales controles tratados con vehículo (Koch y Ehret, 1989; Lauber y col., 1991; Simerly y Young, 1991).

En relación a la proteína del ER α , observamos que los ratones controles OVX presentaban una expresión constitutiva en el núcleo de las células de las regiones CA1, CA3 y PZ mientras que en el GD la inmunotinción fue claramente núcleo-citoplasmática. De acuerdo con estudios previos, en órganos estrógeno-sensibles como el útero de la rata, el tratamiento con E2 puede regular hacia abajo la expresión de la proteína ER α (Nephew y col. 2000; Varayoud y col. 2005). En el hipocampo de la rata, se ha observado que los distintos niveles circulantes de E2 durante el ciclo estral pueden condicionar la expresión proteica del ER α (Mendoza-Garcés y col., 2011). En nuestro experimento, la expresión de ER α en el GD y la región CA1 del hipocampo ha demostrado ser sensible al tratamiento con estrógenos, mostrando una disminución en la expresión. En conjunto estos resultados sugieren que el tratamiento agudo con E2 disminuye la transcripción y traducción del ARNm de ER α en diferentes regiones cerebrales, incluido el hipocampo.

En continuidad con el trabajo nos propusimos determinar qué mecanismos moleculares podrían estar implicados en la regulación de la expresión génica de ER α por estradiol en el hipocampo. De esta manera, propusimos diferentes metodologías para abordar los posibles cambios a nivel de:

- el uso diferencial de promotores del gen de ER α
- la expresión de diferentes variantes delecionadas del receptor
- el nivel de acetilación de histonas en regiones regulatorias de los promotores
- la expresión de proteínas coreguladoras de la transcripción

Como mencionamos antes, un mecanismo involucrado en la regulación de la expresión génica implica el uso diferencial de promotores, evidenciado por cambios en la abundancia relativa de variantes transcripcionales con regiones 5'UTR diferentes (Westberry y Wilson, 2012; Hughes, 2006). El uso selectivo de promotores

transcripcionales de ER α mediado por estrógenos fue demostrado en varias líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Donaghue y col., 1999) y en el cerebro de la rata (Hamada y col., 2005). Además, reportes previos demuestran que la actividad diferencial de estos promotores es un regulador clave en la expresión tejido-dependiente de ER α (Kato y col., 1998; Donaghue y col., 1999).

En base a estos antecedentes determinamos la expresión de los transcritos A, C y F del ER α . Los resultados mostraron que la reducción en la expresión del ARNm del ER α observada a las 4 hs post-tratamiento se correlacionó con bajos niveles de los transcritos ER α -A y ER α -C. Estos resultados sugieren fuertemente que los promotores A y C son importantes para el control de la transcripción del ER α mediada por E2 en el hipocampo.

Otro proceso que puede intervenir en la regulación de la expresión génica es el de corte y empalme alternativo del pre-ARNm, un mecanismo celular que se ha propuesto para la generación de un pool de productos génicos derivados de un único gen. Mediante este proceso se producen diferentes isoformas de ER α , y aunque la relevancia biológica en tejidos normales no está bien establecida, sus funciones pueden ser predichas comparando la estructura de dichas isoformas delecionadas con la del ER α de secuencia completa (Pasqualini y col., 1999). Por ejemplo, la isoforma con deleción del exón codificante 3 (Σ 3) demostró ser incapaz de unirse a un ERE canónico (Wang y Miksicek 1991). Así se ha sugerido que la expresión en tejidos normales de la isoforma delecionada Σ 3 puede proporcionar un medio para bloquear la respuesta a los estrógenos (Pasqualini y col., 2001). Adicionalmente se ha reportado que el corte y empalme alternativo de los transcritos del ARNm del ER α puede ser influenciado por el medio ambiente hormonal de esteroides ováricos (Varayoud y col., 2005). En nuestro trabajo nos propusimos analizar la expresión de las isoformas de deleción Σ 2, Σ 3, Σ 4, Σ 5, Σ 6 y Σ 7 del ARNm del ER α a las 4 hs post-tratamiento. Como resultado, no detectamos expresión de variantes delecionadas en ningún grupo experimental, por lo que este mecanismo no estaría formando parte de las respuestas moleculares observadas frente al tratamiento con E2.

La acetilación/desacetilación de histonas es uno de los principales mecanismos epigenéticos que controlan la expresión génica mediante la modificación de la estructura de la cromatina (Marks y Xu, 2009). Este mecanismo ha demostrado estar críticamente implicado en la regulación de la transcripción mediada por receptores nucleares (Green y Carroll, 2007). En nuestro trabajo, nos propusimos determinar si, patrones diferentes en la acetilación de histonas en los promotores del gen ER α , podrían estar interviniendo en la regulación hacia abajo de los niveles de ER α -A y ER α -C detectados en nuestro experimento. Para esto, optimizamos una herramienta poderosa para estudios epigenéticos como es la técnica de CHIP a partir de tejido fresco. Específicamente determinamos los niveles de histonas H3 y H4 acetiladas en las inmediaciones del promotor-exón A y C del ER α . La alteración del estado de acetilación de histonas por acción de las hormonas esteroides sexuales durante el desarrollo temprano es importante para la diferenciación sexual del cerebro. Se comprobó que durante el período crítico de diferenciación sexual, las histonas asociadas a promotores de genes esenciales para la masculinización del cerebro (ER α y aromatasa) en el área preóptica medial fueron diferencialmente acetiladas entre los sexos (Matsuda y col., 2011). Se ha descrito incluso un mecanismo de represión de la transcripción del gen ER α mediado por el E2 que describe un fenómeno de autoregulación fisiológica del transcrita ER α . Este involucra la acetilación de histonas en el promotor del gen ER α resultando en una atenuación de su transcripción (Ellison-Zelski y col., 2009). En base a estos antecedentes esperábamos encontrar diferencias entre los niveles de acetilación de las histonas de los animales tratados con E2 y los controles, sin embargo no observamos diferencias entre los grupos experimentales. Por este motivo, el mecanismo de desacetilación de histonas no estaría involucrado en la regulación hacia abajo del ARNm del ER α , al menos en las regiones evaluadas por CHIP.

La expresión de coreguladores específicos de la acción del ER α podría ser otro posible mecanismo mediador de la regulación estrogénica de este receptor. Estos pueden ser coactivadores y corepresores y forman parte de un repertorio crítico de moléculas que interactúa con los receptores para permitir una respuesta apropiada a las hormonas. Un exponente clave de la familia de proteínas coreguladoras es el

repressor REA quien interactúa con el ER α y reprime la transactivación mediada por el mismo (Montano y col., 1999; Delage-Mourroux y col., 2000), lo cual lo postula como un potente modulador de la sensibilidad hipocampal a los estrógenos. La evidencia disponible apunta a REA como un regulador importante, el cual actuaría mediante retroalimentación negativa para controlar la expresión de genes ER-dependientes en células normales (Mussi y col., 2006). Nuestros resultados revelan que el tratamiento con 0,05 μ g E2/g de peso corporal aumenta la expresión de REA en la región CA3 del hipocampo. El resultado obtenido en este punto representa un dato importante a la hora de analizar la expresión de proteínas estrógeno-sensibles en dicha región hipocampal.

Desde su descubrimiento, SMRT (o NCoR 2) fue considerado como un corepresor (Smith y O'Malley, 2004) y principalmente se lo ha investigado utilizando modelos *in vitro* que permitan entender su mecanismo de acción, mientras que los estudios *in vivo* son escasos. Así, van der Laan y col. (2005) observaron que se expresa en el cerebro de la rata, y de manera particular, en el hipocampo. Los mecanismos moleculares por los cuales SMRT reprime la expresión génica parecen bastante complejos, y con el objetivo de profundizar el estudio y su influencia en el comportamiento biológico de los tumores, se ha demostrado que SMRT tiene un rol específico del tipo celular y que puede regular positivamente la actividad transcripcional del ER α (en presencia de un agonista) a través de la interacción con el dominio AF-2 del receptor (Peterson y col., 2007). Parecería que este rol positivo de SMRT en regular la expresión génica es específico para ER α , ya que las actividades dependientes de agonistas de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares resultaron negativamente regulados por este coregulador (revisado en Peterson y col., 2007). La idea de SMRT como un regulador tanto positivo como negativo y dependiente del tipo celular, quedó demostrada por experimentos *in vitro* en los cuales se pudo comprobar que la sobreexpresión de SMRT estimula la proliferación, mediada por ER α , de células de cáncer de mama humano (MCF-7) y células de carcinoma cervical humano (HeLa), pero no tiene influencia sobre células de hepatoma humano (HepG2) (Peterson y col., 2007). Nuestros resultados mostraron una disminución de la expresión de SMRT en el GD a las 4 hs post-tratamiento con E2, en coincidencia con una menor expresión de ER α a nivel proteína en la misma región. Este resultado nos permite sugerir que

SMRT podría actuar como un coactivador sobre la autorregulación de la expresión del ER α por el E2.

Uno de los mecanismos que se proponen para explicar la acción de los esteroides ováricos sobre la corteza y el hipocampo es a través de la modulación de la expresión de factores de crecimiento neurotróficos. Un integrante de la familia de las neurotrofinas es BDNF el cual está involucrado en la plasticidad sináptica y la neuroprotección (McAllister y col., 1999).

Los estrógenos tienen la capacidad de regular la expresión del BDNF durante el desarrollo embrionario del hipocampo y durante la vida adulta en la rata, lo que lo convierte en un factor estrógeno sensible. Este descubrimiento provee información útil a la hora de comprender los mecanismos a través de los cuales las hormonas esteroides influyen sobre el desarrollo de las neuronas (Solum y Handa, 2002). De hecho, el gen *BDNF* contiene una secuencia similar al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el sitio de inicio de traducción del exón codificante número VI, lo cual sugiere que su expresión sería controlada directamente por esta hormona (Sohrabji y col., 1995). Como parte de nuestro trabajo nos propusimos evaluar si los cambios de la expresión del ER α en respuesta al tratamiento con E2, podrían afectar la inducción estrogénica de BDNF. Para esto, estudiamos la cinética de expresión del ARNm de BDNF en el hipocampo de animales controles, y tratados con E2 a las 2 y 4h post-tratamiento.

A las 2 hs, la expresión del ARNm del BDNF aumentó significativamente respecto de los controles. Luego de 4 hs de haber tratado a los animales con E2 la expresión del ARNm del BDNF disminuyó aproximadamente 3 veces respecto de los niveles de los animales sacrificados a las 2 hs post-inyección y 0,2 veces respecto de los controles. Esta disminución en la inducción del ARNm de BDNF a las 4 hs post-tratamiento coincide con la disminución de la expresión del ARNm del ER α .

Resumiendo, los resultados obtenidos en este periodo de trabajo, indican que, a las 4 hs post-tratamiento con E2, en el hipocampo se produce una regulación hacia abajo del ER α que podría estar ligada, al menos en parte, a una disminución de la actividad relativa de los promotores A y C del ER α . De acuerdo a las regiones regulatorias evaluadas de estos promotores el mecanismo epigenético de acetilación

de histonas no estaría involucrado en esta regulación. Para poder explicar los mecanismos que subyacen a la disminución de la expresión de las variantes ER α -A y ER α -C será necesario considerar otros mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional tales como la remodelación de la cromatina por metilación, fosforilación, etc (Frick y col., 2011), e incluso la influencia del extremo 5'UTR de los transcritos en su estabilidad o procesamiento (Kos y col., 2001). En líneas celulares de tumores de mama se ha documentado la regulación del ER α a nivel post-transcripcional por medio de micro-ARN que interfieren en la expresión del ARNm y de la proteína (Adams y col., 2007). Un análisis de ARN de interferencia también podría brindarnos mayores detalles de los mecanismos que involucran la compleja regulación estrogénica post-transcripcional del ER α .

5.2- Influencia del tiempo de privación de estrógenos endógenos sobre la eficacia de una THR basada en E2

En esta etapa del trabajo, nos propusimos conocer si el tiempo que el ratón hembra pasa privado de su función ovárica, modifica la capacidad transcripcional de la vía estrogénica en el hipocampo. Los resultados mostraron que, el tiempo post-OVX transcurrido antes de la administración de la THR, es crítico para la inducción de la expresión de proteínas neurotróficas mediadas por E2, tales como BDNF y SYN.

La disminución de los niveles de hormonas ováricas durante la menopausia puede influenciar las habilidades cognitivas de las mujeres adultas mayores y existe evidencia de que la THR con E2 puede proveer beneficios en algunas, pero no en todas las mujeres. Es probable que las respuestas positivas estén relacionadas con el momento en el que se realiza la THR luego de la declinación de los niveles de E2 (Walf y col., 2009). En este sentido, la hipótesis del período crítico, que propone que *“los beneficios cognitivos de los estrógenos sólo pueden ser evidentes si se administran cerca del momento de la menopausia”*, está siendo investigada como una posible explicación (Frick, 2012; Scott y col., 2012).

Los resultados de experiencias provenientes de investigación básica con roedores indicaron que la respuesta del sistema nervioso en los mamíferos a los estrógenos está alterada luego de un periodo de privación de hormonas ováricas (Daniel y Bohacek, 2010).

Adicionalmente, muchos estudios sobre conducta sexual revelaron una habilidad disminuida del E2 para inducir esta conducta en ratas OVX si éste es administrado luego de un prolongado periodo de deprivación hormonal (Clark y col., 1981; Czaja y Butera, 1985). Por otro lado, el tratamiento con E2 iniciado a los tres meses pero no a los diez meses luego de la OVX, incrementó la adquisición de memoria espacial de ratas envejecidas en un test de laberinto T (Gibbs, 2000). En concordancia con estos antecedentes, la mayor prueba de THR controlada y aleatoria que se realizó hasta la fecha, WHIMS, no sólo no logró detectar un efecto beneficioso del E2 o E2+progestina sobre la declinación cognitiva sino que también encontró que este tipo de terapias generaron daños (deterioro cognitivo y demencia) en mujeres que tenían un promedio de 72 años en el momento de la iniciación de la terapia (Sherwin, 2009; Coker y col., 2010; Craig y col., 2005).

La duración del tratamiento con E2, el intervalo de tiempo post-OVX y la edad al momento de iniciar la THR (Cavus y Duman, 2003; Adams y col., 2001; Berchtold y col., 2001; Miranda y col., 2004) son todos factores importantes en la regulación de sistemas celulares específicos. Hasta el momento, los mecanismos moleculares asociados a estos eventos no están completamente elucidados. Durante esta etapa de trabajo evaluamos la hipótesis de que el tiempo post-OVX transcurrido antes del inicio de la THR es crítico para la inducción estrogénica de la expresión de proteínas neurotróficas en el hipocampo del ratón. En este sentido, encontramos que el tratamiento con E2 incrementó los niveles tanto del ARNm como de la proteína de BDNF sólo si el tiempo post-OVX transcurrido antes de la THR fue corto (15 días para los animales CPE vs 7,5 meses para los animales LPE).

Numerosos estudios han examinado el efecto del E2 sobre la expresión del ARNm de BDNF en ratas hembras. Los resultados mostraron que la privación crónica de E2 redujo los niveles del ARNm de BDNF en diferentes regiones corticales e hipocampales (Singh y col., 1995; Berchtold y col., 2001). Los niveles del ARNm de BDNF, en algunas regiones del hipocampo, se recuperarían luego de 5 a 25 semanas de THR. Esto sólo se produce si la THR es iniciada relativamente rápido luego de la OVX (dentro de las 3 semanas posteriores) pero no luego de una prolongada privación de E2 (Berchtold y col., 2001). En concordancia con estas observaciones, se ha visto que otras moléculas como el ácido N-metil-D-aspartico o

receptores muscarínicos y la actividad de la acetilcolinesterasa en el hipocampo, se modifican de acuerdo al intervalo post-OVX en el que se inicia la THR (Pereira y col., 2008).

En continuidad con el estudio, nos interesó determinar qué variantes transcripcionales de BDNF se modificaban en respuesta a la THR. El análisis por PCR en tiempo real nos permitió detectar que el incremento en la expresión de BDNF en el grupo CPE, estaba asociado a una mayor inducción de la expresión de las variantes IV y V de BDNF y de la variante II en menor medida. La inducción específica de estas variantes a causa de la THR podría estar íntimamente relacionada con su estabilidad y/o los compartimentos intracelulares en los que son traducidos (Liu y col., 2006).

Resultados previos han demostrado que la expresión de BDNF puede ser regulada por modificaciones epigenéticas, tales como un mayor grado de metilación de regiones regulatorias, desencadenando su silenciamiento (Roth y Sweatt, 2011; Chen y col., 2003; Dennis y Levitt, 2005). Estudios en córtex prefrontal de ratas sometidas a maltrato maternal se encontró un incremento en la metilación del promotor IV de BDNF y la consecuente disminución de los niveles del ARNm (Fagiolini y col., 2009). Estos descubrimientos establecen una relación entre modificaciones epigenéticas y la regulación a largo plazo de la expresión de BDNF. De hecho, existe evidencia que sugiere que ciertos procesos que involucran el remodelamiento de la cromatina en la región promotora del gen *BDNF* pueden regular la expresión de sus variantes transcripcionales (Martinowich y col., 2003; Chen y col., 2003; Aid y col., 2007). En nuestro trabajo, las diferencias encontradas en los niveles de expresión de las variantes de transcripción de BDNF, nos llevaron a preguntarnos si la pérdida de respuesta al tratamiento con E2 observada en los animales LPE se debía a cambios epigenéticos que podrían disminuir la actividad de los promotores IV y V. Nosotros postulamos que el silenciamiento podría deberse a procesos de metilación de ADN en elementos *cis*-reguladores localizados en los promotores. Para estudiar este posible silenciamiento, optimizamos diferentes metodologías que emplean un tratamiento del ADN de la muestra con bisulfito de sodio y el análisis posterior por PCR de sitios CpG regulatorios posibles de

encontrarse metilados tanto en el promotor IV como V. Los resultados del análisis de COBRA mostraron que las regiones regulatorias DMS y CaRE en el promotor IV no estaban metiladas en los cuatro grupos experimentales. Sin embargo, en la región regulatoria CRE de los animales que transcurrieron un largo período de castración, encontramos un alto número de alelos metilados, indicando un posible freno en la actividad de este promotor. Se ha establecido que el E2 tiene la habilidad de estimular la acumulación de AMPc en las neuronas hipotalámicas (Gunaga y col., 1974) y células de neuroblastoma humano (Watters y Dorsa, 1998). Esto genera un incremento en la fosforilación de CREB y la activación de la transcripción de genes que poseen elementos de respuesta a AMPc. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la actividad de CREB sea un punto de convergencia de eventos provenientes de múltiples señales de transducción mediados por E2 (Green y Simpkins, 2000). En conjunto, estos resultados podrían indicar que una manera por la cual el tiempo de castración puede afectar la inducción estrogénica de la expresión de BDNF es a través de la metilación de regiones regulatorias, en particular la región CRE del promotor IV.

Para la evaluación de los niveles de metilación del promotor V se desarrolló una metodología de PCR en tiempo real específica de metilación (MSP) descrita previamente. Los resultados mostraron que los animales LP tenían niveles de metilación más altos que los animales CP en la isla CpG estudiada. Estos resultados junto a los de COBRA estarían indicando que la falla en la inducción estrogénica de BDNF en los animales LP puede estar asociada a un silenciamiento transcripcional de los promotores IV y V del gen BDNF como consecuencia del alto grado de metilación de sus secuencias.

Otra proteína inducida por E2 que evaluamos fue SYN. Esta forma parte de las vesículas presinápticas presentando un papel muy importante en la plasticidad sináptica y la función cognitiva (Sze y col., 2000). La pérdida de expresión de SYN en el hipocampo se correlacionó con la declinación cognitiva en la enfermedad de Alzheimer (Bittner y col., 2010). De manera contraria, se cree que el incremento de la expresión de proteínas sinápticas puede ser parcialmente responsable del mejoramiento del aprendizaje y la memoria luego de la administración de una THR en ratones tratados con E2 (Pan y col., 2010). En nuestro trabajo, la THR incrementó

de manera significativa los niveles proteicos de SYN en los animales CPE. Por el contrario, el E2 no indujo la expresión de SYN cuando el tratamiento fue iniciado después de 7,5 meses post-OVX (LPE). De la misma manera que ocurrió con la respuesta de BDNF, la inducción de SYN fue afectada cuando el tratamiento con E2 se inició luego de un largo periodo de castración.

Adicionalmente nos propusimos determinar en los diferentes grupos experimentales diseñados, si la expresión de ER α se modificaba. Este receptor fue evaluado teniendo en cuenta que uno de los mecanismos por los cuales el E2 puede incrementar la expresión de BDNF en el hipocampo incluye la inducción de su expresión por acción del ER α nuclear (Spencer y col., 2008). Mediante IHQ detectamos una regulación hacia abajo del ER α en respuesta al E2, y esta respuesta fue la misma en los animales LPE como en los CPE. Por lo tanto, en nuestro modelo experimental, las diferencias encontradas en la respuesta del BDNF al E2 no estarían asociadas con un cambio en la expresión del ER α en las neuronas hipocampales.

En conclusión, los resultados de esta etapa de trabajo proporcionan apoyo para la hipótesis del período crítico, e indican que la capacidad de un tratamiento con estrógenos para afectar la expresión de proteínas neurotróficas es atenuada luego de una privación hormonal ovárica de largo plazo. El incremento en la metilación del gen *BNDF* que detectamos podría explicar la falla en su respuesta al E2 como consecuencia de una carencia crónica de hormonas ováricas. Estudios adicionales sobre otras vías epigenéticas contribuirán a un mejor entendimiento de los mecanismos a través de los cuales el E2 puede regular la expresión de BDNF en el cerebro.

5.3- Influencia de la edad y la exposición a un ambiente enriquecido de largo plazo (9 meses) sobre la expresión del ER α en el hipocampo del adulto

La mayoría de las acciones de los estrógenos en el cerebro están mediadas por el ER α que a su vez está regulado por varios factores tales como los niveles circulantes de las hormonas esteroideas gonadales E2 y testosterona, el sexo y la

edad (Thakur y Sharma, 2008). En relación a los efectos de la edad, se ha demostrado que la habilidad del E2 para influir en los eventos neuroquímicos críticos para la ciclicidad reproductiva y la conducta, disminuye como consecuencia de los mismos. Una disminución de los niveles del ARNm del ER α podría explicar la pérdida de respuesta del cerebro al estradiol, pero el mecanismo que explicaría este fenómeno es tema actual de estudio (Wilson y col., 2002). En esta parte del trabajo nos propusimos determinar las modificaciones en la expresión de ER α con la edad y detectamos una disminución de la expresión de ER α en el hipocampo asociada al envejecimiento de los animales. Cuando determinamos los niveles séricos de estradiol detectamos que los mismos se mantuvieron constantes en los grupos experimentales estudiados, por lo que la disminución de la expresión del ARNm del ER α en este experimento no estaría vinculada a cambios en los niveles séricos de la hormona.

Como mencionamos previamente la regulación epigenética de los receptores nucleares ha sido ampliamente estudiada en numerosos procesos como en el desarrollo tumoral (Lapidus y col., 1998), pero el papel potencial de la modulación epigenética del ER α durante el envejecimiento del cerebro no ha sido analizado. Los resultados previos indican que las islas CpG en las regiones promotoras del gen *ER α* están metiladas diferencialmente a lo largo de toda la vida de una manera específica a la región del cerebro, la edad, el sexo, y la exposición hormonal neonatal del animal (Schwarz y col., 2010). Por ejemplo, diversos estudios en hipotálamo de rata durante el desarrollo temprano arrojaron evidencias de que las diferencias sexuales en el patrón de metilación del ER α son controladas epigenéticamente (Schwarz y col., 2010). Otros laboratorios han demostrado que pueden existir diferencias en el patrón de metilación del promotor del *ER α* en el área preóptica medial de ratas adultas, en función de la atención materna a temprana edad (Champagne y col., 2006). Por otro lado, Westberry y col., encontraron que en la corteza de ratones machos y hembras, una disminución significativa de la expresión del ARNm del ER α se correspondía con un nivel incrementado de metilación de los exones 5'UTR A y C (Westberry y col., 2010). Un análisis más detallado de metilación mediante pirosecuenciación también reveló un aumento de la metilación de la mayoría de los loci a lo largo del desarrollo. Estos datos sugieren que los cambios en el patrón de metilación de los exones 5'UTR del ER α son los

responsables del silenciamiento de la expresión del gen $ER\alpha$ en la corteza cerebral del ratón en el día postnatal 10 (Westberry y col., 2010). Los ensayos de metilación en nuestro experimento demostraron que una disminución en la expresión del ARNm total del $ER\alpha$ en el hipocampo de ratones hembra de mediana edad se correspondió con un incremento en la metilación del exón C y de la región 5'UTR del exón 1 del $ER\alpha$, en comparación con los animales controles jóvenes (CJ).

Desde hace tiempo se sabe que el enriquecimiento ambiental puede proteger el cerebro en desarrollo de los roedores frente a las consecuencias negativas del aislamiento social y cognitivo (para una revisión véase Rosenzweig y Bennett, 1996). Trabajos recientes en roedores adultos y ancianos sugieren que los efectos beneficiosos del enriquecimiento sobre la memoria y la función neuronal pueden ser obtenidos en cualquier momento de la vida (Harburger y col., 2007). Particularmente, la exposición de ratas de mediana edad y ratones a un ambiente enriquecido, aumenta la neurogénesis en el hipocampo (Kempermann y col., 1998) y los niveles de neurotrofinas hipocampales y corticales (Harburger y col., 2007; Ickes y col., 2000). Los diferentes tipos de tratamientos con ambientes enriquecidos pueden tener efectos variables sobre la memoria espacial. Por ejemplo, en el cerebro de la rata se ha demostrado que la exposición desde la juventud a un ambiente enriquecido de largo plazo puede conducir a aumentos regionales en los niveles de neurotrofinas (Ickes y col., 2000), prevenir la declinación de la memoria de reconocimiento y aumentar la expresión de marcadores de plasticidad sináptica durante el envejecimiento (Leal-Galicia y col., 2008). Por otro lado, algunos experimentos de enriquecimiento diario tuvieron pocos efectos beneficiosos sobre la referencia espacial y la memoria de trabajo. De hecho, en diferentes evaluaciones en un laberinto de agua, los ratones expuestos a ambiente enriquecido de manera discontinua tuvieron un peor desempeño que los animales controles envejecidos. Por el contrario, los ratones de edad avanzada que recibieron un enriquecimiento continuo, tuvieron un mejor desempeño que los grupos de animales envejecidos en diferentes determinaciones sobre memoria de referencia espacial (Bennett y col., 2006). En el mismo experimento, los niveles de SYN en los animales envejecidos y sometidos a un ambiente enriquecido continuo fueron menores que las de los otros grupos en el hipocampo, corteza cerebral, y el cuerpo estriado, sugiriendo quizás

una correlación negativa entre los niveles de esta proteína sináptica y la memoria espacial en los animales de edad avanzada (Frick y Fernandez, 2003). En conjunto, los datos expuestos anteriormente indican que los efectos de la exposición a un ambiente enriquecido sobre las funciones cerebrales dependen básicamente del sexo del animal, la edad y el protocolo de la exposición utilizado.

La mayoría de los estudios que evalúan los beneficios de la exposición a un ambiente enriquecido sobre la cognición y los niveles de proteínas neurotróficas no se focalizan en los efectos de dicha exposición a nivel genómico y transcripcional como hemos analizado en nuestro trabajo. Nosotros encontramos que la exposición a un ambiente enriquecido continuo y de largo plazo no revirtió la caída a nivel del ARNm del ER α que se produjo con el envejecimiento. Esta exposición tampoco modificó los niveles de metilación incrementados por la edad en la región 5'UTR del exón 1 y en el exón C del ER α . Cuando comparamos la expresión de ER α entre animales controles jóvenes y de mediana edad (CJ y C) detectamos una caída de la proteína ER α de manera similar a lo observado para el ARNm de esta molécula. Por otro lado, la exposición a un ambiente enriquecido generó un incremento en los niveles de expresión de la proteína de ER α , alcanzando valores de expresión similares a los animales jóvenes en las regiones GD y PZ. En las regiones CA1 y CA3 el enriquecimiento ambiental produjo un marcado aumento de la expresión del ER α llevándola a niveles cuyos valores medios son superiores a los animales jóvenes. Es un hecho conocido que la región CA1 del hipocampo está íntimamente relacionada con los procesos de aprendizaje y la memoria (Zhang y col., 2011). Las neuronas piramidales de CA1 son más vulnerables a la isquemia, las convulsiones y se encuentran particularmente afectadas en la demencia (Mehra y col., 2005; Zhang y col., 2011). Es en esta región hipocampal donde el E2 produce un importante incremento en la densidad de espinas dendríticas (Gonzalez-Burgos y col., 2005) mientras que la carencia crónica de E2 produce una marcada disminución de la expresión del ER α en esta región (Zhang y col., 2011). Por otro lado, se ha reportado que la exposición a un ambiente enriquecido mejoró la plasticidad sináptica de las regiones CA1 y CA3 aumentando la potenciación a largo plazo de sus neuronas (Malik y Chattarji, 2012). Estos antecedentes indican que las regiones CA1 y CA3 del hipocampo son particularmente sensibles a cambios hormonales y conductuales. En nuestro trabajo, la elevada expresión de la proteína ER α

observada en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de los animales E podría estar relacionada con la marcada sensibilidad de sus neuronas al enriquecimiento ambiental. Este resultado podría estar asociado con una mejoría en la plasticidad sináptica de CA3-CA1 que involucra tanto al E2 como a la exposición a ambientes enriquecidos. Finalmente podríamos especular que la exposición a un ambiente enriquecido estaría afectando los mecanismos de degradación proteica (por el sistema ubiquitina-proteasoma; Micevych y Dominguez, 2009) de manera que los niveles proteicos del ER α se mantengan estables a pesar de la caída del ARNm.

Los resultados presentados en esta tesis nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1) Un **tratamiento agudo** con E2 tiene la capacidad de modificar la expresión del ER α en el hipocampo del ratón adulto, presentando las siguientes características:

- ✓ Una dosis de 0,05 μ g E2/g de peso corporal generó niveles séricos de la hormona en el orden de los 73 \pm 9 pg/ml. Dicho tratamiento disminuyó los niveles del ARNm del ER α a las 4 hs post-tratamiento. Además, detectamos una menor expresión de la proteína ER α en la región CA1 y el GD del hipocampo frente al tratamiento con E2.
- ✓ La disminución en la transcripción del ER α se produjo en asociación a una menor actividad de los promotores A y C del gen.
- ✓ El mecanismo epigenético de acetilación/desacetilación de histonas en la región promotora A y C del ER α no estaría interviniendo en la regulación estrogénica del receptor.
- ✓ La dosis empleada de E2 provocó un aumento de la expresión del represor específico de la acción estrogénica (REA) en la región CA3 y una disminución del coregulador SMRT en el GD del hipocampo.
- ✓ No encontramos expresión de isoformas de delección ni en los animales controles ni en los tratados.
- ✓ El tratamiento con E2 estimuló la expresión del ARNm del BDNF pero no de la proteína a las 2 hs post-tratamiento. A las 4 hs post-tratamiento, no detectamos inducción de la expresión del ARNm de BDNF.

2) El **tiempo** que un individuo transcurre privado de su función ovárica condiciona el efecto neurotrófico de una THR basada en estrógenos exógenos, pudiéndose destacar las siguientes características:

- ✓ El tratamiento con E2 provocó un aumento en la expresión de la proteína BDNF en la región CA3 y PZ del hipocampo de los animales que transcurrieron por un período corto de castración. Si la castración es crónica, la THR basada en estradiol falla en estimular la expresión de BDNF.

- ✓ Dado que la dinámica de la expresión del ER α fue la misma tanto para los animales LPE como para CPE, las diferencias encontradas en la expresión del BDNF no se estarían debiendo a un cambio en la expresión del ER α .
- ✓ Los animales CPE presentaron una mayor expresión del ARNm de BDNF. Por el contrario, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de BDNF entre los grupos de largo plazo de castración, verificando de esta manera que el tratamiento con E2 fue incapaz de inducir un aumento en la transcripción de BDNF cuando los animales llevaban un tiempo largo de castración.
- ✓ El aumento en la expresión del ARNm de BDNF observado en el grupo CPE se debió mayormente a la inducción de las variantes EIV-BDNF y EV-BDNF y en menor medida a la variante EII-BDNF.
- ✓ El análisis del promotor IV por COBRA reveló que la región regulatoria CRE mostró un mayor número de alelos metilados en los animales que transcurrieron un largo período de castración.
- ✓ Al analizar la isla CpG del promotor V se encontró que los grupos experimentales que pasaron mucho tiempo castrados (grupos LPC y LPE) presentaron un mayor grado de metilación respecto a los grupos CP. Estos resultados en paralelo con los obtenidos por COBRA indicarían que la falla en la respuesta estrogénica de BDNF en los animales castrados crónicos está asociada a un silenciamiento transcripcional de los promotores IV y V del gen de BDNF mediado por un mecanismo de metilación diferencial.
- ✓ Los animales que pasaron un corto periodo de castración (CPE) al momento de recibir E2 mostraron un incremento significativo de la expresión de SYN en la región CA3. En contraste, el tratamiento con E2 no indujo la expresión de SYN cuando el tratamiento fue iniciado 7,5 meses post-OVX.

3) La expresión del ER α disminuye con la edad avanzada pero esto se revierte por la exposición a un **ambiente enriquecido** de largo plazo (9 meses):

- ✓ La expresión del ARNm total del ER α fue menor en los animales de mediana edad (11 meses). Esta regulación hacia abajo estuvo asociada con una disminución de la actividad relativa de los promotores A, C y F del ER α .

- ✓ Los ensayos de metilación en este experimento mostraron que la disminución de la expresión del ARNm de las variantes ER α -A, ER α -C y ER α -F en el hipocampo de ratones hembra de mediana edad se correspondió con un incremento en la metilación del exón C (perteneciente a la isoforma ER α -C) y de la región 5'UTR del exón 1 (perteneciente a todas las isoformas) del ER α , en comparación con los animales controles jóvenes (CJ).
- ✓ La exposición a un ambiente enriquecido no logró revertir la disminución en la transcripción y el incremento en los niveles de metilación del gen de ER α asociados al envejecimiento.
- ✓ Sorpresivamente la disminución de la expresión a nivel proteína de ER α que se produce por la edad, fue revertida por la exposición a un ambiente enriquecido de largo plazo.

Los resultados obtenidos en esta tesis intentan contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que modulan la acción neurotrófica de los estrógenos en una importante estructura del cerebro relacionada con la memoria: el hipocampo. De manera especial analizamos de qué manera el tiempo que un animal pasa privado de estrógenos endógenos, la edad cronológica y el nivel de actividad mnemónica y/o exploratoria (en un ambiente enriquecido), pueden modificar la capacidad transcripcional de la vía estrogénica en el hipocampo y así, modificar la respuesta neurotrófica de una THR exógena futura. Si bien nuestras observaciones pueden constituir una base mecanística para explicar los resultados encontrados en los estudios de WHIMS, todavía queda un largo camino por recorrer para lograr entender en forma integral la compleja interacción estrógenos-factores neurotróficos y su influencia en el funcionamiento normal del cerebro.

BIBLIOGRAFÍA

Acconcia, F.; Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Spisni, E.; Tomasi, V.; Trentalance, A.; Visca, P. y Marino, M. (2005) *Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol*. Mol.Biol.Cell 16: 231-237.

Adams, B.D.; Furneaux, H. y White, B.A. (2007) *The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines*. Mol. Endocrinol. 21: 1132-1147.

Adams, M.M.; Oung, T.; Morrison, J.H. y Gore A.C. (2001a) *Length of postovariectomy interval and age, but not estrogen replacement, regulate N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels in the hippocampus of female rats*. Exp. Neurol. 170: 345-356.

Adams, M.M.; Shah, R.A.; Janssen, W.G. y Morrison, J.H. (2001b) *Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 8071-8076.

Adams, M.M.; Fink, S.E.; Shah, R.A.; Janssen, W.G.; Hayashi, S.; Milner, T.A.; McEwen B.S. y Morrison J.H. (2002) *Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats*. J. Neurosci. 22: 3608-3614.

Addis, D.R.; Wong, A.T. y Schacter, D.L. (2007) *Remembering the past and imagining the future: common and distinct neural substrates during event construction and elaboration*. Neuropsychologia 45: 1363-1377.

Aid, T.; Kazantseva, A.; Piirsoo, M.; Palm, K. y Timmusk, T. (2007) *Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited*. J. Neurosci. Res. 85: 525-535.

Aisen, P.S.; Berg, J.D.; Craft, S.; Peskind, E.R.; Sano, M.; Teri, L.; Mulnard, R.A.; Thomas, R.G. y Thal, L.J. (2003) *Steroid-induced elevation of glucose in Alzheimer's disease: relationship to gender, apolipoprotein E genotype and cognition*. Psychoneuroendocrinology 28:113-120.

Amaral D. y Witter M. (1995) *Hippocampal Formation*. En: *The rat Nervous System* (Ed. Paxinos G.) Academic Press, Sydney, Australia, p. 443-493.

Antequera, F. y Bird, A. (1993) *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90: 11995-11999.

Aparicio, O.; Geisberg J.V. y Struhl K. (2004) *Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo*. En: *Current protocols in cell biology* (Eds.: Bonifacino J.S.; Dasso M.; Harford J.B.; Lippincott-Schwartz J. y Yamada K.M.) John Wiley & Sons, Inc., New York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 17.7.1–17.7.23.

Arnsten, A.F.T. (1993) *Catecholamine mechanisms in age-related cognitive decline*. Neurobiol. Aging 14: 639–641.

- Artegiani, B. y Calegari, F. (2012) *Age-related cognitive decline: can neural stem cells help us?* Aging 4: 176-186.
- Bach, M.E.; Bara, M.; Son, H.; Zhuo, M.; Lu, Y.F.; Shih, R.; Mansuy, I.; Hawkins, R.D. y Kandel, E.R. (1999) *Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 96:5280–5285.
- Baldereschi, M.; Di Carlo, A.; Lepore, V.; Bracco, L.; Maggi, S.; Grigoletto, F.; Scarlato, G. y Amaducci, L. (1998) *Estrogen-replacement therapy and Alzheimer's disease in the Italian Longitudinal Study on Aging.* Neurology 50: 996-1002.
- Barlow, D.H. (2003) *Estrogen and dementia: it's a long way from the rat to the randomized clinical trial.* Menopause 10: 387-389.
- Battaglia, F.P. y Pennartz, C.M. (2011) *The construction of semantic memory: grammar-based representations learned from relational episodic information.* Front. Comput. Neurosci. 5: 36.
- Bellantoni, M.F.; Vittone, J.; Campfield, A.T.; Bass, K.M.; Harman, S.M. y Blackman M.R. (1996) *Effects of oral versus transdermal estrogen on the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in younger and older postmenopausal women: a clinical research center study.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 81: 2848-2853.
- Bennett, J.C.; McRae, P.A.; Levy, L.J. y Frick, K.M. (2006) *Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice.* Neurobiol. Learn. Mem. 85: 139-152.
- Berchtold, N.C.; Kesslak, J.P.; Pike, C.J.; Adlard, P.A. y Cotman, C.W. (2001) *Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus.* Eur. J. Neurosci. 14: 1992-2002.
- Bimonte, H.A.; Nelson, M.E. y Granholm A.C. (2003) *Age-related deficits as working memory load increases: Relationships with growth factors.* Neurobiol. Aging. 24: 37–48.
- Bird, A.P. y Wolffe, A.P. (1999) *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin.* Cell 99: 451-454.
- Birge, S.J. (1997) *The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease.* Neurology 48: S36-S41.
- Bittner, T.; Fuhrmann, M.; Burgold, S.; Ochs, S.M.; Hoffmann, N.; Mitteregger, G.; Kretschmar, H.; Laferla, F.M. y Herms, J. (2010) *Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice.* PLoS One 5: e15477.
- Bohacek, J. y Daniel, J.M. (2010) *The beneficial effects of estradiol on attentional processes are dependent on timing of treatment initiation following ovariectomy in middle-aged rats.* Psychoneuroendocrinology 35: 694-705.

- Boulware, M.I.; Kordasiewicz, H. y Mermelstein, P.G. (2007) *Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons*. J. Neurosci. 27: 9941-9950.
- Brinton, R.D. (2001) *Cellular and molecular mechanisms of estrogen regulation of memory function and neuroprotection against Alzheimer's disease: recent insights and remaining challenges*. Learn. Mem. 8: 121-133.
- Brinton, R.D. (2008) *The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications*. Trends Neurosci. 31: 529–537.
- Bruce, S.; Hannula-Jouppi, K.; Lindgren, C.M.; Lipsanen-Nyman, M. y Kere, J. (2008) *Restriction site-specific methylation studies of imprinted genes with quantitative real-time PCR*. Clin. Chem. 54: 491-499.
- Bucinskaite, V.; Theodorsson, E.; Crumpton, K.; Stenfors, C.; Ekblom, A. y Lundeberg, T. (1996) *Effects of repeated sensory stimulation (electro-acupuncture) and physical exercise (running) on open-field behaviour and concentrations of neuropeptides in the hippocampus in WKY and SHR rats*. Eur. J. Neurosci. 8: 382-387.
- Burke, S.N. y Barnes, C.A. (2006) *Neural plasticity in the aging brain*. Nat. Neurosci. Rev. 7: 30–40.
- Cao, L.; Jiao, X.; Zuzga, D. S.; Liu, Y.; Fong, D. M.; Young, D. y Doring, M. J. (2004) *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. Nat. Genet. 36: 827-835.
- Cavus, I. y Duman, R.S. (2003) *Influence of estradiol, stress, and 5-HT_{2A} agonist treatment on brain-derived neurotrophic factor expression in female rats*. Biol. Psychiatry 54: 59–69.
- Champagne, F.A.; Weaver, I.C.; Diorio, J.; Dymov, S.; Szyf, M. y Meaney, M.J. (2006) *Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α 1b promoter and estrogen receptor- α expression in the medial preoptic area of female offspring*. Endocrinology 147: 2909–2915.
- Chao, H.T. y Zoghbi, H.Y. (2009) *The yin and yang of MeCP2 phosphorylation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 4577-4578.
- Chen, W.G.; Chang, Q.; Lin, Y.; Meissner, A.; West, A.E.; Griffith, E.C.; Jaenisch, R. y Greenberg, M.E. (2003) *Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2*. Science 302: 885-889.
- Chen, J.D. y Evans, R.M. (1995) *A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors*. Nature 377: 454-457.
- Choleris, E.; Ogawa, S.; Kavaliers, M.; Gustafsson, J. A.; Korach, K. S.; Muglia, L. J. y Pfaff, D. W. (2006) *Involvement of estrogen receptor alpha, beta and oxytocin in social discrimination: A detailed behavioral analysis with knockout female mice*. Genes Brain Behav. 5: 528-539.

Clark, S.J. y Melki, J. (2002) *DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?* *Oncogene* 21: 5380-5387.

Clark, C.R.; MacLusky, N.J.; Parsons, B. y Naftolin, F. (1981) *Effects of estrogen deprivation on brain estrogen and progesterin receptor levels and the activation of female sexual behavior.* *Horm. Behav.* 15: 289-298.

Coker, L.H.; Espeland, M.A.; Rapp, S.R.; Legault, C.; Resnick, S.M.; Hogan, P.; Gaussoin, S.; Dailey, M. y Shumaker, S.A. (2010) *Postmenopausal hormone therapy and cognitive outcomes: the Women's Health Initiative Memory Study (WHIMS).* *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 118: 304-310.

Columbo, P.J.; Wetsel, W.C. y Gallagher, M. (1997) *Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats.* *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 14195–14199.

Conn P.M. (2006) *Age-related changes in hormones and their receptors.* En: *Handbook of Models for Human Aging* (Ed.: Conn P.M.) Elsevier, San Diego, California, Estados Unidos de Norteamérica, p. 537.

Cooper, D.N. y Krawczak, M. (1989) *Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes.* *Hum. Genet.* 83: 181-188.

Cordoba Montoya, D.A. y Carrer, H.F. (1997) *Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats.* *Brain Res.* 778: 430-438.

Couse, J.F. y Korach, K.S. (1999) *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* *Endocr.Rev.* 20: 358–417.

Cowley, S.M. y Parker, M.G. (1999) *A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta.* *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69: 165-175.

Craig, M.C.; Maki, P.M. y Murphy, D.G. (2005) *The Women's Health Initiative Memory Study: findings and implications for treatment.* *Lancet Neurol.* 4: 190-194.

Crowley, W.F. Jr.; Filicori, M.; Spratt, D.I. y Santoro, N.F. (1985) *The physiology of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women.* *Rec. Prog. Horm. Res.* 41: 473–531.

Czaja, J.A. y Butera, P.C. (1985) *Behavioral consequences of hormonal deprivation on the responsiveness of female rats to estradiol.* *Physiol. Behav.* 35: 873-877.

Daniel, J.M.; Hulst, J.L. y Berbling, J.L. (2006) *Estradiol replacement enhances working memory in middle-aged rats when initiated immediately after ovariectomy but not after a long-term period of ovarian hormone deprivation.* *Endocrinology* 147: 607–614.

Daniel, J.M. (2013) *Estrogens, estrogen receptors, and female cognitive aging: The impact of timing.* *Horm. Behav.* 63: 231-237.

Delage-Mourroux, R.; Martini, P. G.; Choi, I.; Kraichely, D. M.; Hoeksema, J. y Katzenellenbogen, B. S. (2000) *Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA*. J. Biol. Chem. 275: 35848-35856.

Dennis, K.E. y Levitt, P. (2005) *Regional expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) is correlated with dynamic patterns of promoter methylation in the developing mouse forebrain*. Brain Res. Mol. Brain Res. 140: 1-9.

Dobrzycka, K. M.; Townson, S. M.; Jiang, S. y Oesterreich, S. (2003) *Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer?* Endocr. Relat Cancer 10: 517-536.

Donaghue, C.; Westley, B. R. y May, F. E. (1999) *Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen*. Mol. Endocrinol. 13: 1934-1950.

Dorak, M.T. (2006) *Quantitative analyses of DNA methylation*. En: *Real-Time PCR* (Ed.: Dorak, M.T.) Taylor & Francis Group, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 174.

Dubal, D. B.; Zhu, H.; Yu, J.; Rau, S. W.; Shughrue, P. J.; Merchenthaler, I.; Kindy, M. S. y Wise, P. M. (2001) *Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98: 1952-1957.

Duclot, F.; Jacquet, C.; Gongora, C. y Maurice, T. (2010) *Alteration of working memory but not in anxiety or stress response in p300/CBP associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice bred on a C57BL/6 background*. Neurosci. Lett. 475: 179-183.

Duff, S.J. y Hampson, E. (2000) *A beneficial effect of estrogen on working memory in postmenopausal women taking hormone replacement therapy*. Horm. Behav. 38: 262-276.

Duffy, S.N.; Craddock, K.J. y Nguyen, P.V. (2001) *Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory*. Learn. Mem. 8: 26-34.

Edwards, D.A. (1970) *Induction of estrus in female mice: estrogen-progesterone interactions*. Horm. Behav. 1: 299-304.

Ellison-Zelski, S.J.; Solodin, N.M. y Alarid, E.T. (2009) *Repression of ESR1 through actions of estrogen receptor alpha and Sin3A at the proximal promoter*. Mol. Cell Biol. 29: 4949-4958.

Eriksson, P.S.; Perfilieva, E.; Bjork-Eriksson, T.; Alborn, A.M.; Nordborg, C.; Peterson, D.A. y Gage, F.H. (1998) *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat. Med. 4: 1313-1317.

- Ernfors, P.; Wetmore, C.; Olson, L. y Persson H. (1990) *Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family*. *Neuron* 5: 511-526.
- Espeland, M.A.; Rapp, S.R.; Shumaker, S.A.; Brunner, R.; Manson, J.E.; Sherwin, B.B.; Hsia, J.; Margolis, K.L.; Hogan, P.E.; Wallace, R.; Dailey, M.; Freeman, R. y Hays, J. (2004) *Women's Health Initiative Memory Study. Conjugated equine estrogens and global cognitive function in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study*. *JAMA* 291: 2959-2968.
- Fagiolini, M.; Jensen, C.L. y Champagne, F.A. (2009) *Epigenetic influences on brain development and plasticity*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19: 207-212.
- Felsenfeld, G. y Groudine, M. (2003) *Controlling the double helix*. *Nature* 6921: 448–453.
- Feng, J.; Fouse, S. y Fan, G. (2007) *Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function*. *Pediatr. Res.* 61: 58R-63R.
- Fleisher, A.; Grundman, M.; Jack, C.R. Jr.; Petersen, R.C.; Taylor, C.; Kim, H.T.; Schiller, D.H.; Bagwell, V.; Sencakova, D.; Weiner, M.F.; DeCarli, C.; DeKosky, S.T.; van Dyck, C.H. y Thal, L.J. (2005) *Sex, apolipoprotein E epsilon 4 status, and hippocampal volume in mild cognitive impairment*. *Arch. Neurol.* 62: 953-957.
- Flouriou, G.; Griffin, C.; Kenealy, M.; Sonntag-Buck, V. y Gannon, F. (1998) *Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage*. *Mol. Endocrinol.* 12: 1939-1954.
- Frick, K.M.; Burlingame, L.A.; Arters, J.A. y Berger-Sweeney, J. (2000) *Reference memory, anxiety, and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex*. *Neuroscience* 95: 293–307.
- Frick, K.M. y Fernandez, S.M. (2003) *Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice*. *Neurobiol. Aging* 24: 615–626.
- Frick, K.M.; Stearns, N.A.; Pan, J.Y. y Berger-Sweeney, J. (2003) *Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice*. *Learn. Mem.* 10: 187–198.
- Frick, K.M. (2009) *Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here?* *Horm. Behav.* 55: 2-23.
- Frick, K.M. y Benoit, J.D. (2010) *Use it or lose it: environmental enrichment as a means to promote successful cognitive aging*. *Scientific World Journal* 10: 1129-1141.
- Frick, K.M.; Zhao, Z. y Fan, L. (2011) *The epigenetics of estrogen: epigenetic regulation of hormone-induced memory enhancement*. *Epigenetics* 6: 675-680.

- Frick, K.M. (2012) *Building a better hormone therapy? How understanding the rapid effects of sex steroid hormones could lead to new therapeutics for age-related memory decline*. *Behav. Neurosci.* 126: 29-53.
- Frye, C.A. ; Rhodes, M.E. y Dudek, B. (2005) *Estradiol to aged female or male mice improves learning in inhibitory avoidance and water maze tasks*. *Brain Research* 1036: 101-108.
- Foster, T.C. (2012) *Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signalling on cognitive function during aging*. *Hippocampus* 22: 656-669.
- Fu, M.; Wang, C.; Li, Z.; Sakamaki, T. y Pestell, R.G. (2004) *Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions*. *Endocrinology* 145: 5439-5447.
- George, F.W. y Wilson, J.D. (1988) En: *The Physiology of Reproduction* (Eds.: Knobil, E.; Neil, J.D.; Ewing, L.L.; Green-Wals, G.S.; Market, C.L., y Pfaff, D.W.), Raven, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 3–26.
- Gibbs, R.B. (1998) *Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement*. *Brain Res.* 787: 259–268.
- Gibbs, R.B. (1999) *Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain*. *Brain Res.* 844: 20-27.
- Gibbs, R.B. (2000) *Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats*. *Neurobiol. Aging* 21: 107-116.
- Gonzalez-Burgos, I.; Alejandre-Gómez, M. y Cervantes, M. (2005) *Spine type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats*. *Neurosci. Lett.* 379: 52–54.
- Gonzalez-Perez, O. (2012) *Neural stem cells in the adult human brain*. *Biol. Biomed. Rep.* 2: 59-69.
- Gould, E. y Tanapat, P. (1999) *Stress and hippocampal neurogenesis*. *Biol. Psychiatry* 46: 1472-1479.
- Grandien, K.F.; Berkenstam, A.; Nilsson, S. y Gustafsson, J.A. (1993) *Localization of DNase I hypersensitive sites in the human oestrogen receptor gene correlates with the transcriptional activity of two differentially used promoters*. *J. Mol. Endocrinol.* 10: 269-277.
- Grandien, K.; Backdahl, M.; Ljunggren, O.; Gustafsson, J.A. y Berkenstam, A. (1995) *Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines*. *Endocrinology* 136: 2223-2229.

- Grandien, K. (1996) *Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform*. Mol. Cell Endocrinol. 116: 207-212.
- Green, P.S. y Simpkins, J.W. (2000) *Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action*. Int. J. Dev. Neurosci. 18: 347-358.
- Green, K.A. y Carroll, J.S. (2007) *Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state*. Nat. Rev. Cancer 7: 713–722.
- Gresack, J.E. y Frick, K.M. (2004) *Environmental enrichment reduces the mnemonic and neural benefits of estrogen*. Neuroscience 128: 459-471.
- Grunstein M. (1997) *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature 389: 349-352.
- Gu, Q. y Moss, R.L. (1996) *17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade*. J. Neurosci. 16: 3620-3629.
- Gunaga, K.P.; Kawano, A. y Menon, K.M. (1974) *In vivo effect of estradiol benzoate on the accumulation of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in the rat hypothalamus*. Neuroendocrinology 16: 273-281.
- Gundersen, H.J.; Bendtsen, T.F.; Korbo, L.; Marcussen, N.; Moller, A.; Nielsen, K.; Nyengaard, J.R.; Pakkenberg, B.; Sorensen, F.B.; Vesterby, A. y col. (1988) *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. APMIS 96: 379-394.
- Haettig, J.; Stefanko, D.P.; Multani, M.L.; Figueroa, D.X.; McQuown, S.C. y Wood, M.A. (2011) *HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner*. Learn. Mem. 18: 71-79.
- Halbreich, U. (1997) *Role of estrogen in postmenopausal depression*. Neurology 48: S16-S20.
- Hall, C.B.; Lipton, R.B.; Sliwinski, M.; Katz, M.J.; Derby, C.A. y Verghese, J. (2009) *Cognitive activities delay onset of memory decline in persons who develop dementia*. Neurology 73: 356–361.
- Hall, J.M.; Couse, J.F. y Korach, K.S. (2001) *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling*. J. Biol. Chem. 276: 36869-36872.
- Hamada, T.; Wada-Kiyama, Y. y Sakuma, Y. (2005) *Visualizing forebrain-specific usage of an estrogen receptor alpha promoter for receptor downregulation in the rat*. Brain Res. Mol. Brain Res. 139: 42-51.
- Hansen, J.C.; Tse, C. y Wolffe, A.P. (1998) *Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye*. Biochemistry 37: 17637-17641.

- Haraguchi, S.; Sasahara, K.; Shikimi, H.; Honda, S.; Harada, N. Y Tsutsui, K. (2012) *Estradiol promotes purkinje dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis during neonatal life by inducing the expression of BDNF*. *Cerebellum* 11: 416-417.
- Harburger, L.L.; Lambert, T.J. y Frick, K.M. (2007) *Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice*. *Behav. Brain Res.* 185: 43-48.
- Hart, S.A.; Snyder, M.A.; Smejkalova, T. y Woolley, C.S. (2007) *Estrogen mobilizes a subset of estrogen receptor-alpha-immunoreactive vesicles in inhibitory presynaptic boutons in hippocampal CA1*. *J. Neurosci.* 27: 2102-2111.
- Hatsumi, T. y Yamamuro, Y. (2006) *Downregulation of estrogen receptor gene expression by exogenous 17beta-estradiol in the mammary glands of lactating mice*. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 231: 311-316.
- Henderson, V.W. (1997) *Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease*. *Am. J. Med.* 103: 11S-18S.
- Henderson, B.E.; Ross, R. y Bernstein, L. (1988) *Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture*. *Cancer Res.* 48: 246-253.
- Herman, J.G. y Baylin, S.B. (2003) *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. *N. Engl. J. Med.* 349: 2042-2054.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. y Watson, R. (1993) *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Biotechnology (N.Y.)* 11: 1026-1030.
- Hirata, S.; Shoda, T.; Kato, J. y Hoshi, K. (2003) *Isoform/variant ARNms for sex steroid hormone receptors in humans*. *Trends Endocrinol. Metab.* 14: 124-129.
- Horowitz, M.C. (1993) *Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects*. *Science* 260: 626-627.
- Horwitz, K.B.; Jackson, T.A.; Bain, D.L.; Richer, J.K.; Takimoto, G.S. y Tung, L. (1996) *Nuclear receptor coactivators and corepressors*. *Mol. Endocrinol.* 10: 1167-1177.
- Huang, E.J. y Reichardt, L.F. (2001) *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 677-736.
- Hughes, T.A. (2006) *Regulation of gene expression by alternative untranslated regions*. *Trends in Genetics* 22: 119-122.
- Hunter, R.G.; McCarthy, K.J.; Milne, T.A.; Pfaff, D.W. y McEwen, B.S. (2009) *Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106: 20912-20917.

- Ickes, B.R.; Pham, T.M.; Sanders, L.A.; Albeck, D.S.; Mohammed, A.H. y Granholm, A.C. (2000) *Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain*. *Exp. Neurol.* 164: 45-52.
- Illingworth, R.; Kerr, A.; Desousa, D.; Jørgensen, H.; Ellis, P.; Stalker, J.; Jackson, D.; Clee, C.; Plumb, R.; Rogers, J.; Humphray, S.; Cox, T.; Langford, C. y Bird, A. (2008) *A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci*. *PLoS Biol.* 6: e22.
- Irvine, G.I. y Abraham, W.C. (2005) *Enriched environment exposure alters the input-output dynamics of synaptic transmission in area CA1 of freely moving rats*. *Neurosci. Lett.* 391: 32-37.
- Isgor, C. y Sengelaub, D.R. (1998) *Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats*. *Horm. Behav.* 34: 183-198.
- Ishii, H.; Kobayashi, M. y Sakuma, Y. (2010) *Alternative promoter usage and alternative splicing of the rat estrogen receptor alpha gene generate numerous ARNm variants with distinct 5-ends*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 118: 59-69.
- Ishii, H. y Sakuma, Y. (2011) *Complex organization of the 5'-untranslated region of the mouse estrogen receptor α gene: identification of numerous mRNA transcripts with distinct 5'-ends*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 125: 211-218.
- Jaffe, A.B.; Toran-Allerand, C.D.; Greengard, P. y Gandy, S.E. (1994) *Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein*. *J. Biol. Chem.* 269: 13065-13068.
- Jensen, E.V. y Jacobson, H.I. (1962) *Basic guides to the mechanism of estrogen action*. *Recent Prog. Horm. Res.* 18: 387-414.
- Jensen, E.V. y DeSombre, E.R. (1973) *Estrogen-receptor interaction*. *Science* 182: 126-134.
- Jezierski, M.K. y Sohrabji, F. (2000) *Region- and peptide-specific regulation of the neurotrophins by estrogen*. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 85: 77-84.
- Jorgensen, T.; Johansson, S.; Kennerfalk, A.; Wallander, M.A. y Svardsudd, K. (2001) *Prescription drug use, diagnoses, and healthcare utilization among the elderly*. *Ann. Pharmacother.* 35: 1004-1009.
- Kalita, K.; Szymczak, S. y Kaczmarek, L. (2005) *Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats*. *Hippocampus* 15: 404-412.
- Kato, J.; Hirata, S.; Koh, T.; Yamada-Mouri, N.; Hoshi, K. y Okinaga, S. (1998) *The multiple untranslated first exons and promoters system of the oestrogen receptor gene in the brain and peripheral tissues of the rat and monkey and the developing rat cerebral cortex*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65: 281-293.

- Katzenellenbogen, J.A.; O'Malley, B.W. y Katzenellenbogen, B.S. (1996) *Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones*. Mol. Endocrinol. 10: 119-131.
- Kazi, A.A.; Jones, J.M. y Koos, R.D. (2005) *Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter*. Mol. Endocrinol. 19: 2006-2019.
- Kelly, J.F.; Bienias, J.L.; Shah, A.; Meeke, K.A.; Schneider, J.A.; Soriano, E. y Bennett, D.A. (2008) *Levels of estrogen receptors alpha and beta in frontal cortex of patients with Alzheimer's disease: relationship to Mini-Mental State Examination scores*. Curr. Alzheimer Res. 5: 45-51.
- Kempermann, G.; Brandon, E.P. y Gage, F.H. (1998) *Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus*. Curr. Biol. 8: 939-942.
- Kiss, A.; Delattre, A.M.; Pereira, S.I.; Carolino, R.G.; Szawka, R.E.; Anselmo-Franci, J.A.; Zanata, S.M. y Ferraz, A.C. (2012) *17 β -estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas*. Behav. Brain Res. 227: 100-108.
- Klose, R.J. y Bird, A.P. (2006) *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem. Sci. 31: 89-97.
- Koch, M. y Ehret, G. (1989) *Immunocytochemical localization and quantitation of estrogen-binding cells in the male and female (virgin, pregnant, lactating) mouse brain*. Brain Res. 489: 101-112.
- Koike, S.; Sakai, M. y Muramatsu, M. (1987) *Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA*. Nucleic Acids Res. 15: 2499-2513.
- Kornberg, R.D. y Lorch, Y. (1999) *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell 98: 285-294.
- Kos, M.; O'Brien, S.; Flouriot, G. y Gannon, F. (2000) *Tissue-specific expression of multiple ARNm variants of the mouse estrogen receptor alpha gene*. FEBS Lett. 477: 15-20.
- Kos, M.; Reid, G.; Denger, S. y Gannon, F. (2001) *Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region*. Mol. Endocrinol. 15: 2057-2063.
- Krust, A.; Green, S.; Argos, P.; Kumar, V.; Walter, P.; Bornert, J.M. y Chambon, P. (1986) *The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors*. EMBO J. 5: 891-897.

- Kuiper, G.G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S. y Gustafsson, J.A. (1996) *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93: 5925-5930.
- Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S. y Gustafsson, J.A. (1997) *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology 138: 863-870.
- Kuo, M.H. y Allis, C.D. (1998) *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays 20: 615-626.
- Kushner, P.J.; Agard, D.A.; Greene, G.L.; Scanlan, T.S.; Shiau, A.K.; Uht, R.M. y Webb, P. (2000) *Estrogen receptor pathways to AP-1*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74: 311-317.
- Laflamme, N.; Nappi, R.E.; Drolet, G.; Labrie, C. y Rivest, S. (1998) *Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype*. J. Neurobiol. 36: 357-378.
- Lapidus, R.G.; Nass, S.J.; Butash, K.A.; Parl, F.F.; Weitzman, S.A.; Graff, J.G.; Herman, J.G. y Davidson, N.E. (1998) *Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction*. Cancer Res. 58: 2515-2519.
- Lauber, A.H.; Mobbs, C.V.; Muramatsu, M. y Pfaff, D.W. (1991) *Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose*. Endocrinology 129: 3180-3186.
- Launer, L.J.; Andersen, K.; Dewey, M.E.; Letenneur, L.; Ott, A.; Amaducci, L.A.; Brayne, C.; Copeland, J.R.M.; Dartigues, J.-F.; Kragh-Sorensen, P.; Lobo, A.;
- Leal-Galicia, P.; Castañeda-Bueno, M.; Quiroz-Baez, R. y Arias, C. (2008) *Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging*. Neurobiol. Learn. Mem 90: 511-518.
- Lee, D.Y.; Hayes, J.J.; Pruss, D. y Wolffe, A.P. (1993) *A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA*. Cell 72: 73-84.
- Lee, S.W.; Clemenson, G.D. y Gage, F.H. (2012) *New neurons in an aged brain*. Behav. Brain Res. 227: 497-507.
- LeFevre, J. y McClintock, M.K. (1988) *Reproductive senescence in female rats: A longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior*. Biol. Reprod. 38: 780-789.
- Li, L.C. y Dahiya, R. (2002) *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs*. Bioinformatics 18: 1427-1431.

- Licht, T.; Goshen, I.; Avital, A.; Kreisel, T.; Zubedat, S.; Eavri, R.; Segal, M.; Yirmiya, R. y Keshet E. (2011) *Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108: 5081-5086.
- Liu, Q.R.; Lu, L.; Zhu, X.G.; Gong, J.P.; Shaham, Y. y Uhl, G.R. (2006) *Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine*. Brain Res. 1067: 1-12.
- Lopez-Tarruella S. y Schiff R. (2007) *The dynamics of estrogen receptor status in breast cancer: re-shaping the paradigm*. Clin. Cancer Res. 13: 6921-6925.
- Lu, B.; Dotzlaw, H.; Leygue, E.; Murphy, L.J.; Watson, P.H. y Murphy, L.C. (1999) *Estrogen receptor-alpha ARNm variants in murine and human tissues*. Mol. Cell. Endocrinol. 158: 153-6.
- Lu, K.H.; Hopper, B.R.; Vargo, T.M. y Yen S.S.C. (1979) *Chronological changes in sex steroid, gonadotrophin, and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states*. Biol. Reprod. 21: 193-203.
- Lu, K.H. (1983) *Changes in ovarian function and gonadotrophin and prolactin secretion in aging female rats*. En.: *Neuroendocrinology of aging* (Ed.: Meites, J.) Plenum Press, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 103-122.
- Luine, V.N.; Richards, S.T.; Wu, V.Y. y Beck, K.D. (1998) *Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters*. Horm. Behav. 34: 149-162.
- MacLennan, A.H.; Henderson, V.W.; Paine, B.J.; Mathias, J.; Ramsay, E.N.; Ryan, P.; Stocks, N.P.; Taylor, A.W. (2006) *Hormone therapy, timing of initiation, and cognition in women aged older than 60 years: the REMEMBER pilot study*. Menopause 13: 28-36.
- Maguire, E.A.; Mummery, C.J. y Buchel, C. (2000) *Patterns of hippocampal-cortical interaction dissociate temporal lobe memory subsystems*. Hippocampus 10: 475-482.
- Maki, P.M. (2004) *Hormone therapy and risk for dementia: where do we go from here?* Gynecol. Endocrinol. 19:354-359.
- Malik R. y Chattarji S. (2012) *Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons*. J. Neurophysiol. 107: 1366-1378.
- Marino, M. y Ascenzi, P. (2006) *Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation*. IUBMB. Life 58: 716-719.
- Marks, P.A. y Xu, W.S. (2009) *Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy*. J. Cell Biochem. 107: 600-608.
- Martinez-Lage, J.M.; Stijnen, T. y Hofman, A. (1999) *Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease*. Neurology 52: 78-84.

- Martinowich, K.; Hattori, D.; Wu, H.; Fouse, S.; He, F.; Hu, Y.; Fan, G. y Sun, Y.E. (2003) *DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation*. Science 302: 890-893.
- Matsuda, K.I.; Mori, H.; Nugent, B.M.; Pfaff, D.W.; McCarthy, M.M. y Kawata, M. (2011) *Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior*. Endocrinology 152: 2760-2767.
- Maurice, T.; Duclot, F.; Meunier, J.; Naert, G.; Givalois, L.; Meffre, J.; Célérier, A.; Jacquet, C.; Copois, V.; Mechti, N.; Ozato, K. y Gongora, C. (2008) *Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice*. Neuropsychopharmacology 33: 1584-602.
- Maze, I. y Nestler, E.J. (2011) *The epigenetic landscape of addiction*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1216: 99-113.
- McAllister, A.K.; Lo, D.C. y Katz, L.C. (1995) *Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex*. Neuron 15: 791-803.
- McAllister, A.K.; Katz, L.C. y Lo, D.C. (1999) *Neurotrophins and synaptic plasticity*. Annu. Rev. Neurosci. 22: 295-318.
- McEwen, B.S. y Alves, S.E. (1999) *Estrogen actions in the central nervous system*. Endocr. Rev. 20: 279-307.
- McEwen, B.S.; Akama, K.T.; Spencer-Segal, J.L.; Milner, T.A. y Waters, E.M. (2012) *Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms*. Behav. Neurosci. 126: 4-16.
- McLaughlin, K.J.; Bimonte-Nelson, H.; Neisewander, J.L. y Conrad, C.D. (2008) *Assessment of estradiol influence on spatial tasks and hippocampal CA1 spines: evidence that the duration of hormone deprivation after ovariectomy compromises 17beta-estradiol effectiveness in altering CA1 spines*. Horm. Behav. 54: 386-395.
- Mehra, R.D.; Sharma, K.; Nyakas, C. y Vij, U. (2005) *Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study*. Brain Res. 1056: 22-35.
- Meijer, O.C.; Steenbergen, P.J. y de Kloet, E.R. (2000) *Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-2 in brain and pituitary*. Endocrinology 141: 2192-2199.
- Mendoza-Garcés, L.; Mendoza-Rodríguez, C.A.; Jiménez-Trejo, F.; Picazo, O.; Rodríguez, M.C. y Cerbón, M. (2011) *Differential expression of estrogen receptors in two hippocampal regions during the estrous cycle of the rat*. Anat. Rec. (Hoboken) 294: 1913-1919.
- Messaoudi, E.; Ying, S.W.; Kanhema, T.; Croll, S.D. y Bramham, C.R. (2002) *Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo*. J. Neurosci. 22: 7453-7461.

- Milner, T.A.; McEwen, B.S.; Hayashi, S.; Li, C.J.; Reagan, L.P. y Alves, S.E. (2001) *Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites*. J. Comp. Neurol. 429: 355-371.
- Milner, T.A.; Ayoola, K.; Drake, C.T.; Herrick, S.P.; Tabori, N.E.; McEwen, B.S.; Warriar, S. y Alves, S.E. (2005) *Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation*. J. Comp. Neurol. 491: 81-95.
- Micevych, P.; Sinchak, K.; Mills, R.H.; Tao, L.; LaPolt, P. y Lu, J.K. (2003) *The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats*. Neuroendocrinology 78: 29-35.
- Micevych P. y Dominguez R. (2009) *Membrane estradiol signaling in the brain*. Front. Neuroendocrinol. 30: 315-327.
- Middleton, L.E.; Mitnitski, A.; Fallah, N.; Kirkland, S.A. y Rockwood, K. (2008) *Changes in cognition and mortality in relation to exercise in late life: a population based study*. PLoS One 3: e3124.
- Miranda, R.C.; Sohrabji, F. y Toran-Allerand, D. (1994) *Interactions of estrogen with the neurotrophins and their receptors during neural development*. Horm. Behav. 28: 367-375.
- Molenda, H.A.; Griffin, A.L.; Auger, A.P.; McCarthy, M.M. y Tetel, M.J. (2002) *Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats*. Endocrinology 143: 436-444.
- Monje, L.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2009) *Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat*. Reprod. Toxicol. 28: 435-442.
- Montano, M.M.; Ekena, K.; Delage-Mourroux, R.; Chang, W.; Martini, P. y Katzenellenbogen, B.S. (1999) *An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 96: 6947-6952.
- Morrison, J.H.; Brinton, R.D.; Schmidt, P.J. y Gore, A.C. (2006) *Estrogen, menopause, and the aging brain: How basic neuroscience can inform hormone therapy*. J. Neurosci. 26: 10332–10348.
- Mussi, P.; Liao, L.; Park, S.E.; Ciana, P.; Maggi, A.; Katzenellenbogen, B.S.; Xu, J. y O'Malley, B.W. (2006) *Haploinsufficiency of the corepressor of estrogen receptor activity (REA) enhances estrogen receptor function in the mammary gland*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 103: 16716-16721.
- Nelson, J.F.; Karelus, K.; Bergman, M.D. y Felicio, L.S. (1995) *Neuroendocrine involvement in aging: Evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction*. Neurobiol. Aging 16: 837–843.

- Nephew, K.P.; Long, X.; Osborne, E.; Burke, K.A.; Ahluwalia, A. y Bigsby, R.M. (2000) *Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types*. Biol. Reprod. 62: 168-177.
- Nicholson, D.A.; Yoshida, R.; Berry, R.W.; Gallagher, M. y Geinisman, Y. (2004) *Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments*. J. Neurosci. 24: 7648–7653.
- Nilsson, M.; Perfilieva, E.; Johansson, U.; Orwar, O. y Eriksson, P.S. (1999) *Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory*. J. Neurobiol. 39: 569-578.
- Nurjono, M.; Lee, J. y Chong, S.A. (2012) *A Review of Brain-derived Neurotrophic Factor as a Candidate Biomarker in Schizophrenia*. Clin. Psychopharmacol. Neurosci. 10: 61-70.
- O'Brien, M.L.; Park, K.; In, Y. y Park-Sarge, O.K. (1999) *Characterization of estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid and protein expression in rat granule cells*. Endocrinology 140: 4530-4541.
- Ogawa, S.; Gordan, J.D.; Taylor, J.; Lubahn, D.; Korach, K. y Pfaff, D.W. (1996) *Reproductive functions illustrating direct and indirect effects of genes on behavior*. Horm. Behav. 30: 487-494.
- Omate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (1995) *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science 270: 1354-1357.
- Ormerod, B.K. y Galea, L.A. (2001) *Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol*. Neuroscience 102: 369-379.
- Ormerod, B.K.; Lee, T.T. y Galea, L.A. (2003) *Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats*. J. Neurobiol. 55: 247-260.
- Osterlund, M.K.; Grandien, K.; Keller, E. y Hurd, Y.L. (2000) *The human brain has distinct regional expression patterns of estrogen receptor alpha mRNA isoforms derived from alternative promoters*. J. Neurochem. 75: 1390-1397.
- Paech, K.; Webb, P.; Kuiper, G.G.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.; Kushner, P.J. y Scanlan, T.S. (1997) *Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites*. Science 277: 1508-1510.
- Paganini-Hill, A. y Henderson, V.W. (1996) *Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women*. Arch. Int. Med. 156: 2213-2217.
- Palmer, T.D.; Willhoite, A.R. y Gage, F.H. (2000) *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J. Comp. Neurol. 425: 479-494.

- Pan, M.; Li, Z.; Yeung, V. y Xu, R.J. (2010) *Dietary supplementation of soy germ phytoestrogens or estradiol improves spatial memory performance and increases gene expression of BDNF, TrkB receptor and synaptic factors in ovariectomized rats.* Nutr. Metab. (Lond.) 7: 75.
- Pappas, T.C.; Gametchu, B. y Watson, C.S. (1995) *Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding.* FASEB J. 9: 404-410.
- Pasqualini, C.; Guivarc'h, D.; Boxberg, Y.; Nothias, F.; Vincent, J.D. y Vernier, P. (1999) *Stage- and region-specific expression of estrogen receptor α isoforms during ontogeny of the pituitary gland.* Endocrinology 140: 2781–2789.
- Pasqualini, C.; Guivarc'h, D.; Barnier, J.V.; Guibert, B.; Vincent, J.D. y Vernier, P. (2001) *Differential subcellular distribution and transcriptional activity of $\Sigma E3$, $\Sigma E4$, and $\Sigma E3-4$ isoforms of the rat estrogen receptor- α .* Molecular Endocrinology 15: 894–908.
- Paxinos, G. y Watson, C. (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, Orlando, Estados Unidos de Norteamérica.
- Penolazzi, L.; Lambertini, E.; Giordano, S.; Sollazzo, V.; Traina, G.; del Senno, L. y Piva, R. (2004) *Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 91: 1-9.
- Pereira, R.T.; Porto, C.S.; Godinho, R.O. y Abdalla, F.M. (2008) *Effects of estrogen on intracellular signaling pathways linked to activation of muscarinic acetylcholine receptors and on acetylcholinesterase activity in rat hippocampus.* Biochem. Pharmacol. 75: 1827-1834.
- Perez-Martin, M.; Salazar, V.; Castillo, C.; Ariznavarreta, C.; Azcoitia, I.; Garcia-Segura, L.M. y Tresguerres, J.A. (2005) *Estradiol and soy extract increase the production of new cells in the dentate gyrus of old rats.* Exp. Gerontol. 40: 450-453.
- Perlman, W.R.; Matsumoto, M.; Beltaifa, S.; Hyde, T.M.; Saunders, R.C.; Webster, M.J.; Rubinow, D.R.; Kleinman, J.E. y Weickert, C.S. (2005) *Expression of estrogen receptor alpha exon-deleted mRNA variants in the human and non-human primate frontal cortex.* Neuroscience 134: 81-95.
- Peterson, T.J.; Karmakar, S.; Pace, M.C.; Gao, T.; Smith, C.L. (2007) *The Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor (SMRT) corepressor is required for full estrogen receptor α transcriptional activity.* Mol. Cell. Biol. 27: 5933-5948.
- Phillips, S.M. y Sherwin, B.B. (1992) *Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women.* Psychoneuroendocrinology 17: 485-495.
- Poola, I.; Abraham, J. y Baldwin, K. (2002) *Identification of ten exón deleted ER β mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of*

estrogen receptor β mRNA is distinct from that of estrogen receptor α . FEBS Letters 516: 133–138.

Porter, B.E. (2008) *Neurogenesis and epilepsy in the developing brain*. Epilepsia 49: 50-54.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Bosquiazzo, V.L.; Luque, E.H. y Munoz-De-Toro, M. (2002) *Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics*. Biol. Reprod. 67: 735-742.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Munoz, D.T. y Luque, E. H. (2001) *Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate*. Biol. Reprod. 65: 1271-1277.

Rampon, C.; Tang, Y.-P.; Goodhouse, J.; Shimizu, E.; Kyin, M. y Tsien, J.Z. (2000) *Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice*. Nature Neurosci. 3: 238–244.

Rapp, S.R.; Espeland, M.A.; Shumaker, S.A.; Henderson, V.W.; Brunner, R.L.; Manson, J.E.; Gass, M.L.; Stefanick, M.L.; Lane, D.S.; Hays, J.; Johnson, K.C.; Coker, L.H.; Dailey, M. y Bowen, D. (2003) *Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial*. JAMA 289: 2663-2672.

Razandi, M.; Pedram, A.; Greene, G.L. y Levin, E.R. (1999) *Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells*. Mol. Endocrinol. 13: 307-319.

Razandi, M.; Alton, G.; Pedram, A.; Ghonshani, S.; Webb, P. y Levin, E.R. (2003) *Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor α at the plasma membrane*. Mol. Cell Biol. 23: 1633-1646.

Reid, G.; Denger, S.; Kos, M. y Gannon, F. (2002) *Human estrogen receptor- α : regulation by synthesis, modification and degradation*. Cell Mol. Life Sci. 59: 821-831.

Richardson, S.J.; Senikas, V. y Nelson, J.F. (1987) *Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 65: 1231-1237.

Rissman, E.F.; Early, A.H.; Taylor, J.A.; Korach, K.S. y Lubahn, D.B. (1997a) *Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity*. Endocrinology 138: 507-510.

Rissman, E.F.; Wersinger, S.R.; Taylor, J.A. y Lubahn, D.B. (1997b) *Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects*. Horm. Behav. 31: 232-243.

Rosenfeld, M.G. y Glass, C.K. (2001) *Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors*. J. Biol. Chem. 276: 36865-36868.

- Rosenzweig, M.R. y Bennett, E.L. (1996) *Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior*. Behav. Brain Res. 78: 57-65.
- Rosenzweig, E.S. y Barnes, C.A. (2003) *Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition*. Prog. Neurobiol. 69: 143–179.
- Roth, T.L.; Lubin, F.D.; Funk, A.J. y Sweatt, J.D. (2009) *Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene*. Biol. Psychiatry. 65: 760-769.
- Roth, T.L. y Sweatt, J.D. (2011) *Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences*. Horm. Behav. 59: 315-320.
- Saito, T.; Ciobotaru, A.; Bopassa, J.C.; Toro, L.; Stefani, E. y Eghbali, M. (2009) *Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization*. Circ. Res. 105: 343-352.
- Sakuma, Y. y Pfaff, D.W. (1980) *Excitability of female rat central gray cells with medullary projections: changes produced by hypothalamic stimulation and estrogen treatment*. J. Neurophysiol. 44: 1012-1023.
- Sapolsky, R.M. y Meaney, M.J. (1986) *Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period*. Brain Res. 396: 64-76.
- Sasaki, M.; Dharia, A.; Oh, B.R.; Tanaka, Y.; Fuji-moto, S. y Dahiya, R. (2001) *Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer*. Cancer Res. 1: 97–102.
- Schwarz, J.M.; Nugent, B.M. y McCarthy, M.M. (2010) *Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span*. Endocrinology 151: 4871-4881.
- Scott, E.; Zhang, Q.G.; Wang, R.; Vadlamudi, R. y Brann, D. (2012) *Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis*. Front. Neuroendocrinol. 33: 85-104.
- Shanle, E.K. y Xu, W. (2010) *Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment*. Adv. Drug Deliv. Rev. 62: 1265-1276.
- Shen, L.; Guo, Y.; Chen, X.; Ahmed, S. y Issa, J.P. (2007) *Optimizing annealing temperatura overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis*. Biotechniques 42: 48, 50, 52.
- Sherman, A.M.; Shumaker, S.A.; Sharp, P.; Reboussin, D.M.; Kancler, C.; Walkup, M. y Herrington, D.M. (2003) *No effect of HRT on health-related quality of life in postmenopausal women with heart disease*. Minerva Ginecol. 55: 511-517.
- Sherwin, B.B. (2006) *Estrogen and cognitive aging in women*. Neuroscience 138: 1021-1026.

Sherwin, B.B. y Henry, J.F. (2008) *Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review*. *Front. Neuroendocrinol.* 29: 88-113.

Sherwin, B.B. (2009) *Estrogen therapy: is time of initiation critical for neuroprotection?* *Nat. Rev. Endocrinol.* 5: 620-627.

Shimamura, A.P.; Berry, J.M.; Mangels, J.A.; Rusting, C.L. y Jurica, P.J. (1995) *Memory and cognitive abilities in university professors: evidence for successful aging*. *Psychol. Sci.* 6: 271-277.

Shors, T.J.; Townsend, D.A.; Zhao, M.; Kozorovitskiy, Y. y Gould, E. (2002) *Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning*. *Hippocampus* 12: 578-584.

Shughrue, P.J.; Bushnell, C.D. y Dorsa, D.M. (1992) *Estrogen receptor Messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males*. *Endocrinology* 131: 381-388.

Shughrue, P.; Scrimo, P.; Lane, M.; Askew, R. y Merchenthaler, I. (1997) *The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse*. *Endocrinology* 138: 5649-5652.

Shughrue, P.J.; Askew, G.R.; Dellovade, T.L. y Merchenthaler, I. (2002) *Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain*. *Endocrinology* 143: 1643-1650.

Shumaker, S.A.; Legault, C.; Kuller, L.; Rapp, S.R.; Thal, L.; Lane, D.S.; Fillit, H.; Stefanick, M.L.; Hendrix, S.L.; Lewis, C.E.; Masaki, K.; Coker, L.H. (2004) *Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study*. *JAMA* 291: 2947-2958.

Siegel, S. (1956) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica.

Simerly, R.B. y Young, B.J. (1991) *Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones*. *Mol. Endocrinol.* 5: 424-432.

Simoncini, T.; Hafezi-Moghadam, A.; Brazil, D.P.; Ley, K.; Chin, W.W. y Liao, J.K. (2000) *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*. *Nature* 407: 538-541.

Simpkins, J.W.; Green, P.S.; Gridley, K.E.; Singh, M.; de Fiebre, N.C. y Rajakumar, G. (1997) *Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease*. *Am. J. Med.* 103: 19S-25S.

Singh, M.; Meyer, E.M. y Simpkins, J.W. (1995) *The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic*

acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. Endocrinology 136: 2320–2324.

Smith, C.L. (1998) *Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways.* Biol. Reprod. 58: 627-632.

Smith, C.L. y O'Malley, B.W. (2004) *Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators.* Endocr. Rev. 25: 45-71.

Smith, T.D.; Adams, M.M.; Gallagher, M.; Morrison, J.H. y Rapp, P.R. (2000) *Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats.* J. Neurosci. 20: 6587–6593.

Smith, Y.R.; Bowen, L.; Love, T.M.; Berent-Spillson, A.; Frey, K.A.; Persad, C.C.; Reame, N.K.; Koeppe, R.A. y Zubieta, J.K. (2011) *Early initiation of hormone therapy in menopausal women is associated with increased hippocampal and posterior cingulate cholinergic activity.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 96: E1761-1770.

Sohrabji, F.; Miranda, R.C. y Toran-Allerand, C.D. (1995) *Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 11110-11114.

Solum, D.T. y Handa, R.J. (2002) *Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus.* J. Neurosci. 22: 2650-2659.

Spencer, J.L.; Waters, E.M.; Milner, T.A. y McEwen, B.S. (2008) *Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice.* Neuroscience 155: 1106-1119.

Stefanko, D.P.; Barrett, R.M.; Ly, A.R.; Reolon, G.K. y Wood, M.A. (2009) *Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 9447-9452.

Su, J.M.; Yang, B.; Wang, Y.S.; Li, Y.Y.; Xiong, X.R.; Wang, L.J.; Guo, Z.K. y Zhang, Y. (2011) *Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves.* Theriogenology 75: 1346-1359.

Sze, C.I.; Bi, H.; Kleinschmidt-DeMasters, B.K.; Filley, C.M. y Martin, L.J. (2000) *Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains.* J. Neurol. Sci. 175: 81-90.

Tajima, S. y Suetake, I. (1998) *Regulation and function of DNA methylation in vertebrates.* J. Biochem. 123: 993-999.

Tanapat, P.; Hastings, N.B.; Reeves, A.J. y Gould, E. (1999) *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat.* J. Neurosci. 19: 5792-5801.

- Tanapat, P.; Hastings, N.B. y Gould, E. (2005) *Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner*. J. Comp. Neurol. 481: 252-265.
- Tate, P.H. y Bird, A.P. (1993) *Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression*. Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 226–231.
- Thakur, M.K. y Sharma, P.K. (2007) *Transcription of estrogen receptor alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex, 17beta-estradiol and testosterone*. Neurochem. Int. 50: 314-321.
- Thakur, M.K. y Sharma, P.K. (2008) *Binding of estrogen receptor alpha promoter to nuclear proteins of mouse cerebral cortex: effect of age, sex, and gonadal steroids*. Biogerontology 9: 467-478.
- Thammacharoen, S.; Lutz, T.A.; Geary, N. y Asarian, L. (2008) *Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor-alpha-expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats*. Endocrinology 149: 1609-1617.
- Thoenen, H. (1995) *Neurotrophins and neuronal plasticity*. Science 270: 593-598.
- Toran-Allerand, C.D.; Ellis, L. y Pfenninger, K.H. (1988) *Estrogen and insulin synergism in neurite growth enhancement in vitro: mediation of steroid effects by interactions with growth factors?* Brain Res. 469: 87-100.
- Toran-Allerand, C.D.; Miranda, R.C; Bentham, W.D.; Sohrabji, F.; Brown, T.J.; Hochberg, R.B. y MacLusky, N.J. (1992) *Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4668-4672.
- Toran-Allerand, C.D.; Guan, X.; MacLusky, N.J.; Horvath, T.L.; Diano, S.; Singh, M.; Connolly, E.S., Jr.; Nethrapalli, I.S. y Tinnikov, A.A. (2002) *ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury*. J. Neurosci. 22: 8391-8401.
- Toran-Allerand, C.D. (2005) *Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol*. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1052: 136-144.
- Torasdotter, M.; Metsis, M.; Henriksson, B.G.; Winblad, B. y Mohammed, A.H. (1998) *Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus*. Behav. Brain Res. 93: 83-90.
- Tsankova, N.M.; Berton, O.; Renthal, W.; Kumar, A.; Neve, R.L.; Nestler, E.J. (2006) *Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action*. Nat. Neurosci. 9: 519-525.
- van der Laan, S.; Lachize, S.B.; Schouten, T.G.; Vreugdenhil, E.; de Kloet, E.R. y Meijer, O.C. (2005) *Neuroanatomical distribution and colocalisation of nuclear receptor corepressor (N-CoR) and silencing mediator of retinoid and thyroid receptors (SMRT) in rat brain*. Brain Res. 1059: 113-121.

- Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Joazeiro, P.P.; Montes, G.S.; Munoz de Toro, M.M. y Luque, E.H. (2001) *Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term*. Biol. Reprod. 65: 375-383.
- Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Monje, L.; Bosquiazzo, V.; Munoz-De-Toro, M. y Luque, E.H. (2005) *The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus*. J. Endocrinol. 186: 51-60.
- Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Bosquiazzo, V.L.; Muñoz-de-Toro, M. y Luque, E.H. (2008) *Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult*. Endocrinology 149: 5848-5860.
- Vergheze, J.; Lipton, R.B.; Katz, M.J.; Hall, C.B.; Derby, C.A.; Kuslansky, G.; Ambrose, A.F.; Sliwinski, M. y Buschke, H. (2003) *Leisure activities and the risk of dementia in the elderly*. N. Engl. J. Med. 348: 2508–2516.
- Vladimirova, V.; Mikeska, T.; Waha, A.; Soerensen, N.; Xu, J.; Reynolds, P.C. y Pietsch, T. (2009) *Aberrant methylation and reduced expression of LHX9 in malignant gliomas of childhood*. Neoplasia 11: 700-711.
- Walf, A.A.; Paris, J.J. y Frye, C.A. (2009) *Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance*. Psychoneuroendocrinology 34: 909-916.
- Wang, H.; Masironi, B.; Eriksson, H. y Sahlin, L. (1999) *A comparative study of estrogen receptors α and β in the rat uterus*. Biology of Reproduction 61: 955–964.
- Watters, J.J. y Dorsa, D.M. (1998) *Transcriptional effects of estrogen on neuronal neurotensin gene expression involve cAMP/protein kinase A-dependent signaling mechanisms*. J. Neurosci. 18: 6672-6680.
- Weigel, R.J.; Crooks, D.L.; Iglehart, J.D. y deConinck, E.C. (1995) *Quantitative analysis of the transcriptional start sites of estrogen receptor in breast carcinoma*. Cell Growth Differ. 6: 707-711.
- Weiland, N.G.; Orikasa, C.; Hayashi, S. y McEwen B.S. (1997) *Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats*. J. Comp. Neurol. 388: 603-612.
- Westberry, J.M.; Trout, A.L. y Wilson, M.E. (2010) *Epigenetic regulation of estrogen receptor alpha gene expression in the mouse cortex during early postnatal development*. Endocrinology 151: 731-740.
- Westberry, J.M. y Wilson, M.E. (2012) *Regulation of estrogen receptor alpha gene expression in the mouse prefrontal cortex during early postnatal development*. Neurogenetics 13: 159-167.
- Weston, A.L.; Weinstein, A.M.; Barton, C. y Yaffe, K. (2010) *Potentially inappropriate medication use in older adults with mild cognitive impairment*. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 65: 318–321.

- White, R.; Lees, J.A.; Needham, M.; Ham, J. y Parker, M. (1987) *Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor*. Mol. Endocrinol. 1: 735-744.
- Widom, J. (1998) *Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 27: 285-327.
- Wilson, M.E.; Rosewell, K.L.; Kashon, M.L.; Shughrue, P.J.; Merchenthaler, I. y Wise, P.M. (2002) *Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain*. Mech. Ageing Dev. 123: 593-601.
- Wilson, M.E.; Westberry, J.M. y Trout, A.L. (2011) *Estrogen receptor-alpha gene expression in the cortex: sex differences during development and in adulthood*. Horm. Behav. 59: 353-357.
- Wintermantel, T.M.; Campbell, R.E.; Porteous, R.; Bock, D.; Grone, H.J.; Todman, M.G.; Korach, K.S.; Greiner, E.; Perez, C.A.; Schutz, G. y Herbison, A.E. (2006) *Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility*. Neuron 52: 271-280.
- Wise, E.A. y Riley, J.L.3rd. y Robinson, M.E. (2001) *Clinical pain perception and hormone replacement therapy in postmenopausal women experiencing orofacial pain*. Clin. J. Pain. 16: 121-126.
- Wise, P.M. *New understanding of the complexity of the menopause and challenges for the future*. Proceedings of the International Symposium on the Biology of Menopause. Norwell, Massachusetts, Estados Unidos de Norteamérica, año 2000, p. 1-8.
- Wolf, O.T. y Kirschbaum, C. (2002) *Endogenous estradiol and testosterone levels are associated with cognitive performance in older women and men*. Horm. Behav. 41: 259-266.
- Wolffe, A.P. y Hayes, J.J. (1999) *Chromatin disruption and modification*. Nucleic Acids Res. 27: 711-720.
- Wolffe, A.P. y Matzke, M.A. (1999) *Epigenetics: regulation through repression*. Science 286: 481-486.
- Wong, C.W.; Komm, B. y Cheskis, B.J. (2001) *Structure-function evaluation of ER alpha and beta interplay with SRC family coactivators. ER selective ligands*. Biochemistry 40: 6756-6765.
- Woolley, C.S. y McEwen, B.S. (1992) *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat*. J. Neurosci. 12: 2549-2554.
- Wu, H.Y.; Hamamori, Y.; Xu, J.; Chang, S.C.; Saluna, T.; Chang, M.F.; O'Malley, B.W. y Kedes, L. (2005) *Nuclear hormone receptor coregulator GRIP1 suppresses, whereas SRC1A and p/CIP coactivate, by domain-specific binding of MyoD*. J. Biol. Chem. 280: 3129-3137.

- Xiong, Z. y Laird, P.W. (1997) *COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay*. *Nucleic Acids Res.* 25: 2532-2534.
- Xu, L.; Glass, C.K. y Rosenfeld, M.G. (1999) *Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 140-147.
- Yaffe, K.; Sawaya, G.; Lieberburg, I. y Grady, D. (1998) *Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia*. *JAMA* 279: 688-695.
- Yaffe, K.; Haan, M.; Byers, A.; Tangen, C.; Kuller, L. (2000) *Estrogen use, APOE, and cognitive decline: evidence of gene-environment interaction*. *Neurology* 10: 1949-1954.
- Ye, J.; Ai, X.; Eugeni, E.E.; Zhang, L.; Carpenter, L.R.; Jelinek, M.A.; Freitas, M.A. y Parthun, M.R. (2005) *Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly*. *Mol. Cell.* 18: 123-130.
- Yen, S.S.C. (1999) *The human menstrual cycle: Neuroendocrine regulation*. En: *Reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management* (Eds.: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL) W.B. Saunders, Philadelphia, Estados Unidos de Norteamérica, p. 191–217.
- Zandi, P.P.; Carlson, M.C.; Plassman, B.L.; Welsh-Bohmer, K.A.; Mayer, L.S.; Steffens, D.C. y Breitner, J.C. (2002) *Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study*. *JAMA* 288: 2123-2129.
- Zhang, Q.G.; Han, D.; Wang, R.M.; Dong, Y.; Yang, F.; Vadlamudi, R.K. y Brann, D.W. (2011) *C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)-mediated degradation of hippocampal estrogen receptor-alpha and the critical period hypothesis of estrogen neuroprotection*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: E617-E624.
- Zhao, Z.; Fan, L. y Frick, K.M. (2010) *Epigenetic alterations regulate estradiol-induced enhancement of memory consolidation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 5605-5610.
- Zhou, J.; Zhang, H.; Cohen, R. y Pandey, S. (2005) *Effects of estrogen treatment on expression of BDNF and CREB expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures*. *Neuroendocrinology* 81: 294-310.