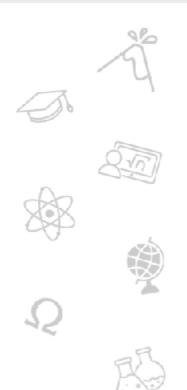
Tesis Doctoral



Participación de los andrógenos en la formación de las vías dopaminérgicas mesocórticolímbicas en un modelo de estrés prenatal

Pallarés, María Eugenia

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

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



Pallarés, María Eugenia. (2013-05-20). Participación de los andrógenos en la formación de las vías dopaminérgicas mesocórtico-límbicas en un modelo de estrés prenatal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pallarés, María Eugenia. "Participación de los andrógenos en la formación de las vías dopaminérgicas mesocórtico-límbicas en un modelo de estrés prenatal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-05-20.





Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



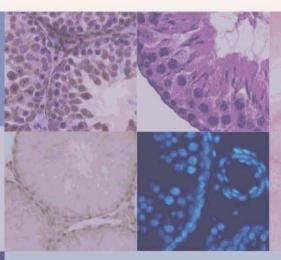


UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Participación de los andrógenos en la formación de las vías dopaminérgicas mesocórtico-límbicas en un modelo de estrés prenatal

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



LIC. MARÍA EUGENIA PALLARÉS

DIRECTORA: Dra. Marta Antonelli

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dr. Enrique Rodriguez

INSTITUTO DE QUÍMICA Y FISICOQUÍMICA BIOLÓGICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

MARZO 2013



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGIA EXPERIMENTAL

"Participación de los andrógenos en la formación de las vías dopaminérgicas mesocórtico-límbicas en un modelo de estrés prenatal"

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Lic. María Eugenia Pallarés

DIRECTORA: Dra. Marta C. Antonelli

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dr. Enrique M. Rodríguez

INSTITUTO DE QUÍMICA Y FISICOQUÍMICA BIOLÓGICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

MARZO 2013

RESUMEN

"Participación de los andrógenos en la formación de las vías dopaminérgicas mesocórtico-límbicas en un modelo de estrés prenatal"

Existen numerosas evidencias en la literatura que demuestran que la exposición a situaciones de estrés durante el período de la gestacion produce alteraciones a largo plazo en los niveles de hormonas sexuales y en el desarrollo del sistema dopaminérgico de la descendencia. En nuestro laboratorio, empleando un modelo en la rata, observamos que dichas alteraciones en el sistema dopaminérgico variaban según si éstas se evaluaban antes o después de la adolescencia. Por otra parte, en el ser humano se ha demostrado ampliamente que varias psicopatologías tales como esquizofrenia, adicciones a sustancias de abuso y depresión se desencadenan durante o hacia el final de la adolescencia. Definida como el período de transición entre la niñez y la vida adulta, la adolescencia es una etapa donde las hormonas gonadales ejercen sus efectos sobre los tejidos periféricos induciendo la aparición de los caracteres sexuales secundarios, pero también actúan centralmente influyendo sobre el remodelado y desarrollo final del cerebro.

Teniendo en cuenta estos antecedentes hipotetizamos que el estrés prenatal estaría interfiriendo con el desarrollo del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, a la vez que modificaría la maduración del sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico deviniéndolo vulnerable a los cambios hormonales que ocurren durante la adolescencia. En este contexto, el objetivo general en el que se encuadra este trabajo de tesis consiste en avanzar sobre el conocimiento del rol de las hormonas gonadales masculinas sobre las alteraciones de la neurotransmision dopaminérgica en la cría estresada prenatalmente. En una aproximación hacia la evaluación de este objetivo se caracterizó el efecto del estrés prenatal sobre el eje reproductor masculino y sobre ciertos aspectos del sistema dopaminérgico, para por último intentar simular el efecto del estrés prenatal administrando prenatalmente a un antagonista del receptor de andrógenos: la flutamida.

Mediante el empleo de un modelo de estrés prenatal por inmovilización de la madre durante la última semana de gestación en ratas Wistar, se evaluó la

reactividad del sistema de estrés de las crías macho, al mismo tiempo que se estudiaron los efectos del estrés prenatal sobre diversos aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares del eje reproductor. En el mismo modelo, en crías macho prepuberales y adultas, se examinó la expresión de los receptores dopaminérgicos del tipo D2, de andrógenos y de estrógenos en cerebrales pertenecientes sistema diversas áreas al dopaminérgico mesocórtico-límbico y se estudiaron las arborizaciones dendríticas en las mismas áreas. Finalmente mediante la administración de la flutamida durante la última semana de gestación, se estudió si la disminución perinatal en los niveles de andrógenos circulantes podría influir sobre el desarrollo del sistema dopaminérgico.

Los resultados obtenidos mostraron que el estrés prenatal indujo modificaciones a largo plazo en los niveles de las hormonas pertenecientes al eje reproductor masculino. A su vez, el estrés prenatal modificó parámetros de la morfología sexual externa y de la histomofometría gonadal de la descendencia. Por su parte, los efectos del estrés gestacional sobre los receptores dopaminérgicos del tipo D2 y a hormonas sexuales presentes en el cerebro, mostraron variaciones conforme al área en la cual se estaba realizando la observación y a la edad de las crías, mientras que la reducción en las arborizaciones dendríticas inducida por el estrés prenatal se registró en todas las áreas evaluadas y en ambas edades. Por último demostramos que la administración prenatal de flutamida afecta la morfología sexual interna y externa de la descendencia, al mismo tiempo que induce alteraciones en parámetros morfológicos del sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico. De esta manera, la manipulación prenatal de andrógenos mostró consecuancias similares a las observadas en individuos que habían recibido estrés prenatal, sugiriendo que uno de los mecanismos por los cuales el estrés gestacional podría interferir sobre el desarrollo del cerebro es mediante la alteración del rol organizacional de los andrógenos y la modulación del rol activacional de los mismos.

Palabras claves: estrés prenatal, eje hipófiso-testicular, sistema dopaminérgico mesocortico-límbico, esteroides sexuales, flutamida, ratas Wistar

<u>ABSTRACT</u>

Role of androgens on the development of the mesocortico-limbic dopaminergic pathway in a model of prenatal stress

Several studies have demonstrated that stress exposure during pregnancy impairs the dopaminergic system in the offspring. Employing a rat prenatal stress paradigm we have observed that several alterations of the dopaminergic pathway vary if evaluated before or after puberty. It is well known that numerous psychopathologies (i.e. schizophrenia, substance abuse disorder and depression) develop during, or after, the adolescence period. Adolescence is defined as a transient and dynamic phase of development, when gonadal hormones act not only on peripheral tissues to cause the appearance of secondary sex characteristics, but they also act centrally to influence both the remodeling of the adolescent brain and behavioral maturation.

Taking this background into account, we hypothesized that prenatal stress might be impairing the hypothalamic-pituitary-testicular axis development, while affecting the mesocortico-limbic dopaminergic system by becoming vulnerable to the hormonal changes that take place during the adolescence. In this context, the general aim or this research was to study the role of sexual hormones on the dopaminergic neurotransmission of prenatally stressed male offspring. Our first approach was to characterize the prenatal stress effects on the reproductive axis development and on the mesocortico-limbic dopaminergic pathway to finally simulate prenatal stress effects by prenatally administering the androgen receptor antagonist flutamide.

Employing a prenatal stress paradigm that consisted on immobilization of the pregnant dam during the last week of gestation, we characterized the stress system of the gestant mother and of the male offspring, and the effects of early programming on morphological, biochemical and molecular parameters of the male reproductive axis. In the same model, we evaluated the androgen, oestrogen and D2-dopamine receptors expression, as well as the dendrite arborization status on several brain areas of the mesocortico-limbic dopaminergic pathway of prenatally stressed male offspring at prepubertal and adult stages. Finally, we administered flutamide during the last week of

gestation in order to evaluate if decreased androgen levels might affect the dopaminergic system development.

Our results show that repeated exposure to maternal restraint stress markedly modulates the development of the offspring reproductive axis by inducing long-term changes in sexual maturation, hormone secretion patterns, testicular histology, and testicular biochemistry. Moreover, prenatal stress induces impairment on the D2- dopamine receptors and sexual hormone receptors depending on the area, and the age of the offspring. Finally, prenatal administration of flutamide affected sexual morphology of the descendants, as well as the mesocortico-limbic dopaminergic dendrite morphology that resemble those described for prenatally stressed animals. In summary, prenatal androgen manipulations induce similar consequences as prenatal stress suggesting that one of the possible mechanisms of action is by affecting the organizational role of androgens and differentially modulating their activational role on brain development.

Key words: prenatal stress, pituitary-testicular axis, mesocortico-limbic dopaminergic system, sexual steroids, flutamide, Wistar rats

.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados en:

• Stress, 2012, DOI: 10.3109/10253890.2012.761195

"Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring". Pallarés ME, Adrover E, Baier CJ, Bourguignon NS, Monteleone MC, Brocco MA, González-Calvar SI, Antonelli MC.

• Neurotoxicity Research, 2012 (1)c: 16-32.

"Gestational restraint stress and the developing dopaminergic system: an overview". Baier CJ, Katunar MR, Adrover E, <u>Pallarés ME</u>, Antonelli MC.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no solamente significó para mi la posibilidad de crecer y desarrollarme profesionalmente en un tema que me apasiona, sino que también representó un aprendizaje en todos los sentidos de la palabra... Quisiera agradecer profundamente a las siguientes personas que hicieron posible dicho "aprendizaje":

- A la Dra. Marta Antonelli, por compartir conmigo la pasión por este tema y darme la gran posibilidad de realizar mi Tesis Doctoral en su laboratorio bajo su dirección. Por confiar en cada una de mis ideas y por darme la libertad de llevarlas a cabo, siempre acompañandome con paciencia y entusiasmo en cada una de las etapas.
- A mis compañeros del laboratorio:
 - A "mama" *Susana Buglione*, por su ayuda completamente incondicional y desinteresada desde el primer día que puse un pie en el laboratorio. Por estar siempre atenta al bienestar y a las necesidades de cada una de las personas que la rodean. Por tener la fantástica capacidad de transformarse en bombero, policía, electricista, ayudante de cocina, plomero, aire acondicionado u orquesta, y por tener el increíble don de ser palabras de aliento, abrazo sincero, lágrimas, carcajada o tirón de orejas, según las concidiones de presión, humedad y temperatura así lo requieran. *Susi gracias infinitas por tu gran ayuda...*
 - A mi gran amiga del alma *Ezequiela Adrover*, por ser mi confidente, mi sostén, mi ayudanta en el plano científico y en el mundo extra-laboral. Por ser mi cómplice, mi compañera de aventuras, de risas, de peleas y de viajes. Gracias por estar siempre dispuesta a compartir unos mates o una cerveza de catarsis con los brazos abiertos. Gracias por abrirme el corazón y honrarme con tu amistad. *Infinitas gracias Eze, te quiero mucho...*
 - A Javier Baier por su amistad y por su enorme ayuda en todos los planos de la vida, pero sobre todo en el plano científico. Por sus consejos, por sus ideas, por su paciencia oriental, por su gran optimismo y confianza hacia mi persona. Por responder mis dudas y por buscar siempre la

solución a todas mis inquietudes. Por hacerme morir de la risa y compartir conmigo la valentía frente a las ratas, y la complicidad de las travesuras. *Infinitas gracias Javi...*

- A María Katunar por haberme acompañado en los primeros pasos de este camino, enseñandome con mucha alegría, paciencia y dedicación todo sobre las ratas (volúmen I, II y III). Por su buena predisposición y ayuda. Por compartir tantos momentos hermosos adentro y afuera del laboratorio.
- A Viviane Linck por su gran alegría "o mais grande do mundo", por sus consejos a la distancia, por su humor y por su hermoso corazón.
- A los Doctores: Ricardo Calandra, Victoria Lux, Damasia Becu, Isabel Tornadu y Andrea De Laurentiis, y a la Lic. Nadia Bourgignon por permitirme realizar los experimentos de radioinmunoensayo en sus laboratorios, bajo su ayuda y supervisión. Quisiera destacar y agradecer especialmente la labor de la Dra. Silvia Gonzalez Calvar por sus aportes y por su calidez humana. Por su infinita ayuda siempre que la necesité y por sus consejos en la parte experimental y bibliográfica.
- A la *Dra. Marcela Broco* y a la *Lic. Melisa Monteleone* por permitirme realizar los experimentos de RT-qPCR bajo su supervisión. Por responder con agrado y buena predisposición cada una de mis inquietudes.
- A los Doctores Rodolfo Rey y Marcela Venara por su gran ayuda y supervisión en los experimentos de histomorfometría testicular. Por estar siempre bien predispuestos a responder cada una de mis dudas, la cantidad de veces que fuera necesario.
- A Martín Brahamian por su ayuda sobre el aprendizaje y manejo de animales de bioterio, por su gran paciencia frente a mi torpeza y por darme una mano con buena predisposición. Gracias también, por abrirme las puertas de su casa, por compartir conmigo unos mates y charlas de la vida.
- A Mercedes Imsem por ayudarme con el cuidado y el manejo de los animales durante el transcurso de los últimos años. Por su buena onda, por su enorme generosidad y buena predisposición. Infinitas gracias Mer...

- A mis ex compañeros del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica, donde realicé la totalidad del trabajo de esta Tesis Doctoral. Gracias a cada uno de ellos por su cariño y apoyo desde un primer momento. En particular quisiera agradecer a *Victoria Rosato Siri* por su predisposición incondicional en todo lo que necesitaba, por preocuparse por mi y por brindarme sus abrazos contenedores especialmente durante esta última etapa. Quisiera también agradecer profundamente a *Rocío Martinez Vivot* por ofrecerme a mansalva su amistad, su alegría, su ayuda y solidaridad desde mi primer día en el Instituto. Gracias por hacerme morir de la risa con las tragicomedias, por los mates con alfajor jorgito, por confiar en mis puntos de vista y pedirme consejos. Gracias por acompañarme y por formar parte de esta loca vida.
- A Sandra Zárate, Laura Magri, Cristian Sobarzo, Candela Gonzalez, Daniel Pisera, Trinidad Saez, Valentina Sorzzoni y Silvia Trejo por la buena onda, por el intercambio de opiniones, reactivos y, consejos que me ayudaron a completar este trabajo de Tesis Doctoral.
- A mi familia... a mis padres por apoyar mis convicciones en cada etapa con respeto y entusiasmo. A mis abuelos, tíos y primos por acompañarme siempre. Especialmente a mis hermanos, que son la luz de mis ojos. A mi primo-hermano Gonza y a la hermosa Mailén, por traernos tanta luz.
- A mi familia política: "La Ma" y "La Caro", por ayudarme y acompañarme tanto durante estos últimos años. Por abrirme las puertas de su corazón y preocuparse siempre por mi. Soy muy feliz de que formen parte de mi vida.
- A mis amigos-hermanos de toda la vida: Maca, Marian, Mari, Pupi, Tri, Pia,
 Isa, Paulita, Toy, Vero, Fede y Javi ... Gracias a cada uno por bancarme,
 comprender mis tiempos y compartir mi locura desde hace tantos años.
- Al resto de mis amigos.
- A Magdalena Blanco, a Leonardo Haedo, a Gigi y a Silvia Pizá por haberme acompañado durante este último tiempo, ayudando a que mi crecimiento ocurra tambíen en otros planos de la vida. Gracias por mostrarme otras formas de pensar las cosas que nos pasan.

 Por último, quiero agradecerle a mi gran compañero, al amor de mi vida, al ser que hace que todos los días quiera ser mejor persona sólo para parecerme un poquito más a él... David gracias infinitas por tu maravilloso amor... Esta tesis es tan mía como tuya, ya que sin tu apoyo, nada de esto hubiera podido lograrse.



INDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
PUBLICACIONES	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
INDICE	xii
ABREVIATURAS	xvii
I- INTRODUCCION	1
I.1- SISTEMA DE ESTRES	2
I.1.1- El concepto de "estrés" a lo largo de la historia	2
I.1.2- Fisiología del estrés	4
a) Componentes periféricos del sistema de estrés	5
b) Componentes centrales del sistema de estrés	7
c) Interacciones del sistema de estrés con otros	8
componentes del sistema nervioso central	
d) Estrés y liberación de prolactina	9
I.1.3- Fisiopatologías asociadas al sistema de estrés	10
I.2- EL ESTRES DURANTE LA GESTACION	12
I.2.1- El eje HHA materno	12
I.2.2- Consecuencias del estrés prenatal sobre la	14
descendencia	
I.2.3- Posibles mecanismos de transducción del estrés	17
desde la madre al feto	
a) Aumento en la producción de hormonas	17
sintetizadas por la placenta	
b) Modificaciones en el flujo sanguíneo entre el	18
útero y la placenta	
c) Alteraciones en los niveles de glucocorticoides	18
d) Variaciones en el comportamiento maternal	19
I.2.4- Efectos del estrés prenatal sobre la neurobiología de	20
la descendencia	

	-Indice
a) Efectos del estrés prenatal sobre la	21
programación del eje HHA del feto	
b) Efectos del estrés prenatal sobre la morfología	22
de áreas cerebrales límbicas	
c) Efectos del estrés prenatal sobre	24
neurotransmisores	
I.3- EL SISTEMA DOPAMINERGICO	26
I.3.1- Descripción del sistema dopaminérgico	26
I.3.2- Bioquímica de la sinapsis dopaminérgica	29
I.3.3- Efectos del estrés prenatal sobre el sistema	30
dopaminérgico. Antecedentes de nuestro laboratorio	
a) Estrés prenatal, niveles de DA y receptores	30
b) Estrés prenatal, DA y factores de transcripción	32
c) Estrés prenatal, DA y morfología neural	33
I.4- EL EJE HIPOTALAMICO-HIPOFISARIO-TESTICULAR	35
I.4.1- Anatomía y función del tracto reproductor masculino	35
I.4.2- Regulación del eje hipotalámico-hipofisario-testicular	37
a) GnRH y el control de gonadotrofinasl	38
b) <i>LH y FSH</i>	39
c) Esteroides testiculares	40
I.4.3- Ontogenia del desarrollo sexual	43
I.4.4- Consecuencias del estrés sobre el eje HHT	46
I.4.5- Consecuencias del estrés prenatal sobre el	47
desarrollo del eje HHT	
I.5- HORMONAS GONADALES Y EL DESARROLLO	50
CEREBRAL. INTERACCION CON EL SISTEMA	
DOPAMINERGICO	
I.5.1- Adolescencia y predisposición a psicopatías	50
I.5.2- Rol de los andrógenos en el cerebro	52
II- OBJETIVOS E HIPOTESIS	<u>56</u>
III- MATERIALES Y METODOS	60
III.1- ESPECIFICACIONES DE REACTIVOS Y EQUIPOS	61
UTILIZADOS	

	-inaice
III.1.1- Drogas y reactivos	61
III.1.2- Anticuerpos	62
III.1.3- Equipos	62
III.2- MODELOS DE MANIPULACIÓN PRENATAL	63
UTILIZADOS	
III.2.1- Estrés prenatal por inmovilización	63
III.2.2- Administración prenatal de flutamida	65
III.3- OBSERVACION DE CARACTERISTICAS DE LAS	66
CAMADAS Y ANALISIS DE PARAMETROS DEL	
DESARROLLO SEXUAL	
III.3.1- Características de la camada	66
III.3.2- Distancia anogenital	66
III.3.3- Descenso testicular	66
III.3.4- Determinación del peso corporal e índice órgano-	66
somatico de testículo, epidídimo, vesícula seminal e	
hipófisis	
III.4- CUANTIFICACION DE HORMONAS EN SUERO	67
III.4.1- Obtención de sueros	68
III.4.2- Radioinmunoensayo para hormonas protéicas	68
a) <i>LH</i>	69
b) <i>FSH</i>	71
c) <i>Prolactina</i>	71
III.4.3- Determinación de esteroides testiculares	71
a) Determinación de androgenos totales mediante	71
RIA	
b) Determinación de Diol mediante RIA	73
c) Determinación de testosterona específica	73
mediante RIA	
III.4.4- Determinación de corticosterona	73
II.5- EXPRESION DE ENZIMAS Y RECEPTORES EN	74
CEREBRO Y TESTICULOS	
III.5.1- Determinación de la expresión génica	74
a) Extracción de ARN	74

	-Indice
b) Construcción de los oligonucleótidos	74
c) RT-qPCR en tiempo real	74
d) <i>Análisis de los datos</i>	76
III.5.2- Análisis de expresión proteica mediante Western blot	76
a) Extracción y procesamiento de los tejidos	76
b) Determinación de niveles proteicos	76
c) SDS-PAGE y transferencia	77
III.6- HISTOLOGIA TESTICULAR	78
III.6.1- Obtención y preparación de los tejidos	78
III.6.2- Evaluación de parámetros de histomorfometría gonadal	78
a) Diámetro tubular medio	79
b) Cuantificación del número de células de Leydig	79
c)Análisis del desarrollo espermatogénico mediante el criterio de puntajes de Johnsen	80
III.6.3- Inmunohistoquímica del receptor de andrógenos	80
III.7- ESTUDIOS DE MORFOLOGÍA CEREBRAL	81
III.7.1- Perfusión cardíaca	81
III.7.2- Inmunofluorescencia	83
III.7.3- Inmunohistoquímica	84
III.8- ANALISIS ESTADÍSTICO	85
IV- RESULTADOS	88
CAPITULO 1: CARACTERIZACION MATERNA Y DE CAMADAS EN EL MODELO DE ESTRÉS PRENATAL	89
IV 1.1- Evaluación de parámetros maternos y de camadas	89
IV 1.2- Respuesta al estrés agudo de la descendencia	91
CAPITULO 2: ESTRES PRENATAL Y EL EJE HIPOFISO- TESTICULAR DE LA DESCENDENCIA	96
IV 2.1- Evaluación de parámetros del desarrollo sexual de las crías	96
V 2.2- Evaluación de niveles séricos de hormonas del eje hipófiso-testicular	97

	-Indic
IV 2.3- Histomorfometría testicular de la descendencia	100
IV 2.4- Evaluación de receptores y enzimas testiculares	104
CAPITULO 3: ESTRES PRENATAL Y SISTEMA	111
DOPAMINERGICO MESOCORTICO-LIMBICO EN RATAS	
PREPUBERALES YADULTAS	
IV 3.1- Evaluación de receptores dopaminérgicos y	111
hormonales en áreas mesocórtico-límbicas	
IV 3.2- Arborizaciones dendríticas	119
CAPITULO 4: ADMINISTRACION PRENATAL DE	122
FLUTAMIDA Y SISTEMA DOPAMINERGICO	
MESOCORTICO-LIMBICO EN RATAS PREPUBERALES Y	
ADULTAS	
IV 4.1- Evaluación de parámetros maternos y de la	122
camada	
IV 4.2- Evaluación de parámetros del desarrollo sexual de	124
las crías	
IV 4.3- Evaluación de niveles séricos de testosterona en	128
individuos prepuberales y adultos	
IV 4.4- Estudios de morfología neural en cerebro	131
V- DISCUSION	139
CAPITULO 1	140
CAPITULO 2	146
CAPITULO 3	157
CAPITULO 4	166
CONCLUSIONES GENERALES	172
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	175

ABREVIATURAS

11βHSD= enzima 11 beta hidroxiesterode deshidrogenasa.

3α-HSD= enzima 3α- hydroxiesteroide deshidrogenasa.

5-TH= serotonina.

5αR1= enzima 5 alfa reductasa isoforma 1.

5αR2= enzima 5 alfa reductasa isoforma 2.

A= adrenalina.

Ach= aceticolina.

ACTH= hormona adrenocorticotropa.

ADHD= síndrome de hiperactividad y déficit de atención.

ADN= ácido desoxirribonucleico.

ADNc= ácido desoxirribonucleico copia.

ANOVA= análisis de la varianza.

AR= receptor de andrógenos.

ARNm= ácido ribonucleico mensajero.

AVP= arginina vasopresina.

BDNF= factor neurotrófico derivado del cerebro.

C= grupo experimental control.

Col.= colaboradores.

CPF= corteza prefrontal.

CPu= núcleo caudado y putamen del cuerpo estriado.

CRH= hormona liberadora de corticotrofinas.

CRHp= hormona liberadora de corticotrofinas sintetizada por la placenta.

CT= ciclo de PCR umbral en el cual se detecta una fluorescencia mayor a la basal.

D1R= receptor dopaminérgico de tipo 1.

D2R= receptor dopaminérgico de tipo 2.

DA= dopamina.

DAB= 3,3'-diaminobencidina.

DG= día gestacional.

DHT= dihidrotestosterona.

Diol= 5α -androstane, 3α , 17β diol.

DPN= día postnatal

EDTA= ácido etilendiamino tetracético.

EE= error estándar.

EP= grupo experimental estrés prenatal.

ERα= receptor de estrógenos alfa.

ERβ= receptor de estrógenos beta.

ERs= ambas isoformas del receptor de estrógenos en conjunto.

FLU= grupo experimental flutamida.

FSH= hormona folículo estimulante.

g= aceleración de la gravedad.

GABA= ácido gamma aminobutírico.

GnRH= hormona liberadora de gonadotrofinas.

GR= receptor glucocorticoideo.

HHA= eje hipotalámico-hipofisario-adrenal.

HHT= eje hipotaláico-hipofisario-testicular.

HPC= hipocampo.

HPT= hipotálamo.

IgG= inmunoglobulina.

kDa= kilo Daltons.

LC-NA= sistema de neuronas noradrenérgicas del Locus Coeruleus.

LH= hormona luteinizante.

MAP2= proteína asociada a microtúbulo

MR= receptor mineralocorticoide.

NAc= núcleo accumbens.

NeuN= inmunomarcador neural.

Nurr1=factor de transcripción (*nuclear receptor-related factor 1*).

PBS= buffer fosfosalino.

Pitx3= factor de transcripción (paired-like homedomain transcription factor 3)

POMC= sistema neuronal de la pro-opiomelanocortina.

PVDF= difluoruro de polivinilideno.

PVN= Núcleo paraventricular.

RIA= radioinmunoensayo.

RT-qPCR= reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa cuantitativa.

SDS= dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE= electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

SN= substantia nigra.

SNA= sistema nervioso autónomo.

SNc= substantia nigra pars compacta.

SNC= sistema nervioso central.

SR= estrato radiado

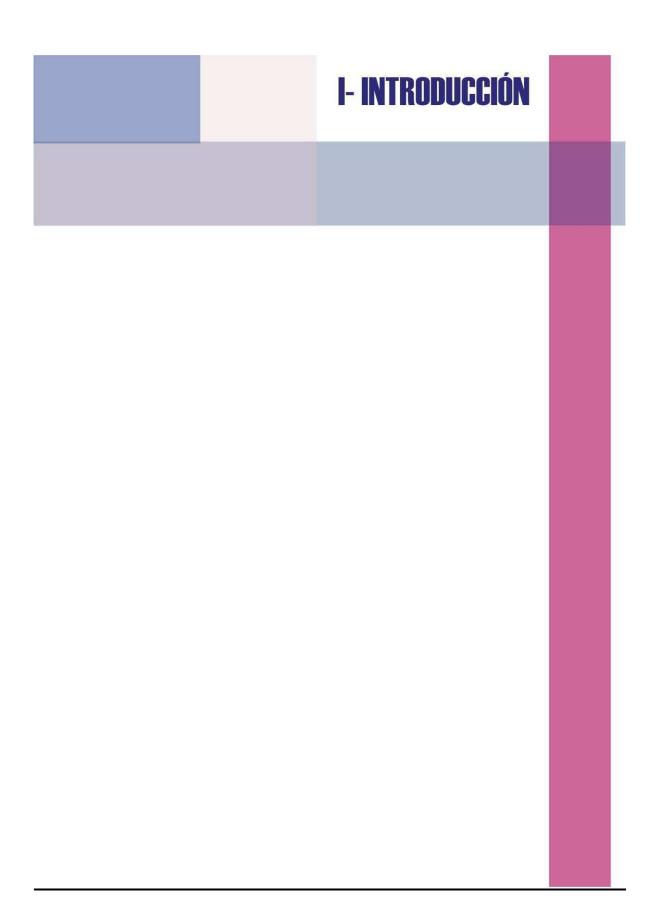
T+DHT= andrógenos totales.

TA= buffer fosfosalino 0.15% + Tritón X-100.

TH= enzima tirosina hidroxilasa.

VEH= grupo experimental vehículo.

VTA= área tegmental ventral.



I.1- SISTEMA DE ESTRES

La supervivencia de los organismos a lo largo de la historia fue posible gracias a las diversas capacidades de éstos para mantener constante un complejo equilibrio interno denominado homeostasis (del griego; *homoios*= lo mismo, *stasis*= permanencia) (Randall y col., 1998).

No obstante, el equilibrio interno del individuo es dinámico e interactúa constantemente con fuerzas capaces de alterarlo. Éstas pueden ser internas al individuo, tales como alteraciones psicológicas, fisiológicas, bioquímicas y/o moleculares; ó pueden ser también externas como las variaciones en el pH, la exposición a temperaturas ambientales extremas ó a predadores, entre otros.

Así, la restitución de la homeostasis dependerá de la eficiencia de los sistemas de control interno en detectar y corregir cualquier tipo de anormalidad inducida por dichas fuerzas. En ese caso la respuesta adaptativa desencadenada en el individuo podrá ser del tipo específica para el agente estresante en particular o inespecífica cuando la magnitud de la amenaza a la homeostasis exceda cierto umbral. El resultado físico o mental frente a la amenaza exagerada es lo que fue definida como "estrés", mientras que las fuerzas que lo generan fueron definidas como "agentes inductores de estrés" (Randall y col., 1998; Moguilevsky, 2005).

I.1.1- El concepto de estrés a lo largo de la historia.

Al principio de la era Clásica, Heracleitus fue de los primeros filósofos en sugerir que un estado estático e invariable no era una condición natural y que la capacidad de experimentar cambios era intrínseca a todos los organismos. Luego Empédocles postuló que la materia estaba formada por elementos con una distribución dinámica en el espacio y que la supervivencia de los organismos dependía del balance entre las proporciones de elementos agrupados o dispersos. Posteriormente Hipócrates manifestó que la salud estaba dada por un balance armónico entre ciertos elementos y calidad de vida, mientras que una desarmonía generaba enfermedad (Chrousos y Gold, 1992).

Ya en el Renacimiento Thomas Sydenham extendió el concepto hipocrático de enfermedad: si bien ésta podía estar dada por una desarmonía generada

por la exposición de un individuo a determinadas fuerzas, la misma respuesta desencadenada por el sujeto para contrarrestarla podía inducir un estado patológico (Chrousos y Gold, 1992).

A mediados del siglo XIX el fisiólogo francés Claude Bernard (1813-1878) destacó las diferencias entre el ambiente externo que rodea a un individuo y el ambiente interno. De esta manera introdujo el concepto de "medio interno" como aquel equilibrio fisiológico dinámico e intrínseco al organismo de un individuo. Así, Bernard describió por primera vez las características de la homeostasis, concepto que recién en el año 1932 el célebre fisiólogo Walter Cannon (1871- 1945), terminó de acuñar. Cannon demostró que el mantenimiento del medio interno requería la regulación de múltiples parámetros (físicos, químicos, psicológicos, etc.) y describió además algunas de las respuestas dadas por un individuo frente a esta desregulación: definió la reacción de "lucha o huida" (fight or fly reaction) y asoció por primera vez la respuesta adaptativa al estrés con la secreción de catecolaminas (Chrousos y Gold, 1992).

Por último, en 1930 Hans Selye fue el primero en utilizar el término de "estrés" para describir al resultado físico o mental de las demandas ejercidas sobre el cuerpo. En base a las observaciones sobre las reacciones emergentes del sistema nervioso simpático y adrenocortical, elaboró su teoría acerca del estrés. Selye describió que cuando el individuo era expuesto a un agente estresante desarrollaba una respuesta fisiológica estereotipada constituída por tres fases: 1) reacción de alarma, donde el cuerpo detecta el estímulo externo y se libera adrenalina y glucocorticoides; 2) adaptación, en el cual el cuerpo activa su defensa contra el estresor (resistencia); y 3) agotamiento, si la exposición al agente estresante persistía durante un tiempo prolongado, donde los mecanismos de defensa disminuyen y el organismo puede enfermarse.

En base al estudio de las respuestas registradas en diversos individuos frente al estrés, pudo observar que éstas eran independientes de la naturaleza del estímulo, es decir que eran intrínsecas a cada individuo. También observó que las repuestas se veían alteradas como consecuencia de la intensidad con que era percibido el mismo, la duración y la repetición. Así Selye definió dos tipos de respuestas adaptativas: *eustress* y *distre*ss. La primera se observaba

cuando el tipo de estrés sufrido era moderado y de corta duración en el tiempo. Dicho estrés parecía ser positivo para la salud y optimizaba el rendimiento físico e intelectual. Sin embargo, si el estrés perduraba en el tiempo o si su magnitud excedía ciertos umbrales, era capaz de desencadenar una serie de eventos fisiológicos y psicológicos que podían ser nocivos para el sujeto. De esta manera redefinió el concepto descripto por Sydenham como "síndrome general de adaptación" (Chrousos y Gold, 1992; McEwen, 2005).

Si bien la teoría de Selye ha sentado las bases de una de las ramas más importantes de la Neuroendocrinología y Fisiología, el incremento en las investigaciones relacionadas al estrés han reformulado algunos de los conceptos de su teoría. Entre los investigadores más destacados en este respecto se encuentra Bruce McEwen quien introdujo el término de "alostasis" para complementar nuestro uso de la palabra estrés. Este nuevo concepto describe la manera eficaz del cuerpo para enfrentar las circunstancias medioambientales y los estímulos a los cuales se exponen los individuos todos los días. La alostasis se definió como la capacidad de lograr la estabilidad en la homeostasis mediante la inducción de cambios, y dicha capacidad es crítica para la supervivencia. A través de la alostasis el sistema nervioso autónomo (SNA), Hipotálamico-Hipofisario-Adrenal eie (HHA), sistema cardiovascular, el sistema inmune y el metabolismo protegen al cuerpo, preparándolo para afrontar cualquier tipo de estrés. Sin embargo, la hiperactividad crónica de estos sistemas, aunque necesaria para la adaptación, tiene un efecto a largo plazo que se denomina "carga alostática". En otras palabras, el efecto crónico que las respuestas al estrés ejercen puede tornarse nocivo para la vida del propio organismo. Esto no se debería a un agotamiento de los sistemas de defensa tal como se postulaba en el síndrome descripto por Selye, sino a los mismos sistemas de restitución del equilibrio interno desencadenados ante el estrés, cuando su respuesta se sostiene durante un tiempo prolongado (McEwen, 2005).

I.1.2- Fisiología del estrés.

La adaptación al estrés está sostenida por un gran número de modificaciones fisiológicas, psicológicas y comportamentales en el individuo que tienden a contrarrestar los efectos del mismo. Por esta razón, dicha adaptación puede

considerarse como un "sistema de estés" que se encuentra ubicado tanto en el sistema nervioso central (SNC), como en el sistema periférico del cuerpo (Charmandari y col., 2003).

I.1.2- a) Componentes periféricos del sistema de estrés.

La primera respuesta que se desencadena para contrarrestar al estrés está mediada por el sistema simpático adreno-medular (Moguilevsky, 2005). La rama simpática del SNA, cuyo neurotransmisor principal es la noradrenalina, inerva la médula adrenal. Frente a un estrés agudo o leve, se estimula la liberación de adrenalina hacia el torrente sanguíneo, ejerciendo diferentes acciones sobre distintas partes del cuerpo. Se produce una redistribución de oxígeno y nutrientes hacia el SNC, y también hacia la región del cuerpo que se encuentre principalmente afectada por el estrés (por ejemplo hacia los músculos si el individuo está escapando). Las tasas respiratoria y cardíaca aumentan. Las funciones cognitivas se estimulan, permitiendo un mayor estado de alerta y de atención. El metabolismo se incrementa, aumentando la temperatura corporal, la gluconeogénesis y la lipólisis. Por último procesos fisiológicos tales como la inflamación, la digestión, la reproducción y el crecimiento sufren una inhibición temporal. De esta manera las modificaciones fisiológicas que sufre el animal le permitirán sostener el comportamiento adecuado para enfrentar dicho estrés (lucha ó huída) (Chrousos y Gold, 1992; Moguilevsky, 2005).

Cuando el estrés es muy intenso o cuando la exposición al agente estresante se prolonga en el tiempo, la respuesta iniciada por el sistema simpático adrenomedular se refuerza gracias a la activación del eje HHA. De esta manera se produce una cascada endócrina desde el hipotálamo que culmina con la liberación de glucocorticoides¹ desde la capa fascicular de la corteza de la glándula adrenal (**figura I.1**). Si bien sus efectos son similares a los ejercidos por la adrenalina, la diferencia radica en que éstos duran un tiempo mucho más prolongado y cumplen un rol muy importante en el control de la actividad basal

_

¹ Los principales glucocorticoides liberados en sangre por parte de la corteza de la glándula adrenal son el cortisol en primates incluidos los humanos, y la corticosterona en los roedores. Si bien ambos esteroides cumplen el mismo rol, difieren ligeramente en su estructura química: a diferencia de la corticosterona, el cortisol presenta un grupo alcohol en el carbono 17 (http://www.chemspider.com).

del eje HHA. Además son los encargados de "apagar" la cascada endocrina iniciada para contrarrestar al estrés mediante un mecanismo de retroalimentación negativa en la hipófisis, en centros hipotalámicos y extrahipotalámicos, limitando la duración de la exposición total de los tejidos a los glucocorticoides. Sin embargo, si la respuesta al estrés se prolonga en el tiempo, se produce una desregulación en el sistema que derivan en procesos patológicos que pueden ser perjudiciales para la vida del individuo (Chrousos y Gold, 1992; Randall y col., 1998; Walker y col., 2004; Moguilevsky, 2005).

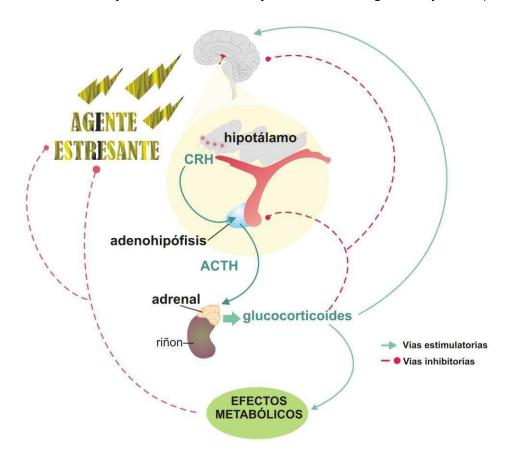


Figura I.1. Representación esquemática de la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal en respuesta al estrés. CRH= hormona liberadora de corticotrofina; ACTH= hormona adrenocorticotropa.

Los receptores a los glucocorticoides se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos y pueden ser de dos tipos:1) el receptor de tipo 1: de alta afinidad o receptor mineralocorticoide (MR por sus siglas en inglés: *mineralocorticoid receptor*), participa como mediador en las fluctuaciones circadianas de los glucocorticoides no relacionadas con el estrés y su función es primordialmente de activación; 2) el receptor de tipo 2: de baja afinidad o receptor

glucocorticoideo (GR por sus siglas en inglés: *glucocorticoid receptor*), cuya afinidad por los glucocorticoides es 10 veces menor que la de los de tipo MR, se expresa tanto en neuronas como en células de la glía. Intervienen en la regulación de los niveles de glucocorticoides alcanzados durante la respuesta al estrés (Bisagno y col., 2000; Cingolani y Houssay, 2000).

I.1.2- b) Componentes centrales del sistema de estrés.

Los dos componentes centrales principales de la respuesta al estrés están constituidos por la hormona liberadora de corticotrofina (CRH por sus siglas en inglés: corticotropin releasing hormone) y el sistema de neuronas noradrenérgicas del Locus Coeruleus/ sistema simpático (LC-NA/ sistema simpático). La CRH es un péptido que se encuentra en el hipotálamo y en otras regiones del cerebro así como en la glándula adrenal, placenta y focos inflamatorios, entre otros. En este caso, nos referiremos a la CRH hipotalámica, secretada por neuronas del núcleo paraventricular (PVN por sus siglas en inglés: paraventricular nucleus).

Ambos circuitos se inervan y estimulan recíprocamente, conformando un mecanismo de retroalimentación positivo de forma tal que la activación de uno de ellos desencadena la activación del otro (figura I.2). Además, responden de igual manera a moduladores neuroquímicos como la serotonina (5-HT por su nomenclatura 5 hidroxitriptamina) y acetil-colina (Ach) los que cumplen un rol excitatorio sobre ambos circuitos. El ácido gamma aminobutírico (GABA por sus siglas en inglés: gamma aminobutyric acid), los opioides y los glucocorticoides ejercen efectos inhibitorios.

La CRH es la principal hormona reguladora del eje HHA: actúa sobre la adenohipófisis estimulando la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH por sus siglas en inglés: adrenocorticotropic hormone) la cual a través del torrente circulatorio estimula la secreción de hormonas de la corteza de la glándula adrenal. Principalmente, la ACTH regula la liberación de glucocorticoides y andrógenos por parte de la capa fascicular y reticular, respectivamente. También participa en el control de la secreción de aldosterona en la zona glomerular. Existen otros mediadores químicos que colaboran con la activación del eje HHA, ya sea actuando en sinergia con la

CRH, estimulando la liberación de ACTH y/o facilitando la secreción de hormonas adrenales. Entre ellos se encuentran: la arginina-vasopresina (AVP), la angiotensina II, algunas citoquinas y mediadores lipídicos de procesos inflamatorios.

I.1.2- c) Interacciones del sistema del estrés con otros componentes del SNC.

El sistema de estrés interactúa con tres regiones específicas del SNC que coordinan distintos aspectos del comportamiento animal (Chrousos y Gold, 1992; Charmandari y col., 2003; McEwen y Gianaros, 2010) (**figura I.2**):

- Sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico: ambos sistemas son componentes del sistema dopaminérgico. El sistema cortical está implicado con aquellos fenómenos de anticipación y funciones cognitivas, mientras que el sistema mesolímbico cumple un rol principal en fenómenos de motivación, refuerzo y recompensa. Ambos sistemas son inervados y activados por LC-NA/ sistema simpático durante el estrés.
- Complejo amígdala- hipocampo: La amígdala controla la percepción de emociones tales como el miedo, la ansiedad y la agresión. En respuesta a un estrés del tipo emocional, la amígdala regula positivamente la respuesta al estrés y estimula al sistema mesocórtico-límbico. El hipocampo (HPC) procesa las memorias del tipo contextual, episódica y espacial. Desregula la respuesta al estrés ejerciendo efectos inhibitorios sobre la actividad de la amígdala, sobre el CRH liberado por el PVN y sobre el LC-NA/sistema simpático. Ambas estructuras cerebrales se encuentran conectadas estructural y funcionalmente. Durante el estrés, este complejo es activado mediante la acción de las neuronas noradrenérgicas del LC-NA/ sistema simpático y por los GC. Su activación conjunta es muy importante para el análisis emocional y la evocación de informaciones pertenecientes al agente estresante. Es decir que al comparar el episodio estresante con experiencias previas vividas por el individuo, el cerebro determina en qué medida dicho estrés representa (o no) una amenaza.
- Sistema neuronal de la pro-opiomelanocortina (POMC): las neuronas del POMC se encuentran ubicadas en el núcleo arcuato del hipotálamo. Éstas inervan y a su vez son inervadas por los dos componentes centrales del

sistema de estrés. Cuando el sistema de estrés se activa, estimula la liberación de péptidos derivados del POMC tales como la hormona α -melanocito-estimulante (que cumple un rol primordial en el cambio de distribución de pigmentos de la piel de algunos vertebrados, contribuyendo al camuflaje) y β -endorfinas responsables de la analgesia relacionada al estrés y de inhibir la actividad de los componentes centrales del sistema de estrés.

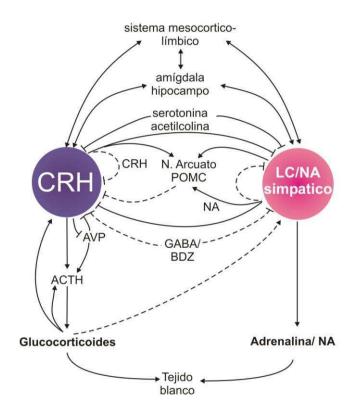


Figura I.2. Esquema simplificado de los componentes centrales y periféricos del sistema de estrés. AVP= arginina-vasopresina; ACTH= hormona adrenocorticotropa; BDZ= benzodiacepina; CRH= hormona liberadora de corticotropina; GABA= ácido gama aminobutírico; LC/NA simpático= sistema de neuronas noradrenérgicas del Locus Coeruleus/sistema simpático; NA= noradrenalina. Los mecanismos de activación están representados mediante líneas sólidas, mientras que los de inhibición con líneas punteadas (Chrousos y Gold, 1992).

I.1.2- d) Estrés y liberación de prolactina.

Tanto en humanos como en animales de experimentación, se ha observado que como consecuencia de la exposición a un estrés agudo no solamente se liberan catecolaminas y glucocorticoides, sino también otras hormonas como la prolactina (Webster Marketon y Glaser, 2008). Se ha demostrado que el estrés por restricción genera una hiperprolactinemia de baja magnitud y de corta duración (Kawakami y col., 1979; Freeman y col., 2000). Si bien el significado biológico del aumento en la liberación de prolactina aún es discutido, éste parecería estar relacionado con la modulación del sistema del estrés ya que se ha observado que la hiperprolactinemia disminuye la respuesta al estrés. Por otra parte, la administración de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el receptor de prolactina genera el efecto opuesto (Grattan, 2002). Los sitios de acción de la prolactina como mediadora de esta respuesta al estrés son desconocidos, pero se piensa que involucrarían al PVN y al eje HHA. Bajo ciertas circunstancias, el estrés puede disminuir los niveles séricos de prolactina. Esta respuesta se observa cuando el estímulo es aplicado en condiciones de hiperprolactinemia, como sucede durante el pico del proestro de las hembras y en el pico nocturno de la preñez o la pseudopreñez (Freeman y col., 2000).

I.1.3- Fisiopatologías asociadas al sistema de estrés.

Como ya mencionamos, el sistema de estrés posee una actividad basal circadiana, que permite monitorear y evaluar el estado homeostático del individuo. En cantidad y tiempo apropiados permite al cuerpo responder de forma saludable frente a una alteración en la homeostasis. Sin embargo si la magnitud de los procesos catabólicos y supresores que suceden cuando el sistema de estrés se activa durante un tiempo prolongado es muy elevada, se pueden desencadenar una enorme variedad de desórdenes. El exceso en la secreción de glucocorticoides y de CRH puede llevar al individuo a la enfermedad. En el humano el estrés agudo ha sido relacionado con manifestaciones alérgicas (asma, eczemas y urticarias), migrañas, hipo e hipertensión, dolor corporal, enfermedades gastrointestinales indigestión, constipación), ataques de pánico y episodios psicóticos. Por otra parte el estrés crónico ha mostrado causar alteraciones a nivel físico, comportamental y psicológico, promoviendo el desarrollo de psicopatías. Así, enfermedades tales como la ansiedad, la depresión, disfunciones cognitivas, enfermedades cardiovasculares y degenerativas neurovasculares, desórdenes metabólicos y trastornos del sueño, entre otras, son inducidas por la activación

prolongada del sistema de estrés (Sapolsky, 2004; Chrousos, 2009). Asimismo, la magnitud y severidad de estos desórdenes dependerán del momento en la vida de un organismo en el cual dicho estrés sucede, así como también de la presencia de factores genéticos, epigenéticos y de la resilencia del individuo al estrés. El desarrollo prenatal, la infancia y la adolescencia son períodos de la vida particularmente vulnerables al estrés, por lo tanto la presencia de agentes estresantes durante estos períodos críticos del desarrollo pueden generar consecuencias a largo plazo sobre el individuo (Chrousos, 2009).

1.2- EL ESTRES DURANTE LA GESTACION.

I.2.1- El eje HHA materno.

Se ha demostrado que los mamíferos sufren cambios fisiológicos y comportamentales durante la gestación que preparan a la madre para el nacimiento y para el cuidado de sus crías durante el período de lactancia. Estos cambios incluyen la activación de comportamientos maternales y modificaciones en el sistema de estrés materno. Son fundamentales para el correcto desarrollo de la cría y también para la preservación de la salud mental de la madre (Slattery y Neumann, 2008).

En humanos y algunos primates no humanos la placenta expresa POMC, βendorfinas y una forma placentaria de la hormona liberadora de corticotrofina (CRHp). Esta última es liberada a la circulación y actúa en los cerebros de la madre y del feto, activando la respuesta del eje HHA. De esta manera se liberan glucocorticoides que influyen sobre la síntesis de la CRHp pero a diferencia de lo que ocurre con la liberación del CRH hipotalámico, la acción de glucocorticoides en la placenta establecen un mecanismo retroalimentación positiva para su liberación (Mendelson, 2009; Sandman y col., 2011). La actividad biológica del péptido (CRHp en humanos ó CRH hipotalámico en el resto de los animales) se ve modulada por la presencia de globulinas transportadoras de CRH que se encuentran en el plasma y en el fluido amniótico. Hacia el final de la gestación los niveles plasmáticos de estas globulinas disminuyen abruptamente, facilitando la biodisponibilidad del CRH activo en plasma. Como consecuencia, se induce un aumento en los niveles de ACTH y β-endorfinas, colaborando conjuntamente para la adaptación materna en el inicio del trabajo de parto y en la organización del sistema nervioso del feto (Huizink y col., 2004; Weinstock, 2005; Sandman y col., 2011).

Los niveles fisiológicos de los glucocorticoides maternos también van incrementando gradualmente durante la gestación como consecuencia del aumento en CRH (y CRHp en primates). Si bien por su naturaleza liposoluble estas hormonas pueden atravesar la placenta y la barrera hematoencefálica, los niveles fisiológicos de los glucocorticoides fetales se mantienen en concentraciones menores que las maternas gracias a dos mecanismos de

control: la acción de proteínas transportadoras de glucocorticoides, cuyos niveles a su vez son regulados por los niveles de estrógenos; y la actividad de la enzima 11β- hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11βHSD2) que cataliza la conversión de los glucocorticoides activos a la forma inerte: 11dehidrocortisona (Weinstock, 2005; Cottrell y Seckl, 2009; Sandman y col., 2011; Weinstock, 2011). Hacia el final de la gestación la actividad de la 11βHSD2 decae, asegurando altas concentraciones de glucocorticoides necesarias para la maduración de sistemas de órganos y tejidos fetales, promoviendo la diferenciación celular. En efecto se requieren altos niveles de glucocorticoides para completar el desarrollo del SNC y de los pulmones, ya que les confiere a estos últimos la capacidad de sintetizar la enzima surfactante (Cottrell y Seckl, 2009; Sandman y col., 2011). Por último, los elevados niveles de glucocorticoides junto a los niveles de CRHp favorecen la síntesis de citoquinas, prostaglandinas y de la hormona oxitocina que participan en los procesos inflamatorios y en las contracciones uterinas que desencadenan el parto (Moguilevsky, 2005; Weinstock, 2005; Mendelson, 2009).

Durante la lactancia, el reflejo de succión de la cría induce un aumento en la actividad basal del eje HHA materno, incrementándose los niveles de glucocorticoides y de ACTH en la circulación de la madre. Se ha demostrado que los glucocorticoides actúan a nivel de las células productoras de la leche, a la vez de que modulan la intensidad del comportamiento maternal sobre las crías (Catalani y col., 2011). Al mismo tiempo, los efectos deletereos del exceso de glucocorticoides sobre el desarrollo del neonato y sobre el metabolismo de la madre se ven suprimidos gracias a que, a pesar del aumento en el estado basal del eje HHA materno, éste sufre una atenuación en su reactividad frente a situaciones estresantes y sólamente aquellos eventos que representen un riesgo para la supervivencia del recién nacido generarán una respuesta del sistema de estrés materno (Slattery y Neumann, 2008; Catalani y col., 2011; Larsen y Grattan, 2012). La atenuación en la reactividad al estrés del eje HHA materno se produce por un aumento en la actividad de los sistemas centrales encargados de inhibir al eje adrenal y por la reducción de las vías excitatorias al mismo, como la liberación de noradrenalina, CRH y opioides. En este aspecto, la acción de las hormonas oxitocina y prolactina es

muy importante. Hacia el final de la gestación y durante la lactancia dichas hormonas son sintetizadas principalmente en la hipófisis. Tras ser liberadas al flujo sanguíneo actúan en los órganos blanco periféricos, interviniendo en la promoción del trabajo de parto, la lactogénesis, la eyección de la leche y el comportamiento materno. Sin embargo, se ha demostrado que la síntesis y liberación de ambas hormonas en el hipotálamo y la amígdala donde modulan el comportamiento materno, ejercen efectos ansiolíticos y colaboran en la atenuación de la respuesta del eje HHA al interferir con la acción excitatoria de la adrenalina y los opioides sobre el eje, al mismo tiempo que modulan la liberación de ACTH (Slattery y Neumann, 2008; Larsen y Grattan, 2012).

1.2.2- Consecuencias del estrés prenatal sobre la descendencia.

El desarrollo de un organismo está determinado no solamente por el contenido informacional que lleva en sus genes, sino también por su interacción con el entorno. En particular, el feto es susceptible a cambios producidos en el ambiente hormonal y metabólico que lo acompañan durante la gestación. El término de "programación fetal" se ha definido como la acción de ciertos estímulos ó eventos capaces de inducir cambios permanentes en la expresión génica de un organismo cuando ocurren durante períodos críticos del desarrollo (Kemme y col., 2007; Sandman y col., 2011). El ambiente perinatal y la salud materna durante la gestación, son dos factores muy importantes que influyen profundamente sobre el desarrollo del individuo. Basta que uno (o ambos) de estos factores se altere, para que se induzcan consecuencias a largo plazo sobre la función comportamental, endócrina y reproductiva del individuo en desarrollo (Weinstock, 2001; Mastorci y col., 2009).

En los seres humanos, factores tales como la desnutrición materna, la presencia de trastornos mentales en la madre, el abuso en el consumo de drogas y/o alcohol, la presencia de infecciones, la exposición a toxinas ambientales y a agentes estresantes, entre otros factores, son capaces de comprometer el desarrollo fetal (Charil y col., 2010). En este aspecto, durante los últimos años se han realizado numerosas investigaciones acerca de los efectos que el estrés prenatal produce sobre la descendencia. Si bien no todos los individuos presentan la misma vulnerabilidad frente a determinado evento estresante, comprenderemos como "agente estresante durante la gestación" a

todo aquel factor que genere un desequilibrio emocional sobre el individuo y/o que afecte su supervivencia (por ejemplo la pérdida de un familiar cercano, violencia, problemas socio-económicos, exposición a desastres naturales, guerras, etc.) (Weinstock, 2011). La etiología de varias patologías que afectan el desarrollo físico, cognitivo, comportamental y emocional ha sido adjudicada al estrés prenatal. Durante la niñez, el estrés gestacional ha sido relacionado con una mayor incidencia en nacimientos prematuros, bajo peso al nacer, retrasos en el habla y en el inicio de las actividades locomotoras. También se lo relacionó con la presencia de disminuciones en el volumen de materia gris en ciertas áreas cerebrales y con trastornos comportamentales (y emocionales) como autismo, el síndrome de hiperactividad y déficit de atención (ADHD por sus siglas en inglés: attention deficit hyperactivity disorder), trastornos en la memoria y en el aprendizaje, hiperactividad, mayor percepción del miedo, alteraciones en el sueño y una elevada predisposición a desarrollar el síndrome de La Tourette. En la adolescencia y la vida adulta, los individuos cuyas madres habían sufrido algún tipo de estrés durante la gestación presentaban una mayor vulnerabilidad a desarrollar enfermedades cardiovasculares y desórdenes metabólicos, así como también trastornos psiquiátricos tales como la esquizofrenia, la depresión y propensión al consumo de drogas (Weinstock, 2001; Andersen, 2003; Charmandari y col., 2003; Huizink y col., 2004; Holmes y col., 2005; Weinstock, 2005; Kinney y col., 2008; Mastorci y col., 2009; Charil y col., 2010; Sandman y col., 2011; Weinstock, 2011).

La relación entre los efectos antes descriptos en seres humanos y el posible estrés severo padecido por la madre durante la gestación, pudo inferirse mediante estudios *retrospectivos* y *prospectivos*. En los estudios retrospectivos se asumía que la madre había sufrido un estrés severo durante el embarazo, ya que dicho momento coincidía con algún tipo de guerra o desastre natural (terremotos, inundaciones, etc.), capaces de desencadenar una trauma emocional significativo en la madre. En los estudios prospectivos se realizaba un seguimiento de cada caso particular desde la gestación, donde el agente causal del estrés prenatal era inferido mediante entrevistas o cuestionarios completados por las madres, en los que se tenían en cuenta las dificultades socio-económicas o la pérdida de algún ser querido durante el período de la

gestación. Si bien los resultados obtenidos en ambos tipos de estudios confirmaban la estrecha relación entre el estrés prenatal y la presencia de diversas afecciones en el transcurso de la vida de un individuo, se encontraron dificultades en replicar las observaciones posiblemente debido a la interacción entre factores prenatales, genéticos y postnatales actuando en diferentes direcciones (Weinstock, 2001). Es por ello que a pesar de la importancia de los estudios realizados en humanos, la mayoría de los experimentos acerca de los efectos del estrés gestacional sobre el desarrollo y el comportamiento en la descendencia han sido abordados mediante el uso de modelos animales. De esta manera es más factible el control de múltiples variables tales como las diferencias genéticas, las características del estrés utilizado y el entorno postnatal, entre otros factores, a diferencia de lo que ocurre al trabajar con poblaciones de seres humanos (Charil y col., 2010). Como contraparte, el uso de animales de experimentación impide determinar con certeza la existencia de comportamientos observados en seres humanos como por ejemplo el miedo y la ansiedad percibidos por la mujer gestante al sufrir estrés. Al mismo tiempo respuestas comportamentales del tipo "emocionales" o "psicológicas" tienen un elevado componente genético, por esta razón la respuesta al estrés en diferentes modelos animales puede diferir (Gilad y Gilad, 1995; Holmes y col., 2005). No obstante, y a pesar de ciertas limitaciones, se han realizado numerosos estudios en roedores (y en menor proporción en primates no humanos). Éstos han demostrado que los efectos inducidos por el estrés prenatal remedan aquellos descriptos en humanos (Ward y col., 2000; Weinstock, 2001; Mastorci y col., 2009; Charil y col., 2010): bajo peso al nacer, retrasos en el aprendizaje y deficiencias de la memoria, hiperactividad frente a estímulos nuevos ó adversos, comportamientos similares a la depresión y la ansiedad (Ishiwata y col., 2005; Louvart y col., 2005; Van den Hove y col., 2005; Son y col., 2006). También, se ha reportado una mayor vulnerabilidad a la autoadministración de drogas de abuso tales como la anfetamina (Fride y Weinstock, 1989; Wakshlak y Weinstock, 1990; Deminiere y col., 1992; Henry y col., 1995) y la nicotina (Koehl y col., 2000). Asimismo se han encontrado alteraciones en el desarrollo motor, la actividad exploratoria comportamiento locomotor, y en muchos casos estas diferencias dependían de

la edad y sexo en las cuales se evaluaban dichos parámetros (Henry y col., 1995; Diaz y col., 1997; Pallares y col., 2007).

1.2.3- Posibles mecanismos de transducción del estrés desde la madre al feto.

Si bien las vías implicadas en la transducción del estrés percibido por la madre hacia el feto continúan siendo objeto de estudio, actualmente se postula que serian al menos cuatro los mecanismos posibles:

1.2.3- a) Aumento en la producción de hormonas sintetizadas por la placenta.

Este mecanismo tendría lugar en humanos y algunos primates, donde la placenta sintetiza CRHp hacia la circulación materna y fetal. Cuando la unidad feto/placenta detecta alguna señal de estrés por parte del entorno (por ejemplo la presencia de un exceso en los niveles de cortisol) el "reloj placental" sufre un avance que activa la región promotora del gen de CRHp. Al aumentar los niveles en circulación de CRHp, se estimulará de forma positiva la activación de los ejes HHA materno y fetal, aumentando de esta manera aun más la producción de cortisol y por ende, la liberación de una mayor proporción de CRHp. El rápido incremento en suero del péptido inicia una cascada de eventos que repercutirán sobre la activación del miometrio y sobre el flujo sanguíneo entre el feto y la placenta, incrementando el riesgo de partos prematuros (Sandman y col., 2011). En paralelo, el CRHp alcanza el cerebro fetal e influye sobre el hipotalamo fetal, activando receptores para el péptido. Por otra parte, existen otras áreas cerebrales ricas en el receptor para CRH, tales como la amígdala y la corteza, que pueden unir a la CRHp circulante (Charil y col., 2010). Por lo tanto, el feto va ajustando su trayectoria de desarrollo y modificando su sistema nervioso en función de las señales que recibe del entorno materno a fin de asegurar su supervivencia en un ambiente hostil. Así, se han registrado disminuciones en la respuesta de habituación del feto a estímulos acústicos, probablemente por la acción directa de CRH sobre receptores específicos de la amígdala, el HPC y la corteza límbica del feto (Weinstock, 2005); alteraciones en la maduración del eje HHA fetal (Huizink y col., 2004); y disminuciones en el volumen de la materia gris del cerebro de una forma área-específica (Sandman y col., 2011).

I.2.3- b) Modificaciones en el flujo sanguíneo entre el útero y la placenta.

El aumento en las concentraciones de cortisol y catecolaminas, como consecuencia de la activación del sistema de estrés en las madres gestantes, generan una mayor vasoconstricción. En particular, la placenta posee un alto número de receptores adrenérgicos que en presencia de estas hormonas produce una disminución en la perfusión de oxígeno y nutrientes entre el útero y la placenta ya que aumentan la resistencia vascular. De esta manera se altera la morfología y el crecimiento de la placenta, afectándose también el suministro de nutrientes y oxígeno al feto ocasionando por ejemplo bajo peso al nacer (Weinstock, 2001, 2005; Charil y col., 2010).

Por otra parte, las fluctuaciones en la disponibilidad de oxígeno producen estrés oxidativo en la placenta con la consecuente liberación de radicales libres y citoquinas pro/anti-inflamatorias cuya presencia también contribuye al desarrollo de desórdenes neurales (Charil y col., 2010),

1.2.3- c) Alteraciones en los niveles de glucocorticoides.

Este mecanismo es uno de los más estudiados y posee el mayor número de evidencias experimentales que lo justifican. Propone a los glucocorticoides como los transductores principales entre los efectos percibidos por la madre hacia el feto (Mastorci y col., 2009). En primer lugar, porque estas hormonas son producidas en gran cantidad al activarse el sistema del estrés materno. En segundo lugar por su naturaleza liposoluble que les permite cruzar fácilmente la placenta y la barrera hematoencefálica alcanzando el cerebro fetal. Si bien la acción de la enzima 11BDHG2 actúa como barrera del flujo de glucocorticoides hacia el feto, frente a un exceso de hormona la enzima se satura (Weinstock, 2005; Sandman y col., 2011). Además se ha observado que los glucocorticoides desregulan la síntesis y la actividad de la enzima 11BDHG2 dejando al feto menos protegido (Cottrell y Seckl, 2009; Charil y col., 2010). Por su parte la placenta produce y metaboliza otras proteínas y hormonas glucocorticoide-dependientes, tales como prostaglandinas, progesterona, estrógenos, transportadores de glucosa y lactógeno placentario. Como consecuencia se produce un desorden en la preñez que aumenta el riesgo de partos prematuros y preclampsia (Charil y col., 2010).

Se ha demostrado que el tratamiento perinatal con glucocorticoides sintéticos como la dexametasona y la betametasona en aquellos casos donde el desarrollo pulmonar del feto era insuficiente y su vida estaba en peligro, reduce el peso al nacer, aumenta el riesgo a contraer enfermedades cardiometabólicas, perturbaciones en el eje HHA y desórdenes afectivos (Matthews, 2001; Cottrell y Seckl, 2009). Además los glucocorticoides sintéticos no son inactivados por la acción de la enzima 11βDHG2, por lo tanto pueden alcanzar libremente a la circulación fetal (Huizink y col., 2004).

En roedores, la exposición *in útero* a elevados niveles de glucocorticoides sintéticos induce efectos neurotóxicos sobre el cerebro alterando el desarrollo neural y disminuyendo el tamaño hipocampal (Huizink y col., 2004; Charil y col., 2010). Por otra parte, Barbazanges y colaboradores (1996a) empleando un modelo de ratas adrenalectomizadas y ratas adrenalectomizadas compensadas con glucocorticoides exógenos pudieron demostrar que los glucocorticoides maternos intervenían directamente en los efectos producidos por el estrés prenatal en el eje HHA de la descendencia (Barbazanges y col., 1996a; Maccari y col., 2003).

I.2.3- d) Variaciones en el comportamiento maternal.

Esta teoría se focaliza en el estudio del entorno social del individuo, durante los primeros estadios de la vida. Los estudios han sido realizados principalmente en roedores, en los cuales la formación del cerebro se completa durante las primeras semanas de la vida postnatal (Holmes y col., 2005) y donde se ha mostrado que variaciones en el comportamiento maternal inducen diferencias cognitivas, comportamentales y endócrinas en las crías (Champagne y col., 2004). Esta teoría propone que la aplicación de estrés durante la gestación ejerce efectos sobre la descendencia no solamente por la acción del entorno hormonal materno sobre el feto, sino también mediante la acción de otro tipo de factores que pueden ser transmitidos de la madre hacia la progenie durante la lactancia. Se ha demostrado que el estrés por restricción aplicado durante la última semana de gestación en ratas, induce un aumento en el estado de ansiedad materno que perdura incluso hasta un mes después del parto (Darnaudery y col., 2004), y disminuye la frecuencia de comportamientos maternales estereotipados. A la vez, dichos efectos sobre el

comportamiento materno estarían asociados a alteraciones en los niveles de oxitocina y prolactina en la circulación materna (Champagne y Meaney, 2006; Slattery y Neumann, 2008). De esta manera, el cuidado materno durante la lactancia en las madres que sufrieron estrés durante la preñez difiere del de las madres que habían gestado sin perturbaciones, y ello afectaría el desarrollo de la progenie (Maccari y col., 2003). En otras líneas de investigación, se han realizado trabajos de adopción cruzada, donde instantes posteriores al nacimiento la madre biológica era sustituida por otra. Se ha demostrado que el cuidado maternal de la hembra sustituta era mayor y que esto revertiría algunos de los efectos inducidos por el estrés prenatal (Maccari y col., 1995; Barbazanges y col., 1996b; Barros y col., 2004). Por otro lado, también se han evaluado los efectos de la separación materna durante la lactancia y la manipulación temprana o "handling". Dependiendo del tiempo de exposición a estos tratamientos, la frecuencia y el momento de vida en el cuál se aplicaban, se han encontrado diversos efectos sobre el comportamiento de la descendencia, mostrando también que la fase postnatal podía influir sobre el desarrollo de un individuo (Liu y col., 1997; Maccari y col., 2003; Cannizzaro y col., 2006).

1.2.4- Efectos del estrés prenatal sobre la neurobiología de la descendencia.

El desarrollo de estructuras nerviosas a lo largo de la gestación está determinado espacio-temporalmente por una serie de instrucciones genéticas estrictas y específicas de cada especie animal. Comprende eventos como la proliferación celular, la diferenciación, la migración, extensión de procesos neurales y establecimiento de conexiones entre tipos celulares diferentes (como por ejemplo neuronas y células gliales). Al mismo tiempo, una gran variedad de agentes neuroactivos (neurotransmisores, neuromoduladores y factores de crecimiento) interactúan de forma coordinada para el correcto establecimiento de los contactos sinápticos y de las arborizaciones dendríticas (Andersen, 2003). Debido a la velocidad en la cual suceden los cambios durante el desarrollo del cerebro fetal, éste es muy vulnerable a los efectos que la exposición a agentes exógenos y/ó a la información proveniente del entorno maternal puedan inducir sobre su desarrollo. De forma que las hormonas y/u otros factores pueden alterar la correcta conexión neural, reducir la plasticidad

y la actividad de los neurotransmisores que, a largo plazo, inducen cambios en la función cognitiva y el comportamiento del individuo que se está desarrollando (Weinstock, 2008). La aplicación de diversos protocolos de estrés en distintos períodos de la gestación, ha permitido obtener correlatos entre alteraciones en la formación de estructuras cerebrales específicas y el comportamiento consecuente. La mayoría de los estudios acerca de los efectos del estrés prenatal sobre el desarrollo del sistema nervioso de la descendencia se han realizado principalmente en ratas, pero también algunos trabajos fueron realizados en monos Rhesus (Mastorci y col., 2009; Charil y col., 2010). Los roedores y los primates (incluyendo a los humanos) difieren en un gran número de aspectos, pero dos de ellos son: la duración de la gestación (21.5 días para ratas; 165 días para monos; 270 días para humanos) y el estado de maduración del cerebro al momento de nacer. Los roedores completan el desarrollo de varias de sus estructuras nerviosas recién durante las primeras semanas de vida, mientras que en primates el sistema nervioso ya se encuentra completo al momento del nacimiento (Weinstock, 2001; Huizink y col., 2004; Charil y col., 2010; Weinstock, 2011). Por otra parte, la tasa de crecimiento del cerebro humano es menor que la de la rata o la de otros primates, ya que el cerebro humano continúa creciendo hasta la infancia en la mayor parte de las áreas y hasta la edad adulta temprana en algunas otras áreas. Como consecuencia de ello, la programación temprana se produciría fundamentalmente durante el período perinatal y postnatal temprano en ratas, principalmente en el período prenatal en monos rhesus y sobre un período mayormente prolongado en humanos incluyendo tanto la gestación como los primeros años de vida. Por esta razón es que es necesario ser muy cautos al momento de realizar extrapolaciones que pudieran explicar algún fenómeno en humanos en base a los hallazgos observados en animales de experimentación (Sikich y Todd, 1988).

I.2.4- a) Efectos del estrés prenatal sobre la programación del eje HHA del feto.

Evidencias experimentales en modelos animales han demostrado que tanto la administración prenatal de glucocorticoides sintéticos como la exposición a estrés durante la gestación aumentan la presión sanguínea y alteran la

respuesta al estrés de la descendencia, indicando modificaciones en la respuesta del eje HHA (Cottrell y Seckl, 2009). En roedores, se ha encontrado que el estrés prenatal induce elevados niveles basales de glucocorticoides en plasma respecto a individuos controles (Koehl y col., 1999; Matthews, 2001; Huizink y col., 2004). La activación del sistema de estrés es de mayor rapidez, magnitud y duración en el tiempo respecto a individuos que no habían sufrido estrés prenatal, mientras que la respuesta de habituación frente a un estrés prolongado es menor (Henry y col., 1995; Maccari y col., 1995; Vallee y col., 1996).

En primates no humanos, se observó que la exposición a glucocorticoides sintéticos durante la gestación induce un aumento en los niveles de cortisol circulantes de la descendencia, ya sea en condiciones basales o frente a la exposición de un estrés agudo (Matthews, 2001).

El exceso de glucocorticoides maternos como consecuencia del estrés, serían los responsables de los efectos recién descriptos sobre el eje HHA fetal: al alcanzar el hipocampo fetal, las hormonas interfieren con la síntesis de receptores para glucocorticoides, disminuyendo su afinidad por el ligando y afectando además la supervivencia de las neuronas al actuar como agentes neurotóxicos (Huizink y col., 2004; Cottrell y Seckl, 2009). Esta teoría está basada en evidencias experimentales ya que se ha encontrado que el número de receptores hipocampales para glucocorticoides (GR y MR) en la descendencia disminuyen como consecuencia de la exposición a estrés prenatal (Maccari y col., 1995; Barbazanges y col., 1996a; Maccari y col., 2003; Weinstock, 2011). Así, al demostrarse que el mecanismo mediante el cual se desregula la activación del eje se encuentra alterado, es posible comprender por qué los niveles de glucocorticoides circulantes en los individuos expuestos a estrés prenatal son mayores que los encontrados en los animales controles.

I.2.4- b) Efectos del estrés prenatal sobre la morfología de áreas cerebrales límbicas.

Las vías neurales de estructuras cerebrales como la CPF, el HPC y la amígdala intervienen en procesos de aprendizaje, memoria y respuesta al estrés. Debido a que el estrés gestacional, o la exposición a glucocorticoides

sintéticos, produce perturbaciones en dichos comportamientos (tanto en humanos, como en animales de experimentación), varios investigadores se enfocaron en las consecuencias a largo plazo del estrés prenatal sobre la morfología de dichas áreas cerebrales (Huizink y col., 2004; Weinstock, 2011). Tanto en primates como en roedores, el HPC es una de las primeras estructuras nerviosas en desarrollarse. Además, las neuronas piramidales hipocampales expresan receptores para glucocorticoides. Se ha observado que el estrés durante los días gestacionales 15 a 21 en roedores induce disminuciones en el número de sinapsis en el HPC de la progenie (Weinstock, 2001; Charil y col., 2010). Del mismo modo trabajos realizados en ratas y en monos, mostraron que la exposición a estrés prenatal o la administración prenatal de dexametasona inducía regresiones neuronales y disminuciones en el número de arborizaciones dendríticas de las regiones CA1 y CA3 del HPC de machos adultos (Weinstock, 2011). Asimismo se observó que cuanto mayor era la dosis suministrada de glucocorticoides exógenos, mayores eran los daños observados (Charil y col., 2010). Tal como se expuso en la sección anterior, las alteraciones en el desarrollo hipocampal van acompañadas de trastornos en la programación del eje HHA; pero además, tanto en humanos, como en animales de experimentación, inducen deficiencias en el aprendizaje espacial del individuo (Matthews, 2001).

La amígdala es una estructura nerviosa que participa activamente en la génesis de respuestas comportamentales como el miedo, la ansiedad y trastornos de humor. Estudios en ratas han mostrado que el estrés prenatal durante la última semana de gestación induce efectos a largo plazo sobre la amígdala de los fetos en desarrollo. Se registró una reducción en el volumen de los núcleos basolateral, central y lateral, y se observó una disminución en el número de neuronas y de células gliales en los mismos núcleos, en comparación a lo observado en individuos control. Al mismo tiempo, dichos cambios parecían revertirse cuando los individuos alcanzaban la pubertad (Charil y col., 2010). Por otra parte, los glucocorticoides estimulan la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de CRH en la amígdala; por lo tanto al haber mayor concentración de esteroides circulantes como consecuencia del estrés, existe un aumento en la producción de CRH. Esto explicaría la

hiperactividad y el comportamiento ansiogénico observado en los animales expuestos a estrés prenatal (Huizink y col., 2004).

La corteza cerebral prefrontal (CPF) es la responsable de una gran variedad de procesos tales como la memoria de trabajo, planificación, resolución de problemas y el control de ciertos aspectos del lenguaje en humanos (Charil y col., 2010; Sandman y col., 2011). Se ha encontrado que el estrés prenatal induce una reducción en el número de vesículas sinápticas y en el número de arborizaciones dendríticas en la corteza de machos adultos (Barros y col., 2006; Weinstock, 2011). Al mismo tiempo se ha observado que el estrés prenatal suprime el dimorfismo sexual existente entre machos y hembras en cuanto al espesor de la corteza cerebral de ratas adultas: generalmente la corteza derecha de los machos es más delgada que la izquierda, mientras que en hembras sucede lo contrario. En machos prenatalmente estresados esta diferencia se pierde sugiriendo la presencia de daño o pérdida neural (Charil y col., 2010). Estudios retrospectivos realizados en humanos mediante análisis de imágenes obtenidas por resonancia magnética mostraron que aquellos individuos cuyas madres habían presentado un estado de ansiedad incrementado durante el segundo trimestre de la gestación, presentaban una reducción en el volumen de la CPF (Sandman y col., 2011).

Por último se ha encontrado que el estrés prenatal también genera alteraciones morfológicas en determinados núcleos dimórficos hipotalámicos de roedores. Se ha observado que el estrés prenatal disminuye el tamaño del área preóptica y aumenta el número de neuronas presentes en el núcleo anteroventral paraventricular. De esta manera el tamaño de esos núcleos hipotalámicos se asemejaría al de las hembras. Muchos autores asocian estas alteraciones morfológicas con la feminización registrada en el comportamiento reproductor en algunos machos que habían sufrido estrés prenatal (Weinstock, 2001; Charil y col., 2010).

I.2.4- c) Efectos del estrés prenatal sobre neurotransmisores.

Los neurotransmisores constituyen los mensajeros químicos de la transmisión de información entre células vecinas dentro del SNC. Son generalmente moléculas de bajo peso molecular que se sintetizan en las neuronas y se

almacenan dentro de vesículas en las terminales neuronales. Frente al aumento en el flujo de calcio como consecuencia de un potencial de acción desencadenado en la neurona, las vesículas sinápticas liberan su contenido en el espacio sináptico y los neurotransmisores difunden al espacio extracelular donde se unen a receptores específicos en las células postsinápticas. Según la naturaleza de dicho receptor, se desencadenará una serie de acontecimientos que originarán la respuesta fisiológica del tipo excitatoria o inhibitoria en la célula estimulada. Dentro del SNC, los diferentes núcleos cerebrales pueden diferenciarse no solamente por su morfología y contactos sinápticos, sino también por los neurotransmisores que sintetizan y por los receptores específicos que se encuentran en la membrana neuronal (Bear y col., 2001). Los sistemas de neurotransmisión mas importantes en el SNC son el de los aminoácidos (glutamato y aspartato, GABA y glicina), aminas biógenas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), péptidos y purinas. Los diferentes sistemas de neurotransmisores dirigen múltiples procesos fisiológicos. Su funcionamiento ha permitido descubrir la etiología de múltiples enfermedades, así como también los efectos inducidos por la administración de ciertas sustancias las bases neurales dirigen que diferentes patrones comportamentales de los organismos (Bear y col., 2001). Numerosos estudios han investigado las consecuencias del estrés prenatal sobre diversos sistemas de neurotransmisores, registrándose importantes cambios sobre comportamiento de la descendencia (figura I.3) (Mastorci y col., 2009); por ejemplo, se ha reportado un aumento en las concentraciones cerebrales de 5-HT, así como también un incremento en su tasa metabólica. Del mismo modo se han registrado aumentos en las concentraciones basales hipotalámicas de noradrenalina y de Ach en el hipocampo (Huizink y col., 2004).

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia en el SNC de los mamíferos e integra funciones cerebrales y modula procesos de plasticidad sináptica. Se ha encontrado que el estrés prenatal altera el número de receptores metabotrópicos del tipo mGlu2/3 y altera el buen funcionamiento del receptor NMDA hipocampal (Son y col., 2006; Zuena y col., 2008). Estudios de nuestro laboratorio han mostrado, entre otros efectos, que los niveles del receptor NMDA se encuentran aumentados en la CPF, el NAc y la región CA1

del hipocampo (Berger y col., 2002). Concomitantemente al cambio en los receptores, se encontró una reacción astroglial aumentada y una reducción en el número de arborizaciones dendríticas en la CPF y la región CA1 hipocampal de ratas macho adultas (Barros y col., 2006).

Por último, la dopamina (DA) es el principal neurotransmisor catecolaminérgico en el cerebro de los mamíferos, donde controla una gran variedad de funciones tales como la regulación de la postura y el movimiento, la integración entre la voluntad y la toma de decisiones, el comportamiento y el aprendizaje, y secreciones neuroendrócrinas (Baier y col., 2012). Los trastornos en la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesocórticolímbicas estarían relacionados con la expresión de varios desórdenes psiguiátricos y neurológicos (Deutch, 1993), que también se observan en individuos con una historia de estrés prenatal (Weinstock, 2001). Por esta razón el sistema dopaminérgico y las desregulaciones inducidas por el estrés prenatal sobre dicho sistema han sido objeto de estudio durante los últimos años, especialmente en nuestro laboratorio.

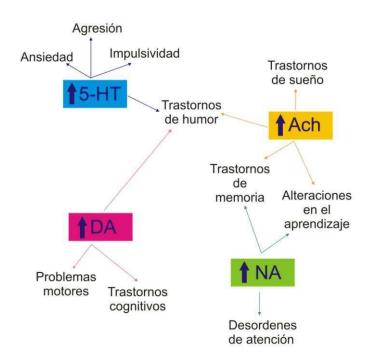


Figura I.3. Efectos del estrés prenatal sobre la concentración cerebral de neurotransmisores y sus posibles consecuencias sobre el comportamiento. 5-HT = serotonina; Ach= acetilcolina; DA= dopamina; NA= noradrenalina. (Huizink y col., 2004).

I.3- EL SISTEMA DOPAMINERGICO

I.3.1- Descripción del sistema dopaminérgico.

El número estimado de neuronas en el sistema dopaminérgico mesodiencefálico bilateral adulto (A8-A10) varía entre 45.000 en ratas y 400.000-600.000 en humanos. Dichas neuronas proyectan hacia áreas cerebrales anteriores y reciben a su vez aferencias desde otras regiones del cerebro (Baier y col., 2012). Se han descripto cuatro vías principales de neuronas dopaminérgicas (Iversen y col., 2009; Baier y col., 2012) (**figura I.4**):

- 1) El sistema nigroestriatal involucra proyecciones neuronales que se originan en las neuronas de la substantia nigra pars compacta del mesencéfalo (SNc) (A8-A10) hacia el núcleo caudado y el putamen del cuerpo estriado (CPu). Esta vía constituye el 70% del contenido total de DA en el cerebro y cumple un rol muy importante en el control de los movimientos voluntarios. En la enfermedad de Parkinson se observan degeneraciones de esta vía.
- 2) El sistema mesolímbico se origina en el área tegmental ventral (VTA por sus siglas en inglés: ventral tegmental area) del mesencéfalo (A10) y envía proyecciones ascendentes hacia el núcleo accumbens (NAc), al tubérculo olfatorio y el núcleo septal. Sus aferencias también alcanzan la amígdala, el HPC y la corteza entorrinal. Estas áreas están consideradas como componentes del sistema límbico por estar relacionadas con el aprendizaje, las emociones y la memoria. También abarca las áreas cerebrales que median los refuerzos positivos, la recompensa, la toma de decisiones y los estados de ánimo. Por esta razón es que su disfunción se relaciona con la etiología de patologías de desorden psíquico tales como la depresión, la esquizofrenia, la paranoia y la manía. Los fenómenos de adicción y los efectos de sensibilización luego de la exposición repetida a drogas de abuso se han relacionado con un aumento de la transmisión dopaminérgica de este sistema.
- 3) El sistema mesocortical comprende cuerpos neuronales del VTA (A10) que proyectan sus axones hacia la neocorteza, particularmente en áreas mesoprefrontales. La CPF está involucrada en un amplia variedad de funciones cognitivas, y está asociada a los procesos de atención. Alteraciones de este

sistema se han vinculado con la etiología de patologías tales como la esquizofrenia y ADHD.

4) El sistema tuberoinfundibular involucra neuronas secretoras desde el núcleo arcuato y el paraventricular del hipotálamo dorsomedial (A12, A14), que proyectan sus axones hacia la eminencia media del hipotálamo inferior y la hipófisis intermedia. En este sistema, la DA es liberada como una hormona regulando de forma negativa la secreción de prolactina. Esta vía está relacionada con la lactancia, la fertilidad, el mantenimiento de la homeostasis frente al estrés, modulación de procesos inmunes y el desarrollo de comportamientos del tipo sexuales o maternales (Freeman y col., 2000).

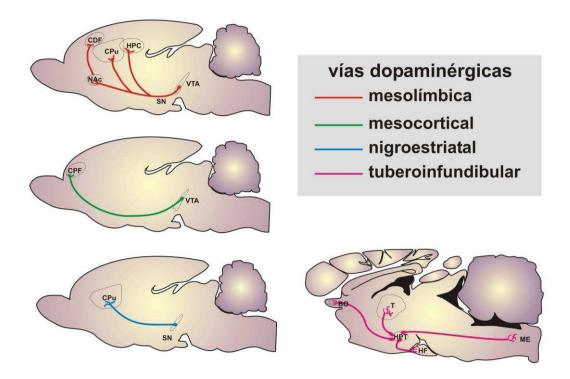


Figura I.4. Esquema de cortes sagitales de cerebro de ratas donde se muestran las principales vías dopaminérgicas: sistema mesolímbico, sistema mesocortical, sistema nigroestriatal y sistema tuberoinfundibular. Bulbo olfatorio (BO), corteza dorsal frontal (CDF), corteza prefrontal (CPF), caudado putamen (CPu), núcleo accumbens core (NAc), hipocampo (HPC), tálamo (T), hipotálamo (HPT), hipófisis (HF), área tegmental ventral (VTA), substantia nigra (Resnick y col.) y médula espinal (ME). Figura adaptada de (Baier y col., 2012).

Estos cuatro sistemas dopaminérgicos involucran neuronas dopaminérgicas que regulan efectos neurofisiológicos excitatorios ó inhibitorios, al interactuar con sistemas de retroalimentación mediados a su vez por aminoácidos excitatorios como el glutamato, o inhibitorios como el GABA (Graybiel, 1990). Por último, además de las cuatro vías descriptas, se han hallado interneuronas dopaminérgicas en el bulbo olfatorio y en la retina neural (Kuhar y col., 1999).

El desarrollo de las neuronas dopaminérgicas es un proceso complejo donde intervienen varios pasos (Van den Heuvel y Pasterkamp, 2008). La participación de los siguientes factores de transcripción cumplen un rol muy importante durante el desarrollo dopaminérgico: Nurr1 (de sus siglas en inglés: nuclear receptor-related factor 1) induce la diferenciación final de precursores dopaminérgicos neuronales del mesencéfalo ventral hacia su fenotipo dopaminérgico (Saucedo-Cardenas y col., 1998); Pitx3 (de sus siglas en inglés: paired-like homedomain transcription factor 3) se expresa en todas las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y está específicamente involucrado en la diferenciación terminal y el mantenimiento de las neuronas ubicadas en la SNc (Chinta y Andersen, 2005; Smidt y Burbach, 2007); Lmx1a induce la expresión de otros factores de transcripción que en conjunto son requeridos para disparar la diferenciación de las células dopaminérgica (Andersson y col., 2006); y por último, los factores de transcripción de la familia engrailed. En1 y En2, son esenciales para el mantenimiento, generación o diferenciación de las neuronas dopaminérgica (Simon y col., 2001).

I.3.2- Bioquímica de la sinapsis dopaminérgica.

La DA es sintetizada a partir de los aminoácidos precursores fenilalanina y tirosina. Éste último es tomado de la circulación y concentrado dentro del terminal presináptico a través de un sistema de transporte activo para aminoácidos aromáticos. En la vía de síntesis de la DA, la enzima limitante es la *tirosina hidroxilasa* (TH) que junto al cofactor *biopterina*, catalizan la hidroxilación de la tirosina. Luego de su síntesis, la DA es secuestrada desde el citosol y almacenada en vesículas sinápticas, hasta su liberación donde actuará sobre sus receptores específicos (Trifaro y col., 1992). Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y se dividen en dos grupos según su capacidad de activar o inhibir a

la enzima adenilato ciclasa: los receptores de tipo D1 (D1R) estimulan la enzima, mientras que los de tipo D2 (D2R) la inhiben (Kebabian y Calne, 1979). Los D1R se dividen en dos: D1 y D5, difiriendo en su distribución cerebral. Los receptores D1 se expresan en el NAc, amígdala, CPu y CPF, mientras que los D5 se expresan en CPF, HPC y CPu. Los D2R se dividen en 3 grupos: D2, D3 y D4 que principalmente son expresados en el NAc y el tubérculo olfatorio. El D2 a su vez, también se expresa en CPu; el D3 en la Isla de Calleja y VTA; y el D4 en HPC, CPu y CPF (Xu y Zhang, 2004). Por último se encuentran los autoreceptores de DA que se ubican en las mismas terminales presinápticas de las neuronas dopaminérgicas. Contribuyen a la regulación de la síntesis y liberación del neurotransmisor. La estimulación de los autoreceptores con agonistas dopaminérgicos disminuye la actividad dopaminérgica. A su vez, se ha reportado que cumplen un rol muy importante en psicopatías tales como el Parkinson, la esquizofrenia y la drogadicción (Feuerstein, 2008).

I.3.3- <u>Efectos del estrés prenatal sobre el sistema dopaminérgico.</u> Antecedentes de nuestro laboratorio.

Se ha sugerido que las bases neuroquímicas de la patofisiología de varios trastornos neuropsiquiátricos involucrarían alteraciones de la neurotransmisión dopaminérgicas por su rol sobre la regulación de la postura y movimiento, la integración de la voluntad y toma de decisiones, y en procesos cognitivos (Deutch, 1993; Jaber y col., 1996; Finlay y Zigmond, 1997). Por este motivo mucho de los efectos observados en la cría estresada prenatalmente, como el retraso en el desarrollo motor temprano (Barlow y col., 1978), mayor respuesta locomotora a la novedad (Deminiere y col., 1992) y el aumento de la respuesta de miedo en condiciones estresantes (Fride y Weinstock, 1988), han sido atribuidos a cambios en el sistema dopaminérgico. Durante los últimos años nuestro laboratorio ha investigado los efectos del estrés prenatal sobre aspectos comportamentales y bioquímicos del sistema dopaminérgico en ratas.

I.3.3- a) Estrés prenatal, niveles de DA y receptores.

El grupo de Henry y colaboradores (1995) fue el primero en evaluar los niveles de DA en ratas que habían sido expuestas a estrés por inmovilización durante la gestación. En su trabajo hallaron que el estrés prenatal aumentaba

el número de receptores dopaminérgicos de tipo D2 en el NAc, mientras que los receptores de tipo D3 se encontraban disminuidos. Además, hallaron que dichos cambios se hacían evidentes solamente en animales adultos. En ratas prenatalmente estresadas de 3 y 21 días de vida, no se encontraron variaciones en el número de receptores respecto a ratas control. Antecedentes de nuestro laboratorio también han mostrado que el estrés prenatal aumenta los D2R en corteza dorsofrontal, CPF medial, el NAc y la región CA1 del HPC en machos adultos (Berger y col., 2002). Sin embargo, estudios preliminares mostraron una reducción en el número de D2R en la CPF de ratas prepuberales (28 días de vida) prenatalmente estresados en relación a los valores obtenidos por los controles y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales para los niveles hipocampales de D2R en individuos de la misma edad. Asi mismo observamos que los efectos inducidos por el estrés prenatal en crías adultas podían revertirse si las mismas eran adoptadas dentro de los primeros tres días de vida por madres que no habían sufrido estrés durante la gestación: los niveles de receptores dopaminérgicos hallados en las áreas corticales eran similares a los valores observados en los individuos control. Sin embargo si las crías estresadas eran adoptadas por otra madre también estresada durante la gestación, los valores hallados eran similares a los de la cría estresada prenatalmente y criada por su madre biológica (Barros y col., 2004).

Kippin y colaboradores (2008) han demostrado que frente a la estimulación por cocaína, los niveles de la DA extracelular en el NAc aumentaban tanto en ratas expuestas a estrés prenatal *naive* ó experimentadas con cocaína. En nuestro laboratorio, se halló un aumento en los niveles basales de DA en el NAc de las ratas prenatalmente estresadas y lo mismo se observó si éstas eran estimuladas con anfetamina. En ese caso se observó además una disminución en los niveles de DA en la CPF sólo en crías adultas (Silvagni y col., 2008; Carboni y col., 2010).

Los niveles de DA presentan asimetrías en varias áreas cerebrales (Rosen y col., 1984) con una dominancia preferentemente en el hemisferio derecho. Si bien la correlación entre estas asimetrías con un funcionamiento apropiado o un comportamiento específico aun no han sido establecidos (LeMay, 1999), la

pérdida de dicha asimetría ha sido descripta previamente por otros autores en individuos prenatalmente estresados (Weinstock, 2001). Estudios previos de nuestro laboratorio indican que el estrés prenatal incrementa los niveles del receptor D2 tanto en el hemisferio derecho como en el izquierdo en el NAc y en el CPu, pero la asimetría izquierda-derecha del receptor se pierde en el NAc de ratas estresadas prenatalmente (Adrover y col., 2007). Por su parte, el NAc es un area fuertemente relacionada con las propiedades de recompensa de drogas de abuso. Se ha demostrado que daños en el NAc genera en las ratas comportamientos del tipo compulsivos (Cardinal y col., 2004). Dado a que la DA ha sido relacionada con comportamientos del tipo "impulsivos", la pérdida de la asimetría en los receptores de tipo D2 en esta área podría sugerir que el estrés prenatal podría generar alteraciones a largo plazo en el comportamiento y en la cognición que contribuyan al desarrollo de desórdenes neuropsiquiátricos incluyendo al ADHD, depresión y esquizofrenia (Weinstock, 2001; Huizink y col., 2004).

I.3.3- b) Estrés prenatal, DA y factores de transcripción.

En nuestro laboratorio se ha demostrado, que la expresión de Nurr1 presenta una distribución ubicua en la corteza cerebral, el HPC, tálamo, amígdala y mesencéfalo; mientras que la expresión de Pitx3 permanece restringida a las áreas mesencefálicas de la SNc y VTA. El estrés prenatal indujo un aumento de la expresión de Nurr1 en machos de 7, 28 y 60 días en el VTA; mientras que para Pitx3 se observó una disminución en la expresión del factor de transcripción en VTA a los 28 días y un aumento en ratas adultas (Katunar y col., 2009). En individuos control, Nurr1 presentaba un aumento entre individuos de 28 y 60 días, mientras que para Pitx3, se observó una disminución en la expresión del mismo a medida que aumentaba la edad de los individuos. Las diferencias en la expresión en los niveles para ambos factores de transcripción sostendrían la hipótesis de que Pitx3 cumpliría un rol muy importante en etapas tempranas del desarrollo postnatal del sistema dopaminérgico mesodienciefálico, mientras que Nurr1 cumpliría un rol crucial en la adultez probablemente en el mantenimiento del metabolismo dopaminérgico mediante la regulación de la expresión de enzimas esenciales (Katunar y col., 2010). Al mismo tiempo, la diferencia de expresión de Pitx3 según se evalue antes o luego de la pubertad en las crías estresadas podría deberse a la acción de las hormonas gonadales que podrían ejercer modificaciones sobre el sistema dopaminérgico durante la pubertad. Muchos efectos bioquímicos inducidos por el estrés prenatal, y también comportamentales, varían según si son observados antes o después de la adolescencia (Henry y col., 1995; Diaz y col., 1997).

I.3.3- c) Estrés prenatal, DA y morfología neural.

En nuestro laboratorio se evaluaron también las consecuencias del estrés prenatal sobre los cambios morfológicos en los astrocitos, las arborizaciones dendríticas y contactos sinápticos de la CPF, CPu y la región CA1 del HPC de 90 días de vida, machos adultos de empleando la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos anti-proteínas estructurales específicas. Los resultados mostraron un aumento significativo en el área ocupada por los astrocitos (hipertrofia glial), con un aumento de la inmunotinción para S-100B (factor neurotrófico derivado de la astroglía) en las tres áreas mencionadas. También se analizó la densidad de contactos sinápticos cuantificando el número de neuronas con marca positiva para sinaptofisina (proteína integral de membrana presente en vesículas sinápticas) y se observó una reducción significativa en la expresión de la proteína en las tres áreas evaluadas. Por último se estudiaron las arborizaciones dendríticas mediante la cuantificación de neuronas con marca positiva para MAP2 (proteína asociada a microtúbulo que se encuentra casi exclusivamente en las dendritas), hallándose una reducción en la inmunoexpresión de la misma en CPF, CPu e HPC (Barros y col., 2006). Resultados preliminares del laboratorio mostraron una reducción en el número de células con marca inmunopositiva para MAP2 en ratas prenatalmente estresadas de 28 y 60 días. De esta manera pudo demostrarse que el estrés prenatal inducía alteraciones morfológicas en áreas del sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico que persistían aún hasta la vida adulta del individuo.

En resúmen de esta sección, varias evidencias experimentales han mostrado que el estrés prenatal afecta el desarrollo del sistema dopaminérgico en múltiples niveles que implican cambios en la morfología, fisiología y bioquímica del sistema. No obstante pudo observarse que muchos de estos efectos inducidos por el estrés prenatal variaban conforme a la edad del individuo en la cuál dichos efectos se estaban evaluando, poniendo en evidencia que las hormonas gonadales, podrían estar jugando un rol muy importante en este aspecto.

I.4- EL EJE HIPOTALAMICO-HIPOFISARIO-TESTICULAR

I.4.1- Anatomía y función del tracto reproductor masculino.

El sistema reproductor masculino de los mamíferos está formado por las gónadas, dos testículos, y su sistema de conductos (los *conductillos eferentes*, el *conducto del epidídimo*, el *conducto deferente* y el *conducto eyaculador*), junto con algunas glándulas accesorias: las *vesículas seminales*, la *próstata*, las *glándulas bulbouretrales* (en humanos), y las *glándulas uretrales* y *coagulantes* (en roedores) (**figura I.5**) (Fawcett, 1989).

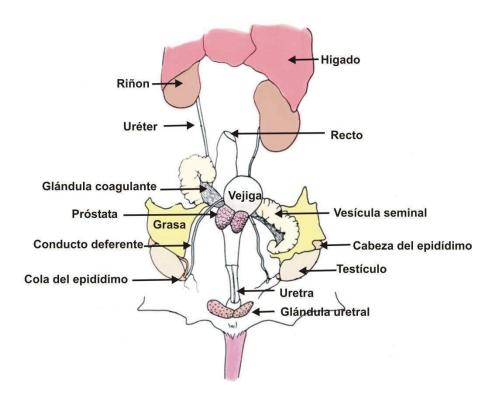


Figura I.5- Anatomía del tracto reproductor masculino en la rata. Figura adaptada de *www.bioterios.com*.

En los mamíferos, los testículos se ubican por fuera de la cavidad del abdomen, en un saco de piel denominado "escroto". Son dos glándulas tubulares compuestas, rodeadas de una gruesa cápsula fibrosa denominada "túnica albugínea". Los testículos están constituidos por dos unidades funcionales (**figura I.6**) (Fawcett, 1989):

• Los <u>túbulos seminíferos</u> constituyen la porción exócrina del testículo cuyo producto de secreción holócrina son los espermatozoides. El epitelio de estos túbulos, también llamado "epitelio germinal", está compuesto por las células germinales y por las células de Sertoli. Las células germinales pueden

distinguirse en diferentes tipos morfológicos: espermatogonias, espermatocitos en estadios meióticos, espermátides (en diferentes estadios de maduración) y espermatozoides. Estos tipos celulares pertenecen a un mismo tipo ontogénico y representan las fases sucesivas de un proceso continuo de diferenciación de las células germinales masculinas. Dependiendo de la edad del individuo se encontrarán presentes algunas de ellas o todas. Las células de Sertoli proporcionan apoyo mecánico y protección a las células germinales en su desarrollo. También cumplen una función de nutrición y constituyen la barrera hemato-testicular. Por último, cumplen un rol funcionalmente activo en la espermatogénesis y en la producción de ciertas hormonas como la inhibina. Finalmente, una última capa de células aplanadas y poligonales, rodea a los túbulos seminíferos formando una organización epitelioide. Estas células se llaman "células mioides" o "células contráctiles peritubulares" y se cree que son las responsables de las contracciones que se observan en los túbulos (Fawcett, 1989).

• El <u>sistema intersticial</u> consiste en un tejido conectivo laxo, provisto de numerosos vasos sanguíneos que ocupa todos los intersticios existentes entre los túbulos seminíferos. Entre los tipos celulares presentes en este tejido, además de fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células mesenquimáticas se encuentra un grupo de células epitelioides que reciben el nombre de "células de Leydig". Éstas constituyen el tejido endócrino del testículo, ya que producen principalmente a la hormona testosterona (Fawcett, 1989). Además de testosterona, el testículo produce un gran número de otros esteroides (**figura 1.8**) (Coffey, 1988).

De esta manera las funciones de las gónadas en los adultos se resumen en dos: por un lado la producción de hormonas esteroideas y por otro lado la gametogénesis. Por su parte, las hormonas reproductivas cumplen a su vez un rol muy importante en la diferenciación sexual, el desarrollo fetal, el crecimiento y la maduración sexual. Las hormonas que controlan el desarrollo y mantenimiento del fenotipo masculino son los andrógenos y los estrógenos. Estos son regulados por la liberación de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH, por sus siglas en inglés: *gonadotrophin releasing hormone*) desde el hipotálamo y mediante la acción de las hormonas

luteinizante y folículo estimulante (LH y FSH, por sus siglas en inglés *luteinizing hormone* y *follicle stimulating hormone*, respectivamente) hipofisarias (Nussey y Whitehead, 2001).

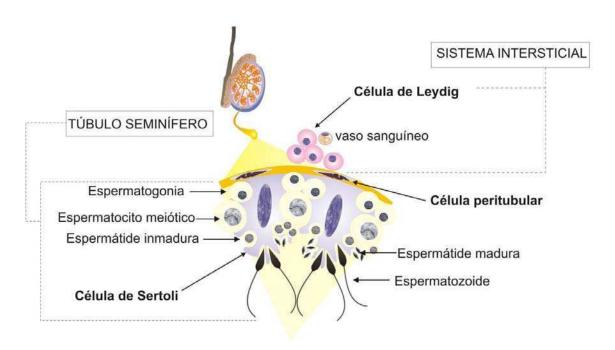


Figura I.6- Esquema del epitelio germinal del túbulo seminífero testicular y del sistema intersticial con los tipos celulares más importantes. Dibujo adaptado del libro *Endocrinology, an integrated approach (Nussey y Whitehead, 2001)*.

I.4.2- Regulación del eje hipotalámico-hipofisario-testicular (HHT).

La pubertad marca la transición desde un estado no reproductivo a reproductivo. Su nombre deriva de la palabra en latín *pube* que significa pelo. Es un tiempo en el cual ocurren cambios morfológicos y fisiológicos que posibilitan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios propios de cada sexo, pero también cambios comportamentales que permiten madurar las estructuras cerebrales hacia su forma adulta (Spear, 2000; Nussey y Whitehead, 2001).

El inicio de la pubertad ocurre en el cerebro con el aumento de la secreción del decapéptido GnRH, sintetizado por un grupo de neuronas especializadas del hipotálamo, hacia la vasculatura portal de la eminencia media en la hipófisis que permite la secreción de LH y FSH que a su vez estimularán la actividad testicular (McCarthy, 2011). Desde el punto de vista neurobiológico, el inicio de

la pubertad está directamente relacionado con cambios en el sistema neural responsables del control de la liberación de GnRH. Si bien el componente hereditario juega un papel importante en el inicio de la pubertad, existen una serie de factores internos y externos que también influyen sobre dicho episodio. Se ha descripto que factores tales como crecimiento, estado de estrés, disponibilidad de alimento, fotoperíodos y ritmos circadianos modularían el perfil secretorio de GnRH.

I.4.2- a) GnRH y el control de gonadotrofinas.

En los roedores machos, la secreción pulsátil del decapéptido GnRH es controlada por un centro tónico "generador de pulsos" por parte de un número de neuronas situadas de forma difusa en el núcleo arcuato y en el interior del hipotálamo medio basal (Nussey y Whitehead, 2001). Dicha liberación episódica de GnRH es regulada a nivel central en cuanto a su amplitud y frecuencia, y es esencial para el mantenimiento de los perfiles séricos de gonadotrofinas requeridos para lograr una gametogénesis y esteroidogénesis normal (Counis y col., 2005). La secreción de GnRH se produce como resultado de la integración de múltiples informaciones que alcanzan al SNC. provenientes del eje reproductor, del medio interno y del medio externo (Fink, 1988, 2000). A su vez, la secreción de GnRH está también regulada por una compleja red de sistemas de neurotransmisores provenientes de neuronas presentes en diferentes regiones del cerebro (sistemas límbico y olfatorio, corteza visual, etc.), cuyas terminales finalizan en el hipotálamo. Una familia de péptidos llamados kisspeptinas que se expresan en cerebro estimula la liberación de GnRH. Se ha demostrado que la mutación de dichos péptidos bloquea la maduración puberal tanto en humanos como en animales de experimentación (Dungan y col., 2006). Las neuronas liberadoras de GnRH también presentan receptores para GnRH, permitiendo de esta manera un mecanismo de retroalimentación ultracorto. La acción de GnRH sobre los gonadotropos hipofisarios se realiza mediante su unión a un receptor unido a proteína G cuya activación induce cascadas de señalización intracelulares que llevan a un aumento en los niveles de Ca2+ intracelular y la activación de la proteína quinasa C (Nussey y Whitehead, 2001).

Por último, la respuesta de LH y FSH frente a un pulso determinado de GnRH estará además gobernada por dos factores adicionales: por un lado la retroalimentación producida por los esteroides testiculares y por otro lado, la disponibilidad de receptores para GnRH en la superficie celular de los gonadotropos (Nussey y Whitehead, 2001). **figura I.7**

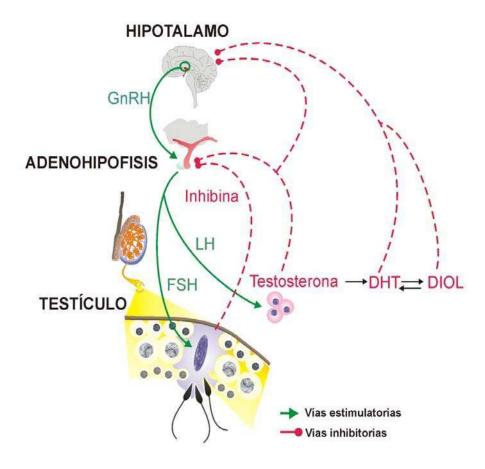


Figura I.7 Diagrama esquemático del eje hipotalámico-hipofisario-testicular. GnRH= hormona liberadora de gonadotrofinas; LH= hormona luteinizante; FSH= hormona folículo estimulante; DHT= dihidrotestosterona; Diol= 5α -androstane- 3α , 17β -diol.

1.4.2-b) LH y FSH.

Las gonadotrofinas son hormonas glicoprotéicas cuyos receptores se encuentran distribuidos principalmente en el tejido gonadal (Nussey y Whitehead, 2001). En el testículo las gonadotrofinas dirigen la producción de esteroides sexuales y la gametogénesis (figura I.7): los esteroides sexuales se sintetizan como respuesta al estímulo de la LH actuando sobre las células intersticiales de Leydig. La testosterona, y algunos de sus metabolitos como el estradiol y la dihidrotestosterona (DHT) actúan sobre la hipófisis y el hipotálamo

induciendo un mecanismo de retroalimentación negativa en el testículo sobre su síntesis (figura I.7), manteniendo un estado controlado de producción de gametas y hormonas (McCarthy, 2011). La FSH actúa de forma exclusiva sobre las células de Sertoli para estimular la síntesis y liberación de proteínas (tales como la inhibina y el péptido transportador de andrógenos), la movilización de depósitos de energía y la producción del fluído testicular. La acción en conjunto de la FSH y la testosterona sobre la célula de Sertoli potencian la maduración y culminación del proceso de espermatogénesis. A su vez, la FSH estimula la producción de receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés: *androgen receptor*) aumentando la respuesta de la célula de Sertoli a éstos (Nussey y Whitehead, 2001). La expresión del receptor para LH es inducida por la propia LH, por FSH, por la gonadotrofina coriónica humana y por la prolactina (Calandra y col., 1982). La síntesis del receptor de FSH es estimulada a su vez por la presencia de andrógenos (Nussey y Whitehead, 2001).

Por último, la inhibina secretada por las células de Sertoli se une a sus células blanco-específicas en la hipófisis anterior regulando de forma negativa la secreción de FSH.

I.4.2- c) Esteroides testiculares

La esteroidogénesis en las células de Leydig comienza luego del estímulo de LH. La acción de la gonadotrofina es la de incrementar el colesterol libre disponible, facilitar su transporte hacia la mitocondria y luego la translocación de éste hacia la membrana mitocondrial interna, a través de la acción de la proteína StAR (por sus siglas en inglés: *Steroidogenic Acute Regulatory protein*). Luego, el colesterol es convertido en pregnenolona a partir del cual mediante diferentes pasos enzimáticos se van conformando los diferentes metabolitos (**figura I.8**) (Nussey y Whitehead, 2001).

Las principales hormonas esteroideas testiculares que participan en la función reproductiva son la testosterona, el DHT y el estradiol (Moguilevsky, 2005). La testosterona entra a circulación, pero también difunde dentro de los túbulos seminíferos donde puede unirse al AR o metabolizarse a DHT. La DHT es el andrógeno responsable de la formación de la genitalia externa durante la embriogénesis e interviene en la mayoría de los eventos andrógeno-

dependientes durante la pubertad (Nussey y Whitehead, 2001). La conversión de testosterona a DHT resulta de una reacción irreversible catalizada por la enzima 5alfa-reductasa (5αR) de la cual hay dos isoformas disponibles: 5αR1 y 5αR2. Ambas isoformas se distribuyen de manera diferencial en los tejidos y poseen propiedades bioquímicas diferentes (Pratis y col., 2003). Si bien los factores que regulan y controlan la expresión y actividad de estas enzimas no han sido totalmente dilucidadas, se postula que podrían ser los andrógenos y las gonadotrofinas, entre otros (Killian y col., 2003). Por otra parte, durante el periodo postnatal a prepuberal, se ha descripto la presencia de un tercer tipo de esteroide sexual derivado de la testosterona, el 5α-androstane-3α, 17β-diol (Diol), que es el andrógeno predominante en testículos inmaduros de varias especies incluyendo a la rata (Mahendroo y col., 2004). El Diol resulta de la reducción reversible de la DHT por acción de la enzima 3α- hydroxiesteroide deshidrogenasa (3α-HSD). Se ha demostrado que su concentración en los túbulos seminíferos aumenta a partir del día postnatal 10 en las ratas alcanzando un pico máximo al día 26, coincidiendo con la iniciación y culminación de la primera división meíotica de los espermatocitos (Chemes y col., 1976; Auchus, 2004).

Los andrógenos ejercen su efecto tras unirse al AR. La DHT es el andrógeno más potente ya que su constante de disociación al receptor es de 2.0x10⁻¹⁰ M, comparado con 4.0x10⁻¹⁰ M de la testosterona y 6.0x10⁻¹⁰ M del Diol (Ge y col., 1999). Por otra parte, los andrógenos pueden además aromatizarse a estradiol mediante la acción de la enzima aromatasa CYP19 y activar receptores de estrógenos. Estas conversiones de la testosterona en DHT o en estradiol no ocurren solamente en las células esteroidogénicas, sino que también pueden ocurrir en las células del órgano blanco al cual llegue la testosterona y que expresen las enzimas apropiadas para la conversión. Principalmente el AR se expresa en testículo (células de Sertoli, Leydig y peritubulares), hipófisis, hipotálamo, hueso, piel, tejido cardiovascular, cerebro, etc (Verhoeven y col., 2010).

La acción de los estrógenos es mediada por dos tipos de receptores nucleares, denominados receptor de estrógenos α (ER α , de sus siglas en inglés *estrogen receptor alpha*) y β (ER β , de sus siglas en inglés: *estrogen*

receptor beta). Ambos receptores son sintetizados a partir de genes distintos y se han hallado presentes en una gran variedad de tejidos. En algunos órganos, se ha observado que ambos subtipos se expresan en niveles similares, mientras que en otros órganos se observó que uno de los subtipos era el predominante. Además, dentro de un mismo tejido ambos receptores pueden estar presentes, pero en distintos tipos celulares (Carreau y col., 2003).

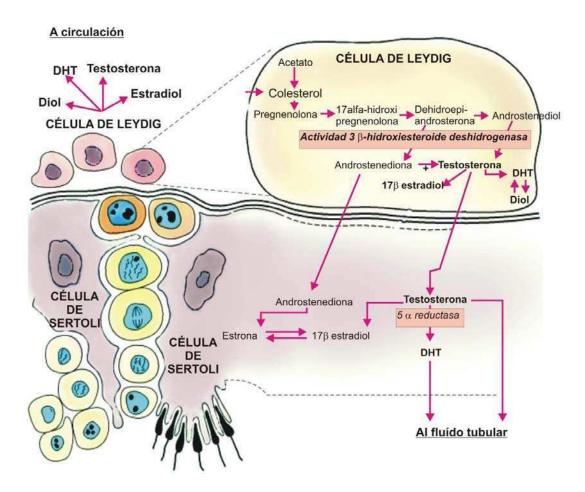


Figura I.8. Esquema general de la síntesis de esteroides sexuales en el testículo adaptado de Nussey y Whitehead 2001. DHT= dihidrotestosterona; Diol= 5α -androstane- 3α , 17β -diol. Dibujo adaptado del libro Endocrinology, an integrated approach (Nussey y Whitehead, 2001).

Las hormonas esteroideas no se almacenan sino que se sintetizan frente a la demanda del organismo, y tienen una vida media larga, en particular si permanecen unidos a sus globulinas transportadoras. Los receptores de esteroides pertenecen a una familia de receptores nucleares que al unirse a la hormona sufren un cambio conformacional alostérico, y se transforman en factores de transcripción capaces de activar o inhibir la transcripción génica.

Contienen un dominio de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) ubicado en la región promotora de genes específicos, un dominio de unión a la hormona y los dominios de activación. Para funcionar de manera eficiente y directa, los receptores deben primero dimerizar; luego interactuar con secuencias específicas del ADN; y finalmente acoplarse con otros factores de transcripción para formar un complejo multimérico estable que estimula a la ARN polimerasa para que inicie la transcripción (O'Malley y Strott, 2001; McCarthy, 2011). Además de los mecanismos que involucran la transcripción génica, denominados "mecanismos genómicos", se han descripto "mecanismos no genómicos" rápidos, a nivel de la membrana plasmática, capaces de activar distintas cascadas de señalización (Wendler y col., 2010; McCarthy, 2011).

I.4.3- Ontogenia del desarrollo sexual.

El desarrollo sexual en los mamíferos es el producto final de una serie de fases: por un lado la *determinación del sexo*, luego la *diferenciación del sexo* y por último la *masculinización* (o *demasculinización*) *del cerebro*.

Al momento de la fertilización, la dotación de un par cromosómico XY ó XX determinará al sexo cromosómico como macho o hembra, respectivamente. Luego, se desencadenarán una serie de señales genéticas, hormonales y celulares que ocurren como consecuencia de la presencia (o ausencia) del cromosoma Y, determinando el sexo fenotípico: el gen Sry (presente únicamente en el cromosoma Y), codifica para la transcripción de una pequeña proteína denominada tdf (del inglés: testis-determining factor) que inicia una cascada de expresión génica que dirige el desarrollo de un rudimento gonadal (hasta ese momento con la bipotencialidad de transformarse en ovario o en testículo) a transformarse en testículo completando la etapa de determinación sexual. Inmediatamente, una de las primeras tareas que posee el testículo primitivo es la de la regulación de la esteroideogénesis estimulando la síntesis de andrógenos por parte de las células de Leydig primitivas. La testosterona promueve el desarrollo del conducto de Wolff y de las estructuras masculinas que se forman a partir de él (vasos deferentes, vesícula seminal y el epidídimo), mientras que la metabolización de la testosterona a DHT será la responsable de la formación del pene, la uretra, la próstata y el escroto. Una tercera hormona liberada por las células de Sertoli primitivas, la hormona antiMülleriana, complementa la acción de los andrógenos al promover la regresión del conducto de Müller, precursor de los órganos sexuales femeninos (Nussey y Whitehead, 2001; Scott y col., 2009; McCarthy, 2011). La ausencia de cualquiera de los factores recién mencionados o el funcionamiento defectuoso de alguno de ellos interrumpirá la formación del testículo y como consecuencia, se desarrollará un fenotipo femenino (que es el fenotipo que se desarrolla por defecto). La diferenciación sexual sólo puede ocurrir cuando el testículo fetal comienza a secretar hormonas claves durante una ventana temporal crítica de la gestación temprana (figura I.9) (Scott y col., 2009).

No obstante, para que la diferenciación sexual sea completa, además de la diferenciación en el sexo fenotípico externo, es necesario que el cerebro de dicho individuo también sea masculino o femenino. Dicho de otra manera, es necesaria la existencia de diferencias estructurales y funcionales permanentes en áreas cerebrales límbicas e hipotalámicas que le permitan al cerebro una identidad sexual frente a una variedad de funciones neuroendócrinas, comportamentales y cognitivas como por ejemplo: la liberación gonadotrofinas y la adquisición de un comportamiento sexual determinado. Estos mecanismos de masculinización (o feminización) ocurren durante un período crítico de la vida prenatal/postnatal temprana (figura I.9), que en roedores abarca desde estadios perinatales hasta la primera semana de vida y en el humano, el tercer trimestre de embarazo ("efectos organizacionales de las hormonas"). De forma análoga a lo que ocurre con las gónadas, el cerebro también es bipotencial al desarrollo de un fenotipo masculino o femenino y este fenotipo final será el resultado de un perfil hormonal generado por las gónadas, donde la acción de las mismas durante una ventana temporal específica en el período de la gestación convertirá al desarrollo de un cerebro de "fenotipo femenino" (por defecto) en uno "masculino" (McCarthy, 2011). En los machos, la activación perinatal transitoria del eje HHT provoca un aumento en los niveles de testosterona que masculiniza estructuras neuronales típicamente masculinas. En los roedores, se han registrado dos picos de la hormona: aproximadamente a los días gestacionales 17-19 (Ward y Weisz, 1984; McCarthy, 2011) y nuevamente en las primeras dos horas luego del nacimiento (Corbier y col., 1978). En las hembras, los niveles circulantes de testosterona

perinatales son consistentemente menores en comparación a los hallados en los machos (McCarthy, 2011). Del mismo modo, en los machos los niveles plasmáticos de estradiol son bajos. Sin embargo en ciertas áreas cerebrales de los machos (tales como el área preóptica hipotalámica, hipotálamo medio basal, la amígdala, la corteza y el HPC) la actividad de la enzima aromatasa responsable de la conversión de testosterona a estradiol, es muy elevada. Se ha demostrado entonces que los picos neonatales de testosterona se convierten en picos de estradiol. Una vez que dicha conversión tuvo lugar, el estradiol influye sobre la transcripción de genes mediante la unión a sus receptores intracelulares específicos. De esta manera, se inducen cambios en el cerebro que lo masculinizan: por ejemplo la secreción de GnRH y los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HHT en los machos (Foster y col., 2006). En las hembras en cambio, frente a la ausencia de testosterona testicular circulante, la acción masculinizante de los estrógenos maternos ó placentarios sobre el cerebro se ve impedida gracias a la presencia de la glicoproteína plasmática, α-fetoproteína que secuestra al estradiol circulante. De esta manera, la ausencia de estrógenos durante dicha ventana temporal específica del desarrollo neonatal feminiza al cerebro (McCarthy, 2011).

Luego en la pubertad, las hormonas vuelven a actuar activando o inhibiendo procesos cerebrales que tienen que ver con la maduración final del cerebro hacia la vida adulta (conocida como "efectos activacionales de las hormonas"), facilitando la expresión de comportamientos sexuales típicos bajo determinados contextos sociales (Auchus, 2004). Muchos de los procesos que ocurren durante la vida perinatal se reiteran durante este período. Así es que se llevan a cabo procesos como neurogénesis, muerte celular programada, desarrollo y poda de arborizaciones dendríticas y sinapsis, mielinización y diferenciación sexual (Sato y col., 2008). Las perturbaciones que puedan ocurrir durante la pubertad influyen sobre el cerebro adolescente y funcionarán como un agente predictivo de consecuencias a largo plazo en el adulto (Bialek y col., 2004).

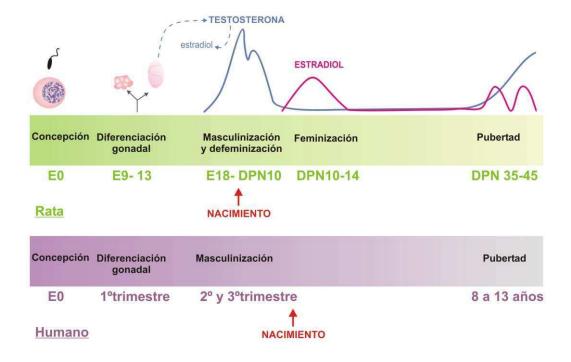


Figura I.9. Línea de tiempo de la diferenciación sexual en ratas y humanos. E= día embrionario; DPN= día postnatal. La diferenciación de las gonadas en ovario o testículo ocurre temprano en el desarrollo tanto en roedores como en primates. Luego, la formación de testículos permite el entorno hormonal apropiado para la masculinización del cerebro. En roedores este proceso ocurre y se completa perinatalmente, mientras que en humanos ocurre durante la gestación. En roedores la feminización ocurre postnatalmente mediante la acción de los estrógenos ováricos del individuo, mientras que en humanos aun se desconoce la ocurrencia de dicho proceso. La emergencia de hormonas esteroideas señala el inicio de la pubertad. En machos la producción de hormonas es tónico, mientras que en hembras el proceso es cíclico. En ambos sexos la activación de las hormonas activará los sustratos neurales previamente organizados por éstas durante estadios gestacionales. Esquema adaptada del libro de (McCarthy, 2011).

1.4.4- Consecuencias del estrés sobre el eje HHT.

La activación crónica del eje HHA en individuos adultos, como respuesta a la exposición sostenida en el tiempo a un estrés físico y/o psicológico suprime la señalización endócrina del eje reproductor masculino a nivel del hipotálamo, la hipófisis y el testículo (Hardy y col., 2005). Estos cambios van acompañados además de una disminución en la libido y en la tasa de fertilidad (Sapolsky, 1999). Efectos similares fueron hallados en ratas expuestas a un estrés por inmovilización (Hardy y col., 2005).

El aumento en las concentraciones de opioides (encefalinas y endorfinas) en la circulación durante el estrés, bloquea la liberación de GnRH a nivel hipotalámico (Sapolsky, 1999). Por otra parte, la CRH ejerce efectos inhibitorios sobre la liberación de LH y el comportamiento reproductivo. En efecto se ha observado que la administración de antagonistas a CRH revierte parcialmente los efectos supresivos del estrés sobre la liberación de LH (Rivier y col., 1986).

En relación a los efectos ejercidos por los glucocorticoides se ha observado que estos alteran la fisiología reproductiva mediante varios mecanismos: a nivel del SNC disminuyen la liberación de GnRH, y a nivel gonadal reducen la respuesta a LH modulando la concentración de receptores para LH disponibles (Sapolsky, 1999). Por otra parte, los glucocorticoides actúan sobre las células de Leydig ejerciendo efectos inhibitorios sobre la producción de testosterona ya sea mediante la inducción de apoptosis en éstas células (Gao y col., 2002), o mediante la transcripción de genes inhibitorios de las enzimas que intervienen en la síntesis de la hormona (Hardy y col., 2005; Hu y col., 2008). Cuando el estrés ocurre durante estadios de vida fetales o en estadios previos a la pubertad, se ha demostrado que los glucocorticoides disminuyen la tasa de mitosis de las células de Leydig controlando de esta manera el número de las mismas (Hardy y col., 2005).

Por último la activación del sistema simpático también ejerce efectos negativos sobre la reproducción al bloquear la erección (Sapolsky, 1999).

1.4.5- Consecuencias del estrés prenatal sobre el desarrollo del eje HHT.

Como se ha expuesto previamente, la diferenciación sexual se trata de un fenómeno complejo donde la participación de los andrógenos y sus metabolitos durante momentos específicos del desarrollo son fundamentales. Durante el período de la diferenciación sexual del cerebro, los picos perinatales de testosterona *masculinizan* y *defeminizan* el comportamiento sexual, los patrones de secreción de gonadotrofinas y la constitución de índices morfológicos sexuales (externos y cerebrales) característicos de cada sexo. En ausencia de dichos picos, las estructuras sexualmente dimórficas y su funcionamiento se *feminizan*. Se ha demostrado que el estrés durante estadios críticos del desarrollo cerebral fetal reduce la fertilidad y la fecundidad de ese

individuo, induciendo alteraciones en el comportamiento sexual (Weinstock, 2001; Pereira y col., 2006). En ratas macho expuestas a estrés durante la gestación se ha observado una disminución en el número de cópulas y en el número de eyaculaciones, así como también comportamientos sexuales femeninos, tales como el de lordosis y un incremento en la preferencia de elección de compañeros machos en lugar de hembras receptivas (Shono y Suita, 2003; Gerardin y col., 2005; Kapoor y Matthews, 2011). Al mismo tiempo, el estrés prenatal se ha relacionado con alteraciones en la secreción tónica de gonadotrofinas y con modificaciones en los patrones de liberación fisiológicos de testosterona y LH, incluso durante la vida adulta (Shono y Suita, 2003; Gerardin y col., 2005; Rodriguez y col., 2007). En relación al dimorfismo sexual de estructuras cerebrales, el estrés prenatal ha mostrado disminuir el número de neuronas del núcleo bulbocavernoso y disminuir la actividad de c-fos en el área preoptica media de los machos, asemejando a lo que fisiológicamente se observa en las hembras. Al mismo tiempo se ha observado un aumento neonatal en la expresión del ARNm de los receptores de estrógenos y una disminución en la actividad de la enzima aromatasa en el hipotálamo de ratas estresadas prenatalmente (Viltart y Vanbesien-Mailliot, 2007). macho Parámetros de la morfología sexual externa tales como la distancia anogenital y el tiempo en el cual se produce el descenso testicular también se han visto alterados en las crías como consecuencia del estrés maternal (Shono y Suita, 2003; Barros y col., 2004; Gerardin y col., 2005; Rodriguez y col., 2007). Estas modificaciones se han relacionado a un funcionamiento defectuoso del eje HHT fetal, ya que concentraciones insuficientes de andrógenos durante dichos períodos obtenidas mediante la administración de antagonistas del receptor de andrógenos (como la flutamida) han mostrado feminizar el desarrollo del cerebro y desregular la función endócrina del eje HHT en el adulto (Huhtaniemi, 1995; Knickmeyer y Baron-Cohen, 2006). En este sentido se ha demostrado que el estrés prenatal durante la última semana de gestación, al igual que la administración prenatal de dexametasona disminuye los picos de testosterona fetales fundamentales para la expresión y mantenimiento de la diferenciación sexual (Ward y Weisz, 1984; Scott y col., 2009). Apoyando esta teoría, Pereira y colaboradores (2006) observaron que la administración neonatal de testosterona revertía los efectos inducidos por el estrés prenatal sobre la distancia anogenital, los niveles séricos de testosterona en el adulto y el comportamiento reproductor de las crías (Pereira y col., 2006).

Por último y como mencionamos en la sección anterior, la presencia de glucocorticoides interfiere con la acción esteroideogénica de las células de Leydig fetales ya que en altas concentraciones inducen el proceso de apoptosis en estas células e inhiben la actividad de las enzimas sintetizadoras de esteroides (Gao y col., 2002; Hardy y col., 2005; Scott y col., 2009). De esta manera reducen la formación de testosterona en etapas críticas del desarrollo fetal

No obstante, existe poca información sobre los efectos a largo plazo del estrés prenatal sobre el desarrollo testicular y su funcionamiento a lo largo de la vida de la progenie.

I.5- HORMONAS GONADALES Y DESARROLLO CEREBRAL-INTERACCIÓN CON EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

Como hemos descripto, el desarrollo del sistema nervioso comprende varios procesos que van desde el nacimiento de las células progenitoras que luego migran, se diferencian y se desarrollan en su destino final del SNC, hasta la elaboración, elongación y arborización de axones y dendritas, que formarán una red de importantes conexiones sinápticas. A su vez, estas conexiones le permitirán al cerebro recibir, decodificar y transmitir la información que reciben del entorno, adecuando su estructura a las necesidades que percibe del mismo.

En los mamíferos existen dos períodos dinámicos de desarrollo neural donde los circuitos comportamentales son remodelados y redefinidos, y donde el número de sinapsis y receptores del SNC sufren una eliminación de aproximadamente el 50%. Estos períodos son: la etapa perinatal y la etapa adolescente. En humanos la etapa perinatal abarca las últimas semanas de gestación, mientras que en roedores comprende el período que va desde la última semana de gestación hasta la primera semana de vida postnatal. Debido a la magnitud y a la velocidad en la cual estos cambios estructurales suceden, ambas ventanas temporales son periodos de alta sensibilidad y vulnerabilidad a perturbaciones e insultos que pudieran interferir con la remodelación del cerebro induciendo consecuencias a largo plazo (Spear, 2000; Andersen, 2003; Paus y col., 2008; Sato y col., 2008). En ese sentido, existen evidencias que indican que la vulnerabilidad de los seres humanos a contraer varias psicopatologías asociadas a disfunciones del sistema dopaminérgico tales como la esquizofrenia, adicciones a sustancias de abuso y depresión estaría asociada a los cambios hormonales que ocrren durante la adolescencia.

1.5.1- Adolescencia y predisposición a psicopatías.

La adolescencia y la pubertad son dos términos muchas veces utilizados como sinónimos pero que sin embargo refieren a eventos diferentes. Si bien sus ventanas temporales se superponen, la *adolescencia* se define como el tiempo gradual de transición entre la niñez y la vida adulta, mientras que la *pubertad* sólo abarca el período en el cual un individuo pasa de un estado no reproductivo hacia uno reproductivo. Así la adolescencia abarca un período de

tiempo mayor que la pubertad y sus límites (inicio y fin) son difíciles de determinar con exactitud (Spear, 2000). Una característica peculiar y común entre adolescentes de varias especies de mamíferos es la gran cantidad de cambios comportamentales que ocurren durante esta etapa en la cual el cerebro parecería despertar al placer y al riesgo. Se ha registrado un aumento en la conducta social, alteraciones en la emocionalidad, aumento en el apetito, disminución en la cantidad de horas de sueño, impulsividad y necesidad de experimentación con nuevas sustancias o situaciones, entre otros comportamientos. Estos tipos de comportamientos le permitirían al individuo adquirir una mayor cantidad de información y experiencia del entorno que lo rodea, necesarias para su percepción del mundo adulto y por ende, para completar la maduración cerebral (Spear, 2000; Andersen, 2003; Paus y col., 2008; Sato y col., 2008).

Debido a la gran incidencia en el desarrollo de desórdenes psiguiátricos durante esta etapa de transiciones, la adolescencia se ha propuesto como un período de particular vulnerabilidad al desarrollo de psicopatías. Por ejemplo algunos desórdenes que comienzan en la niñez como el ADHD y el síndrome de la Tourette empeoran en su sintomatología durante la adolescencia, pero disminuyen notablemente cuando los individuos alcanzan la vida adulta. Por otra parte, dicha incidencia presenta además una gran diferencia entre géneros. La esquizofrenia, ansiedad, psicosis y ADHD típicamente emergen durante la adolescencia con una incidencia mayor en los hombres que en las mujeres (Spear, 2000; Andersen, 2003; Paus y col., 2008). Los cambios que ocurren en la maduración del cerebro, en particular del sistema dopaminérgico mesócortico-límbico podrían estar relacionados con la aparición y curso de estos desórdenes. En ratas, se ha demostrado que la densidad de los D1R y D2R en la CPF de machos adultos, muestra un perfil muy particular con un aumento progresivo a partir del nacimiento alcanzando un máximo alrededor del día 40 postnatal seguido de una eliminación o "poda" (58-75%) para alcanzar, los niveles de receptores de la rata adulta (Teicher y col., 1995). En humanos se ha observado un fenómeno similar (Huttunen y Niskanen, 1978; Seeman y col., 1987). El aumento y descenso de los receptores dopaminérgicos en el cerebro durante la adolescencia ocurre en paralelo al crecimiento y declinación de los síntomas del ADHD y el síndrome de la

Tourette. A su vez la disminución de los receptores y sinapsis dopaminérgicas podrían ser un factor permisivo para la aparición de la esquizofrenia (Andersen y col., 2002).

La prevalencia de psicopatías en machos cuya incidencia coincide con la etapa de la adolescencia y por ende con los picos de testosterona que ocurren durante esta etapa, han orientado la atención hacia el rol de los andrógenos en el desarrollo de dichos desórdenes psiquiátricos. Así como en la periferia las hormonas sexuales actúan sobre órganos específicos induciendo la aparición de caracteres sexuales secundarios necesarios para alcanzar la madurez sexual (Nussey y Whitehead, 2001; Sato y col., 2008), a nivel central las hormonas gonadales también orquestan una serie de modificaciones morfológicas y neuroquímicas, que le permitirán al cerebro alcanzar su formato adulto (Spear, 2000; Andersen, 2003; MacLusky y col., 2006; Paus y col., 2008; Sato y col., 2008). En ese sentido se sabe que las hormonas sexuales participan en la regulación de sistemas neuroendócrinos, comportamientos, y estimulan la diferenciación y plasticidad de diversas poblaciones neurales. A nivel de neurotransmisores, intervienen en su síntesis y liberación, así como también, a nivel del desarrollo y remodelado de los circuitos sinápticos (Alonso-Solis y col., 1996; Kuppers y col., 2000). En especial, se ha observado que influyen sobre el funcionamiento cognitivo, motor y motivacional en la transmisión dopaminérgica probablemente induciendo modificaciones a nivel transcripcional y en la maduración neuronal (Purves-Tyson y col., 2012).

1.5.2- Rol de los andrógenos en el cerebro.

Fisiologicamente la testosterona es principalmente secretada por los testículos y también por la glándula adrenal hacia el torrente sanguíneo, donde se une a globulinas transportadoras de la hormona y a albúmina que regulan su biodisponibilidad. De esta manera, del total de testosterona secretada por el organismo solo una pequeña proporción de la testosterona circulante se encuentra libre y por ende disponible (del 0.5 al 2%) para ejercer sus efectos sobre los tejidos blanco (Bialek y col., 2004). Por su naturaleza esteroidea la testosterona es capaz de atravesar facilmente la barrera hematoencefálica y alcanzar al cerebro, ejerciendo sus diversos efectos. No obstante también puede ser metabolizada a DHT, estradiol y Diol gracias a la presencia de las

enzimas esteroideogénicas cerebrales como la aromatasa, ambas isoformas de la $5\alpha R$ y la 3α -HSD que catalizarán la conversión local de la hormona a sus metabolitos más potentes. A su vez, los niveles de testosterona y sus metabolitos regularán la expresión de estas enzimas que variarán en su distribución y cantidad en el SNC de acuerdo al estadio del desarrollo del individuo y del sexo (Tsuruo, 2005). En los últimos años también se ha demostrado que existe síntesis *de novo* de andrógenos en el cerebro a partir del colesterol (Celotti y col., 1997; Tsuruo, 2005).

Los efectos de la testosterona y sus metabolitos se producirán mediante su unión a receptores específicos nucleares que desencadenarán efectos genómicos sobre las diferentes neuronas. Tanto la testosterona como la DHT se unirán al AR, mientras que los estrógenos provenientes de la aromatización de la testosterona se unirán a los ERs (conjuntamente ambos receptores de estrógenos: α y β). La distribución de dichos receptores se ha descripto en varias áreas cerebrales mediante el uso de métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos, registrándose diferencias sexo-específicas. En machos se ha encontrado un mayor contenido protéico de AR que en hembras y su distribución abarca diferentes áreas cerebrales que incluyen núcleos del hipotálamo ventro y dorso-medial, el área preóptica y el núcleo arcuato. También se ha hallado en regiones límbicas como la amígdala, la corteza, el HPC (especialmente la región CA1) y el NAc (Xiao y Jordan, 2002; Bialek y col., 2004; Sato y col., 2008; Phillips-Farfan y Fernandez-Guasti, 2009). En el mesencéfalo, se ha reportado su presencia en pequeños grupos de neuronas de la SN y la VTA (Kritzer, 1997). La distribución en el cerebro de ambos ERs se superpondría localizándose ambas isoformas de forma mayoritaria en diversos núcleos hipotalámicos, la amígdala y en menor medida en CPF e HPC (McEwen y Alves, 1999). Si bien estos receptores se han hallado principalmente en neuronas, la presencia del AR también ha sido demostrada en oligodendrocitos, mientras que los ERs se han hallado también en astrocitos y células ependimales (Spary y col., 2009).

Muchas investigaciones han estado enfocadas en el estudio de los estrógenos como agentes neuroprotectores, neurotróficos y antioxidantes. Se ha mostrado que los estrógenos promueven el crecimiento de áreas cerebrales como el hipotálamo, HPC, mesencéfalo y corteza. Al mismo tiempo modulan

procesos de apoptosis y promueven formaciones sinápticas (McEwen y Alves, 1999). En relación a las investigaciones enfocadas al estudio de enfermedades neurodegenerativas, se ha observado que los estrógenos reducen los efectos neurotóxicos inducidos por la toxina 6-hidroxidopamina (utilizada en modelos de estudio de la enfermedad de Parkinson) sobre las vías dopaminérgicas nigroestriatales (Kuppers y col., 2000) y que la administración de testosterona ó DHT no generaban el mismo efecto (Dluzen, 2000). En particular, se ha observado que los estrógenos modulan la liberación y la recaptación de la DA en el NAc (Creutz y Kritzer, 2002).

Sin embargo algunas evidencias han apoyado la teoría de que la testosterona también podría resultar un agente con propiedades neuroprotectoras, ya que se ha demostrado que el mantenimiento de niveles fisiológicos de andrógenos es importante para disminuir la incidencia de depresión y de desordenes neurodegenerativos como el Alzheimer y el Parkinson (Bialek y col., 2004; MacLusky y col., 2006). Por otro lado se ha observado que la testosterona ejerce efectos neurotróficos, al promover e incrementar la diferenciación neural en cultivos (Beyer y Hutchison, 1997). También se ha observado que previenen la muerte celular frente a insultos neurotóxicos y promueven capacidades regenerativas en neuronas adultas que habían sufrido un daño (DonCarlos y col., 2003).

Los efectos moduladores de los andrógenos sobre la enzima limitante de la síntesis de DA, la TH, también ha sido evaluada. Asimismo se ha observado que el tratamiento in vivo con testosterona aumentaba la expresión de TH (Weltzien y col., 2005). Coincidiendo con estos resultados Jeong y colaboradores, demostraron que el receptor de andrógenos es capaz de regular positivamente la transcripción del gen que codifica para la enzima sugiriendo de esta manera una interrelación positiva entre la DA y la hormona sexual (Jeong y col., 2006). Con respecto a los receptores dopaminérgicos, Andersen y colaboradores (2002) estudiaron la distribución de receptores de DA durante la pubertad y estadios tempranos de adultez, y observaron que ésta no parecería modificarse por la sustracción de las gónadas (Andersen y col., 2002). En base a sus resultados, los autores sugerían que los cambios ocurridos en el sistema dopaminérgico a lo largo de la vida, ya estarían pautados por la exposición hormonal en estadios muy tempranos en el

desarrollo siendo susceptibles a cambios en el entorno durante ese período de la vida.

Los antecedentes hasta aquí presentados estarían indicando que las hormonas gonadales cumplirían un papel fundamental sobre el desarrollo cerebral ejerciendo efectos organizacionales y activacionales sobre su anatomía y fisiología. Variaciones en los niveles hormonales durante ciertas etapas críticas del desarrollo fetal podrían inducir alteraciones en la formación del cerebro aumentando, en el individuo, la vulnerabilidad a desarrollar psicopatías a lo largo de su vida. En ese sentido, uno de los aspectos más llamativos en el desarrollo de los desórdenes psiguiátricos es su especificidad de género y que la incidencia, de algunos de ellos, coincide con períodos de cambios hormonales profundos como lo es la adolescencia. A su vez, muchos de estos desórdenes psiquíatricos están relacionados con disfunciones del sistema dopaminérgico del cerebro anterior, en áreas que también son sensibles a la acción de las hormonas gonadales. El hecho de que el estrés prenatal altera tanto el desarrollo del eje HHT como el desarrollo del sistema dopaminérgico podría estar indicando la existencia de una interrelación causal entre los tres factores.

II- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II. 1- OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

El estrés prenatal impacta sobre el desarrollo del sistema dopaminérgico mesocortico-límbico, induciendo alteraciones a largo plazo en la descendencia que estarían vinculadas con la etiología de ciertas psicopatías cuya incidencia es mayor en hombres que en mujeres. A su vez, el sistema dopaminérgico es vulnerable a la acción de los esteroides sexuales durante estadios tempranos perinatales pero también en la adolescencia donde las hormonas orquestan, y luego maduran, las estructuras cerebrales hacia su forma adulta. Por último, el estrés prenatal ha mostrado interferir con los picos perinatales de testosterona responsables de la diferenciación sexual del comportamiento y del establecimiento del patrón de secreción de gonadotrofinas de los machos. En este sentido se ha postulado que el estrés prenatal altera la integridad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

En base a estos antecedentes, se postuló la siguiente <u>Hipótesis de trabajo</u>: Los efectos del estrés prenatal sobre el sistema dopaminérgico son consecuencia de las alteraciones en las hormonas sexuales, inducidas por el mismo estrés que, al hallarse en concentraciones inapropiadas, estructuran al sistema de forma diferencial. Por lo que el <u>objetivo general de este trabajo</u> es avanzar sobre el conocimiento del rol de las hormonas gonadales masculinas sobre las alteraciones a largo plazo que sufre la neurotransmisión dopaminérgica de la cría estresada durante la gestación.

II.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1: Evaluar los efectos del estrés prenatal sobre parámetros maternos y de las camadas, y analizar el sistema de estrés de las crías frente a la exposición a un estrés agudo.

- 1.a) Evaluar la ganancia de peso corporal materna diaria y la ganancia de peso corporal materna total durante la gestación.
- 1.b) Examinar parámetros de la camada tales como número de crías nacidas y ganancia de peso de éstas durante distintas etapas de la vida postnatal.
- 1.c) Determinar los niveles séricos basales de prolactina y corticosterona en las madres luego del destete.

1.d) Determinar los niveles séricos basales de prolactina y corticosterona en las crías prepuberales y adultas, frente a la exposición a una sesión de estrés agudo con, o sin recuperación.

Objetivo específico 2: Estudiar la influencia del estrés prenatal sobre el eje hipófiso-testicular, durante diferentes estadios de la vida postnatal.

- 2.a) Examinar parámetros del desarrollo sexual externo de la cría.
- 2.b) Determinar los valores séricos de las hormonas hipofisarias y de los andrógenos testiculares mediante RIA.
- 2.c) Evaluar el desarrollo testicular mediante la observación de parámetros de histomorfometría testicular.
- 2.d) Analizar la expresión génica y protéica del receptor de andrógenos en testículo, mediante RT-PCR, Western blot e inmunohistoguímica.
- 2.e) Analizar la expresión génica de los receptores de estrógenos y de las enzimas esteroideogénicas aromatasa y 5α-reductasa en testículo, mediante RT-PCR.

Objetivo específico 3: Estudiar los efectos del estrés prenatal sobre el sistema dopaminérgico mesocortico-límbico, empleando ratas preadolescentes y adultas.

- 3.a) Examinar la expresión protéica de los receptores de andrógenos, de estrógenos y dopaminérgicos de tipo D2 mediante Western blot en las áreas cerebrales: corteza prefrontal, hipocampo y área tegmental ventral.
- 3.b) Analizar la expresión génica de los receptores de andrógenos y estrógenos, así como también de las enzimas esteroideogénicas en las mismas áreas cerebrales enunciadas.
- 3.c) Evaluar las arborizaciones dendríticas en la corteza prefrontal y el hipocampo, mediante la cuantificación de la proteína MAP2 por inmunohistoquímica.

Objetivo específico 4: Estudiar los efectos de la exposición prenatal a flutamida sobre las arborizaciones dendríticas del sistema dopaminérgico mesocortico-límbico, empleando ratas preadolescentes y adultas.

- 4.a) Estudiar el desarrollo sexual externo y los niveles de testosterona circulantes en suero de las ratas.
- 4.b) Determinar las arborizaciones dendríticas en corteza prefrontal, hipocampo y área tegmental ventral mediante la cuantificación de la proteína MAP2 por inmunohistoquímica.
- 4.c) Evaluar el número de neuronas *tirosina hidroxilasa*+ respecto al total de neuronas NeuN+ en el área tegmental ventral.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1- ESPECIFICACIONES DE REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS.

III.1.1- Drogas y reactivos.

B-Mercaptoetanol y el reactivo ECL-plus fueron adquiridos en *Amersham*. Las siguientes drogas fueron obtenidas en Anedra: acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, fosfato ácido de disodio anhidro, fosfato monopotásico, metanol, propilenglicol, sacarosa y sulfato de magnesio. Se utilizó saponina perteneciente a Biomedicals. La columna de tamiz molecular de Bio-gel P-10 Gel, al igual que los estándares de peso molecular (Kaleidoscopio), pertenecían a la marca *Bio-Rad Laboratories*. Los siguientes productos fueron adquiridos en Ge Healthcare: acrilamida y metilenbisacrilamida, Glicina, Teemed y tris. Las membranas de polifluoruro de polivideno (PVDF) utilizadas fueron de Immobilon. Azul de bromofenol, dodecilsulfato sódico (SDS), proteinasa K y TRIZOL se obtuvieron en Invitrogen. Acetato, acetona, ácido acético glaciar, ácido clorhídrico, azida sódica, ácido orto-fosfórico, cloramina-T trihidrato, etanol absoluto, éter dietílico, glicerol, metanol, peróxido de hidrógeno (30%) y xilol fueron obtenidos de Merk. De Sigma-Aldrich Chemical Co se adquirieron: azul de Coomassie (Coomassie brillant blue G), bálsamo de montar DPX, cocktail de inhibidores de ³[H]-corticosterona (C8784), proteasa, 3,3'-diaminobencidina deoxicolato de sodio, estreptavidina peroxidasa, flutamida, formaldehído, gelatina, Hepes, Igepal (CA-630), paraformaldehído, persulfato de amonio, rojo ponceau, seroalbúmina bovina, Testosterona, tritón X-100 y tween-20. El ácido etilen diamino tetracético (EDTA) fue adquirido en Syntex. El complejo avidinabiotina- peroxidasa, suero de conejo, suero normal de cabra y caballo se adquirieron en Vector Laboratories, Inc. La heparina utilizada fue de Veinfar. Como anestésicos, se utilizaron: Ketamina (Holliday Scott- Argentina) y clorhidrato de xilacina al 2% (de Kensol Köning). Para el aislamiento de ARNm y poliA de las muestras de testículo y cerebro se utilizó "PolyATract mRNA Isolation System" (Promega, Madison, WI, USA). "SYBR Green PCR Master Mix" se obtuvo de Applied Biosystems. Para microscopía de fluorescencia se utilizó como medio de montaje "Fluoromount Aqueous Mounting Medium (S3023)" adquirido en Dako. El material de histología: azul de Coomassie, aceite de inmersión, bálsamo de Canadá, eosina y hematoxilina fueron

provistos por *Biopur*. Se utilizó parafina en escamas de punto de fusión (56-58°) *Marzan*. El ácido pícrico se obtuvo de *Sciencelab*. (1,2,6,7-³H)-Testosterona (actividad específica 100 Ci/mmol) y ¹²³INa (actividad específica 96.6 Ci/g) fueron adquiridos a New England Nuclear Co. LH, FSH y prolactina fueron medidas por kits cedidos por *"National Hormone and Pituitary program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases"* y el Dr. A.F. Parlow (Bethesda, Maryland, EEUU). La medición de testosterona de manera específica, se realizó mediante el uso del kit TESTO-RIA-CT adquirido en *DIA Source Immuno Assays*. Se utilizó líquido de centelleo "Optiphase Hisafe 3", adquirido en *Perkin Elmer*.

III.1.2- Anticuerpos.

Los anticuerpos contra: a) inmunoglobulina (IgG)-ratón Alexa fluor 488 (cabra, A- 11001) se obtuvo de *Invitrogen*; b) IgG-conejo acoplado a cy3 (burro, 711-165-152), IgG- ratón acoplado a peroxidasa (cabra, 1115-035-146) e IgG-conejo acoplado a peroxidasa (cabra, 111-035-003) se adquirieron en *Jackson Inmuno Research Laboratories*; c) Andrógenos (T-7α-butirato-BSA) y Diol (Diol-15-CMO-BSA) fueron provistos por *Medicorp Inc. e Immunotech Diagnostics*. c) NeuN (ratón, A60MAB377) y D2R (conejo, AB5084P) fueron adquiridos en *Chemicon International INC* (Millipore); d) TH fue adquirido en *Pel-Freez biological* (rata, P40101-0); e) actina (ratón, 60008-1-Ig) se obtuvo de *Protein Tech Group Inc*; f) AR (conejo, N-20 sc-816) y ERα (conejo, MC-20 sc-542) se adquirieron en *Santa Cruz Biotechnology INC*; g) MAP2 (conejo, 188 002) se adquirió en *Synaptic Systems*; h) ERβ (conejo, PA1-310B) se obtuvo de *Thermo Scientific*; i) IgG- conejo acoplado a biotina (cabra, BA-1000) e IgG-ratón acoplado a biotina (cabra, BA-9200) se obtuvieron en *Vector Laboratories*.

III.1.3- Equipos.

Para la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes equipos: a) bomba peristáltica Blue solution; b) centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B plus; c) contador beta (TriCarb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer, Perkin Elmer); d) contador gamma LKB 1272; e) Crióstato Leica CM1850; f) cuba electroforética Bio-Rad; g) espectofotometro UV-Visible Beckman; h)

homogeneizaor Ultraturrax; i) Microscopio Olympus de Fluorescencia con óptica común y de Nomarski, con software ImagePro; j) equipo STORM; k) termociclador 7500 de PCR en tiempo real Applied Biosystems y l) Ultramicrótomo Reichent Jung Ultracut.

III.2- MODELOS DE MANIPULACION PRENATAL UTILIZADOS.

Se emplearon ratas hembras vírgenes y machos sexualmente experimentados pertenecientes a la cepa Wistar (HSEM: WI) que fueron mantenidas en un fotoperíodo constante de luz-oscuridad de 12:12 horas (con apagado de la luz a las 18:00 horas) y temperatura controlada (22 ± 3 °C). Tanto el agua como la comida fueron suministradas *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las normas vigentes sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio descriptos según la Guía del NIH (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

A fin de controlar la fecha exacta de inicio de preñez, las hembras y los machos fueron colocados en jaulas especiales de apareo, a razón de una hembra por macho. Durante la mañana de los días subsiguientes, se inspeccionó la presencia de tapón vaginal. Cuando éste se hacía evidente, la hembra era separada en una jaula individual considerándose a ese día, como día 1 de gestación. A continuación, se le asignaba de forma aleatoria uno de los tratamientos de manipulación prenatal que se describen a continuación. En cada grupo experimental utilizado se seleccionó de forma aleatoria un grupo reducido de hembras gestantes, las cuales fueron pesadas al inicio de la preñez, al día gestacional (DG) 12 y diariamente desde los DGs 15 al 21 con el objetivo de inspeccionar la ganancia de peso corporal diaria. Luego se comparó el peso corporal obtenido al DG 22 contra el peso corporal inicial, con objetivo de estimar la ganancia de peso corporal total neta durante la gestación.

III.2.1- Estrés prenatal por inmovilización.

Las hembras gestantes seleccionadas para este experimento fueron divididas en dos grupos experimentales:

 CONTROL (C): las hembras preñadas permanecieron en su jaula sin ser perturbadas durante toda la gestación. • ESTRÉS PRENATAL (EP): fueron expuestos a un protocolo de estrés por inmovilización desde el día 14 hasta el día 21 de gestación. Para ello, las ratas fueron transladadas a un cuarto experimental separado e iluminado donde se colocaban individualmente durante un lapso de 45 minutos, dentro de un cepo transparente de acrílico con perforaciones para que el animal pudiera respirar y cuyo diámetro era cercano al tamaño del animal (53 mm de diámetro interno). Dicho procedimiento se realizó tres veces por día (09:00, 12:00 y a las 16:00 horas) (figura III.1). Ward y Weisz (1984) demostraron un incremento en los niveles de corticosterona en plasma tanto en las madres como en sus fetos luego de la aplicación de este protocolo de estrés por inmovilización.

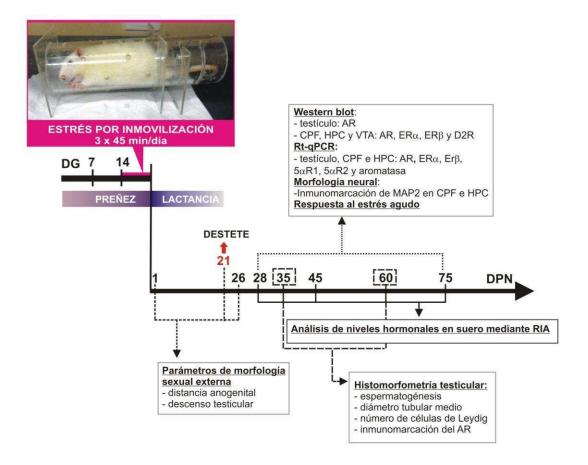


Figura III.1. Esquema del diseño experimental utilizado en el modelo de estrés por inmovilización. 5αR1 y 5αR2= enzima esteroide 5 alfa reductasa isoformas 1 y 2, respectivametne; AR= receptor de andrógenos; CPF= corteza prefrontal; D2R= receptor dopaminérgico de tipo D2; DG= día gestacional; DPN= día post natal; ERα= receptor de estrógenos alfa; ERβ= receptor de estrógenos beta; HPC= hipocampo; MAP2= proteína asociada a microtúbulo 2; RIA= radioinmunoensayo; RT-qPCR= técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa; VTA= área tegmental ventral.

III.2.2- Administración prenatal de flutamida.

Las ratas preñadas seleccionadas para este experimento fueron asignadas de forma aleatoria a uno de los grupos experimentales que se describen a continuación. Las manipulaciones que se detallan, fueron llevadas a cabo en un cuarto experimental separado durante las 9:00 y 10:00 horas de la mañana.

- **VEHICULO (VEH)**: las hembras gestantes recibieron una inyección subcutánea diaria de solución vehículo (5% etanol absoluto en propilenglicol; volumen inyección entre 200 y 400 μl de solución, conforme el peso corporal de la hembra gestante) desde el día 15 hasta el día 21 de gestación.
- **FLUTAMIDA** (**FLU**): las hembras gestantes recibieron una inyección diaria subcutánea de solución de flutamida (10 mg/kg/día en 5% etanol absoluto en propilenglicol; volumen inyección entre 200 y 400 μl de solución, conforme el peso corporal de la hembra gestante) desde el día 15 hasta el día 21 de gestación (Dominguez-Salazar y col., 2002).

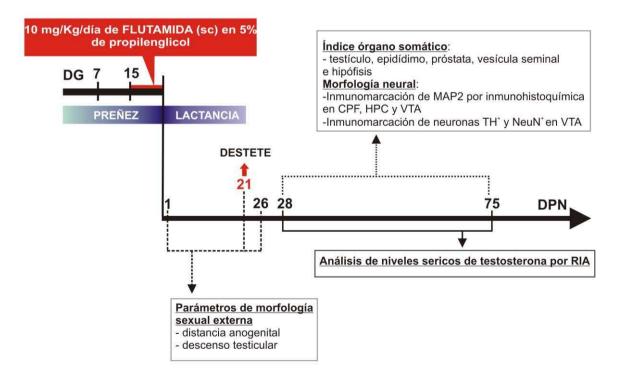


Figura III.2. Esquema del diseño experimental utilizado en el modelo de administración prenatal de flutamida. CPF= corteza prefrontal; DG= día gestacional; DPN= día post natal; HPC= hipocampo; MAP2= inmunomarcador para proteína asociada a microtúbulo 2; NeuN= inmunomarcador neural; RIA= radioinmunoensayo; TH= enzima tiroxina hidroxilasa; sc= inyección subcutánea; VTA= área tegmental ventral.

III.3- OBSERVACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LAS CAMADAS Y ANÁLISIS DE PARÁMETROS DEL DESARROLLO SEXUAL DE LAS CRÍAS.

III.3.1- Características de la camada.

En ambos modelos de manipulación prenatal utilizados, los parámetros de la camada tales como el número de crías (macho y hembra) obtenidas, número de crías fallecidas y el peso corporal de toda la camada fueron evaluados en el día postnatal 1 (DPN), 21, 28 y 75. En todos los casos siempre se redujo el número de crías a 10 individuos por madre. El destete se realizó a los 21 DPN y las crías fueron separadas de acuerdo al sexo en grupos de no más de 5 individuos por jaula. Para este trabajo de tesis sólo fueron utilizadas las crías macho.

III.3.2-Distancia anogenital.

La distancia anogenital (comprendida como la distancia existente entre el ano y el botón genital) fue medida empleando un calibre. Para ello se seleccionó de forma aleatoria una cría de cada camada a los DPN 1 y 21 (Pereira y col., 2006). Los resultados se expresaron como la distancia anogenital media por animal.

III.3.3- Descenso testicular.

El descenso testicular se evaluó mediante palpación en cada animal (por camada) diariamente desde los DPN 21 al 28 (**figura III.3**). Se consideró que el descenso se encontraba completo cuando ambos testículos se hallaban a la misma altura dentro del saco del escroto (Barros y col., 2004; Hughes y Acerini, 2008). Los resultados fueron expresados como porcentaje promedio de ratas con descenso testicular completo por camada.

III.3.4- <u>Determinación del peso corporal y del índice órgano-somático de testículo, epidídimo, vesícula seminal e hipófisis.</u>

Las ratas de 28 y 75 días de vida fueron pesadas y su peso corporal fue registrado. Luego, las crías fueron decapitados y sus sueros recolectados (ver a continuación). Para el caso de las ratas pertenecientes a los grupos experimentales VEH y FLU, se extrajeron además el testículo derecho, el

epidídimo derecho, la vesícula seminal derecha, la próstata y la hipófisis, los cuales fueron removidos y pesados. En base al peso corporal y el peso húmedo de los órganos extraídos se determinó el índice órgano-somático (Olivares y col., 1996) como: (peso húmedo de cada órgano / peso corporal del individuo) x 100

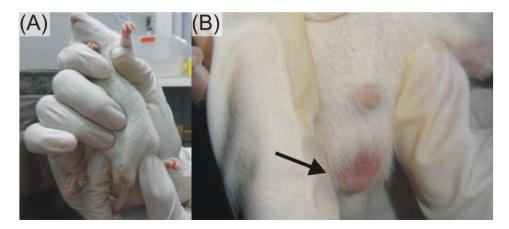


Figura III.3. Descenso testicular. (A) Las ratas eran sostenidas en forma vertical y el descenso testicular se detectaba mediante palpación. **(B)** Detalle de una rata con el descenso testicular completo. La flecha señala cómo ambos testículos se encuentran a la misma altura dentro del saco del escroto.

III.4- CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS EN SUERO.

Para las determinaciones séricas de las hormonas LH, FSH, andrógenos totales, testosterona y Diol se utilizaron sueros de ratas C y EP de 28, 35, 45, 60 y 75 días de vida. Para las determinaciones séricas de testosterona también se utilizaron sueros de ratas VEH y FLU de 28 y 75 días.

Para las determinaciones séricas de prolactina y corticosterona se utilizaron sueros de ratas C y EP, de 28 y de 75 días de edad que habían sido expuestas a una de las siguientes condiciones experimentales:

- Basal: las ratas permanecieron libres de perturbaciones en sus jaulas y fueron decapitados a las 10:00 de la mañana.
- Estrés agudo: las ratas recibieron una única sesión de estrés por inmovilización (el mismo protocolo aplicado a las ratas gestantes) durante 45 minutos, iniciándose a las 9:00 de la mañana. Posteriormente a la sesión de estrés, las ratas fueron sacrificadas.

■ Estrés agudo + recuperación: las ratas asignados a este tratamiento, recibieron 45 minutos de un estrés agudo por inmovilización (inicio del estrés a las 9:00 horas). Finalizada la sesión de estrés, las ratas fueron devueltas a la sala del laboratorio donde permanecieron libres de perturbaciones durante dos horas. Posteriormente se las decapitó.

Para las determinaciones séricas de estas dos últimas hormonas, también se utilizaron sueros de ratas madres que habían sido expuestas o no a un protocolo de estrés por inmovilización durante la preñez. Dichas ratas fueron decapitadas a los 35 días postparto sin ser expuestas a ningún tipo de protocolo de estrés agudo. Se eligió dicha edad, para evitar alteraciones en los niveles basales de hormonas debido al estrés por la separación de sus crías.

III.4.1- Obtención de sueros.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación entre las 9:00-11:00 horas de la mañana (para evitar variaciones circadianas en los niveles hormonales). Se recolectaron muestras de sangre troncal en tubos cónicos de vidrio esterilizados que luego fueron colocados a temperatura ambiente durante 1.30 horas. Tras la formación del coágulo, se realizó una centrifugación a 1000xg durante 10 minutos. Inmediatamente recolectados los sobrenadantes, éstos fueron almacenados a -20°C para posteriormente ser utilizados en las diferentes determinaciones hormonales.

III.4.2- Radioinmunoensayo (RIA) para hormonas protéicas.

Las concentraciones séricas de LH, FSH y prolactina fueron determinadas mediante la técnica de RIA de doble anticuerpo (Libertun, 1980). Las muestras fueron evaluadas por duplicado en alícuotas de 100 µl de suero. Las mediciones de LH y FSH fueron realizados en colaboración con la Dra. Victoria Lux (*Laboratorio de Neuroendocrinología*, Instituto de Biología y Medicina Experimental, IByME), mientras que la PRL fue medida en colaboración con la Dra. Damasia Becú (*Laboratorio de Regulación Hipofisaria*, IByME).

A continuación se detalla el protocolo empleado para la hormona LH, siendo éste esencialmente el mismo para las otras hormonas proteicas que medimos en este trabajo (ver más adelante).

III.4.2- a) LH.

La hormona LH se cuantificó usando el método heterólogo desarrollado por el Dr. G.D. Niswender (Colorado State University, Fort Collins, CO, EEUU) (Niswender y col., 1968).

Marcación de la hormona: se utilizaron 2.5 μg de LH purificada, aislada de glándulas hipofisarias ovinas por Reichert y col (Niswender y col., 1968). La hormona liofilizada fue disuelta en solución de *buffer* fosfosalino (PBS: *buffer* fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M y azida sódica 0.01% pH 7.4, a una concentración final de 100 μg/ml). La marcación se efectuó en tubos de vidrio, bajo campana. Se utilizó ¹²⁵l, libre de portador y apto para marcar proteínas. Las soluciones empleadas fueron: *buffer* fosfato 0.5 M pH 7.5; *buffer* fosfato 0.05 M pH 7.5; PBS; solución de transferencia: 100 mg de lK, 0.8 g de sacarosa, 10 ml de H₂O; solución de cloramina-T: 100 mg/100 ml de *buffer* fosfato 0.05 M preparada inmediatamente antes de su uso; solución de metabisulfito de sodio: 100 mg/10 ml de *buffer* fosfato 0.05 M.

Se procedió a la separación de la hormona marcada del ¹²⁵I libre mediante una columna de tamiz molecular de Bio-gel P-10 Gel, en *buffer* fosfato 0.05 M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 1ml de PBS con EDTA 0.05 M y 2% de BSA.

Procedimiento de marcación: 10 μl de *buffer* fosfato 0.5 M y 0.5 mCi de ¹²⁵l fueron añadidos a la hormona disuelta en PBS. La oxidación se efectuó con 11.25 μl de la solución de cloramina-T, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción fue detenida con 6.25 μl de metabisulfito de sodio. Luego se agregaron 100 μl de la solución de transferencia (para verificar la presencia de exceso de agentes oxidantes), y el contenido del tubo de marcación fue pasado por la columna de separación. Se eluyó con solución de fosfato 0.05 M que también se utilizó como *buffer* de corrida. Se recogieron aproximadamente 500 μl de eluído por tubo, y se registró la radiactividad de 10 μl de cada uno de los tubos en un contador gamma. Con las columnas empleadas se obtuvo una buena separación de los picos de hormona marcada y del ¹²⁵l no incorporado a la proteína. Los tubos de la marcación conteniendo

la hormona marcada radioactivamente se reunieron en uno y se congelaron en alícuotas para su posterior utilización en el RIA.

RIA: el primer anticuerpo contra LH de rata (NIDDK-Anti-Rat-LH-RIA-11) fue obtenido al inmunizar conejos con LH de rata altamente purificada y presenta reactividad cruzada con LH de ratón y de oveja. Se diluyó en PBS, EDTA 0.05 M con 0.25% de suero de conejo normal pH 7.4, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo. La dilución inicial fue de 1:200000 y la final de 1: 980000. El estándar de referencia fue LH purificada de hipófisis de rata (NIDDK-Rat-LH-RP3), con un mínimo de contaminante de FSH y TSH. Los patrones de referencia (de 0.016 a 8 ng por tubo) y la dilución de las muestras fueron realizadas en PBS con 1% de albúmina de huevo (*buffer* EA). La separación se logró por segundo anticuerpo, usando antisuero de oveja contra globulina de conejo diluido en PBS-polietilenglicol 6000 8% (dilución inicial 1:9000).

Los resultados fueron expresados en términos de los patrones de LH de rata RP3, ya que está demostrada la reactividad cruzada con LH de ratón. La sensibilidad del ensayo fue de 0.18 ng/ml y los coeficientes de variación intraensayos fueron de 7.2%.

El protocolo de rutina seguido fue el siguiente: se agregaron 100 µl del primer anticuerpo (diluido en PBS-EDTA) y 100 µl de la hormona trazadora diluida en PBS-EA 1% (entre 17000 y 20000 cpm por tubo) a la curva patrón y a las alícuotas experimentales preparadas en *buffer* EA (400 µl de volumen final); luego de una incubación de 24 horas a temperatura ambiente se agregaron 500 µl del segundo anticuerpo en PBS-polietilenglicol 6000 8%. Luego de 2 horas a temperatura ambiente y 1 hora a 4ºC se separó la hormona libre de la unida por centrifugación a 2000 rpm, durante 30 minutos a 4ºC. El sobrenadante fue aspirado y se registró la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma.

Los protocolos para la determinación de FSH y PRL por fueron similares al descripto para LH, por lo que se detallará a continuación, sólo aquellos puntos en los que difieran.

III.4.2- b) FSH

La hormona trazadora fue NIDDK-Rat-FSH-I-8. El primer antisuero fue obtenido en conejos contra FSH purificado de rata (NIDDK-Anti Rat FSH Serum-11), y la dilución inicial fue 1:30000. El estándar de referencia fue FSH purificado de rata (NIDDK-Rat-FSH-RP2) con casi nula contaminación de LH y TSH. La curva patrón se extiende de 0.1175 a 15 ng por tubo. La sensibilidad del ensayo fue de 2.14 ng/ml, y el coeficientes de variación intra-ensayo fue de 8.0%.

III.4.2- c) prolactina

El ensayo para prolactina de rata no presenta reactividad cruzada con la prolactina de ratón, por lo que se implementó el RIA de prolactina de ratón. La hormona trazadora fue AFP10777D. Se utilizó anticuerpo primario IgG policional de conejo anti-prolactina de ratón (AFP131078), dilución final 1:400000. El estándar de referencia fue prolactina purificado de ratón (mprolactina-AFP-6476C). La curva patrón se extiende de 0.02 a 5 ng por tubo. La sensibilidad del ensayo fue de 0.95 ng/ml, y el coeficientes de variación intra- ensayo fue de 7.8%.

III.4.3- Determinación de esteroides testiculares.

Las determinaciones de los niveles séricos de andrógenos totales y Diol mediante RIA, fueron realizadas en colaboración con la Dra. Silvia Gonzalez-Calvar y el Dr. Ricardo Calandra (*Laboratorio de Esteroides*, IByME). La determinación de testosterona específica se realizó bajo la supervisacion de la Dra. Viviana Mesch (Endocrinología, Hospital de Clínicas "José de San Martín").

III.4.3- a) Determinación de andrógenos totales mediante RIA.

El procesamiento de los sueros para la determinación de la concentración sérica de andrógenos se realizó según el método descripto por Suescun y col. (1985). Se extrajeron alícuotas de 300 μl de suero 2 veces con 2 ml de éter dietílico. Los extractos etéreos fueron separados por congelación y evaporados bajo campana. Los residuos se resuspendieron en *buffer* fosfosalino gelatina (HNa₂PO₄ 40 mM, H₂NaPO₄ 35 mM, NaCl 0.15 M, gelatina 0.1%, azida sódica

0.1%, pH=7.4), en una proporción 1:1 con el volumen de suero, agitando vigorosamente para favorecer la resuspensión.

Las determinaciones de las concentraciones séricas de andrógenos totales se realizaron mediante RIA según el método validado por Frungieri et al. (1996). Se tomaron alícuotas de 100 µl de los extractos séricos.

Estándares: se prepararon a partir de una solución madre de testosterona de 16 μg/ml en etanol, en un rango de 6.25 a 800 pg por tubo en 200 μl de *buffer* fosfosalino gelatina.

Anticuerpo: a los tubos conteniendo la curva estándar y las muestras, se agregaron 100 µl de anticuerpo anti testosterona disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina en una dilución de 1:160.

Hormona radioactiva: todos los tubos del ensayo recibieron la ³[H]-testosterona disuelta en *buffer* fosfosalino gelatina (aproximadamente 7000 cpm/100 μL). Las muestras y la curva de estándares con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 horas a 4°C.

Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo: Se utilizó una suspensión de carbón: dextrano (0.5%: 0.05%) en *buffer* fosfosalino gelatina para separar al esteroide libre del complejo esteroide-anticuerpo (Suescun y col., 1985). Se añadieron 200 µl de la suspensión a las muestras y a la curva de estándares y luego de 10 minutos de incubación se realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos. Luego se tomaron 400 µl del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1.5 ml de líquido centellador. Se registró la radiactividad de los viales en un contador beta.

La sensibilidad del ensayo fue de 42 pg/ml. El coeficiente de variación intraensayo fue del 12% (Russell y col., 1998; Matzkin y col., 2009). Siendo que el anticuerpo empleado para la realización del RIA descripto cruzaba en un 35% con la hormona DHT y en un 0.04% con Diol, los resultados obtenidos fueron expresados en términos de concentraciones séricas de andrógenos totales/ml suero (Matzkin y col., 2009).

III.4.3- b) Determinación de Diol mediante RIA.

El procesamiento de los sueros y el protocolo seguido para determinar los niveles séricos de Diol fue similar al descrito para andrógenos totales. Se utilizó un anticuerpo altamente específico (que presentaba un 5% de reacción cruzada con testosterona) en una dilución 1/500. Para la separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo se utilizó una suspensión de carbón: dextrano de 0.625%: 0.062% en *buffer* fosfosalino gelatina. La sensibilidad del ensayo fue de 105 pmol/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue del 15% (Rulli y col., 1995).

III.4.3- c) Determinación de testosterona específica mediante RIA.

Con objetivo de medir de las concentraciones de testosterona en los sueros de las ratas mediante una forma específica, se realizó un RIA con un kit comercial específico. Se utilizaron volúmenes duplicados de 100 µl de suero y se siguieron las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 0.05ng/ml y el coeficiente de variación intra-ensayo fue menor al 4.6%.

III.4.4- Determinación de corticosterona.

Los niveles de corticosterona en suero fueron evaluados por RIA, bajo la supervisacion de la Dra. Andrea de Laurentiis (Laboratorio Neuroendocrinología, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFyBO) y siguiendo el protocolo descripto por Mohn y col. (2011). Los sueros fueron incubados con un anticuerpo específico anti-corticosterona durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuacion, se agrego ³[H]- corticosterona como marcador y la incubación prosiguió durante una hora a 37ºC. Se detuvo la reacción con la adición de carbono-dextrano frío. Los tubos permanecieron a 4ºC durante 10 minutos, a cabo de los cuales fueron centrifugados a 2000xg durante 15 minutos a 4ºC. La radioactividad fue cuantificada en sobrenadante. La sensibilidad del ensayo y el coeficiente de variación intraensayo fue de 30 pg/tubo y del 15% respectivamente (Mohn y col., 2011).

III.5- EXPRESION DE ENZIMAS Y RECEPTORES EN CEREBRO Y TESTICULOS

III.5.1- Determinación de la expresión génica.

La expresión génica de AR, ERα y ERβ, al igual que de las enzimas esteroidogénicas (aromatasa y 5αR, isoformas I y II) fue evaluada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR, de sus siglas en inglés: *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) en homogeneizado de cerebros y testículos pertenecientes a ratas de 28 y 75 días de edad, C y EP. La expresión proteica de los receptores AR, ERα, ERβ y la del receptor de DA de tipo D2, fue evaluada en homogenados de cerebro mediante Western blot.

III.5.1- a) Extracción de ARN.

La extracción del ARN total se realizó mediante el empleo del reactivo Trizol siguiendo las indicaciones del fabricante. Los tejidos fueron homogeneizados en una relación de 50mg de tejido/ml de Trizol y almacenados a -70°C. La determinación de la concentración del ARN de las muestras se realizó mediante espectrometría, teniendo en cuenta la relación de absorbancias a 260/280 nm.

Densidad óptica 260x0.04x Factor de dilución= Concentración ARN (μg/μl)

A partir del ARN total (10 μg) se aisló ARNm usando PolyATract III y luego se almacenó a -70°C, hasta su posterior utilización.

III.5.1-b) Construcción de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Primer Express (Applied Biosystems). Los genes considerados como "genes de referencia" o de "normalización" (*housekeeping*) se tomaron de acuerdo al trabajo de O'Shaughnessy y col. (2011) (**tabla III.1**).

III.5.1- c) RT-qPCR en tiempo real.

A partir del ARNm se generó ADN copia (ADNc) por retrotranscripción reversa utilizando la enzima SuperScript II y oligonucleótidos oligo (dT)16. El ADNc se

almacenó a -20 °C. Se realizó también un control negativo sin enzima para descartar la presencia de ADN genómico remanente en las muestras.

Las reacciones de PCR en tiempo real se efectuaron en un termociclador, usando SYBR® Green PCR Master Mix. Para verificar que sólo se detectara un único producto de PCR, todas las reacciones se sometieron al protocolo de disociación por calor luego del ciclo final de la PCR (curva de *melting*) (Pfaffl, 2001; Biosystems, 2004).

Gen	Oligonucleótidos (5'-3')
Srd5a1	sentido: agcaatcagcagcccttacaa
NM_017070.3	antisentido: ggatggcagactgtgcttagg
Srd5a2	sentido: catatagttcattgatttggaaaggagat
NM_022711.4	antisentido: gtagcctctctctgccacacaa
Cyp19	sentido: cacggatgtttgatggtctga
NM_017085.2	antisentido: ctcggcttgctgacaaacc
Ar	sentido: tgcacctgacctggttttca
NM_012502.1	antisentido: tcacgcactggctgtacattc
Esr1	sentido: ttccccaacaccatctgagaa
NM_012689.1	antisentido: cgtttcagggattcgcagaa
Esr2	sentido: cactgcacttcccaggagtca
NM_012754.1	antisentido: aacttggcattcggtggtaca
B2m	sentido: tggcgtcttctgcccttct
NM_012512.2	antisentido: gcgatggaggactgcatca
Sdha	sentido: acaaggtgcggattgatgagt
NM_130428.1	antisentido: ggaacggatagcaggaggtaca

Tabla III.1- Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de expresión génica. NM_= número de acceso al GenBank; Srd5a1 y Srd5a2= 5 alfa reductasa tipo 1 y 2, respectivamente; Cyp19= aromatasa; Ar= receptor de andrógenos; Esr1 y Esr2= receptor de estrógenos alfa y beta, respectivamente. Como genes *housekeeping* fueron utilizados B2m= beta 2 microglobulina y Sdha= complejo de la succinato deshidrogenasa subunidad A.

Curva estándar: Se tomó 1µl de cada muestra producto de la retrotranscriptasa reversa, las cuales fueron mezcladas con la finalidad de generar un *pool* de ADNc. A continuación se efectuaron diluciones seriadas de dicho *pool* (1:20; 1:40; 1:80; 1:200; 1:400) confeccionándose una *curva* estándar de Ct en función del logaritmo de la concentración, a partir de la cual se calcularon las concentraciones de cada muestra de interés.

Los puntos de la curva estándar, al igual que de las muestras de tejido, fueron medidos por triplicado para cada gen y en la misma placa. Adicionalmente, fueron incluídos dos controles negativos: (a) sin templado y (b) ARNm no sometido a la acción de la retrotranscriptasa (control sin RT).

Se emplearon 4 μ l de la RT (1:100) y se agregaron 8.5 μ l de la mezcla de reacción (volúmen final por pocillo 12.5 μ l). Dicha mezcla de reacción estaba conformada por: 6.25 μ l MasterMix , 0.375 μ l de cada primer y 1.5 μ l de H₂O. Para cada gen medido, se realizaron mezclas de reacción específicas.

III.5.1- d) Análisis de los datos.

Junto con los genes de interés se amplificaron los genes de referencia: *Sdha* y *B2m*. La cuantificación relativa de cada gen de interés se realizó mediante la comparación del nivel de expresión de dicho gen en función del nivel de expresión del gen normalizador usando el método de curvas estándares.

III.5.2- Análisis de expresión proteica mediante Western blot.

III.5.2- a) Extracción y procesamiento de los tejidos.

Las ratas se sacrificaron por decapitación extrayéndose rápidamente los testículos y los cerebros. Los testículos fueron pesados y congelados a -80 °C hasta su utilización. Las áreas cerebrales CPF, área preóptica media del hipotálamo (HPT), HPC y VTA fueron rápidamente disecadas (tomando como referencia al atlas de Paxinos & Watson (1986), pesadas y también congeladas a -80 °C hasta su utilización.

Para los experimentos los tejidos fueron homogeneizados con *buffer* RIPA (50mM Tris-HCl, pH 7.4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Tritón X-100; 1% deoxicolato de Sodio; 0.1% SDS; 1% inhibidor de proteasa) a razón de 5µl de *buffer*/gr de tejido. El extracto fue centrifugado a 12000xg durante 15 minutos a 4°C conservándose el sobrenadante obtenido.

III.5.2- b) Determinación de niveles proteicos.

Los niveles de proteínas fueron determinados siguiendo el método descripto por Bradford y col (1976), empleando seroalbumina bovina como estándar. Se realizaron las diluciones correspondientes en el buffer de lisis provenientes de cada tratamiento. A esta solución se le adiciono 1ml de reactivo de Bradford y

luego de 10 minutos se midió la intensidad del color azul en el espectofotometro UV-Visible a 595 nm de longitud de onda.

III.5.2- c) SDS-PAGE y transferencia.

Las muestras de tejido a utilizar fueron descongeladas y hervidas durante 5 minutos a 100°C. Se sembraron cantidades similares de proteína de cada muestra y éstas fueron separadas por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (SDS-PAGE) y a continuación transferidas a membranas de PVDF en presencia de un buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 10%), durante 1 hora a 100 voltios. Con el objetivo de disminuir la unión inespecífica de los anticuerpos, las membranas fueron incubadas durante dos horas con buffer fosfosalino-Tween [PBS-T: PBS 10mM (pH=7.4), Tween 20 0,1%] conteniendo leche descremada al 5%. Luego se realizó la incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario especifico: anti AR (1:100), anti ERα (1:500), anti ERβ (1:500) ó anti D2R (1:1000). Al día siguiente, las membranas recibieron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y a continuación fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG rata acoplado a la enzima peroxidasa (1:5000) a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T. La interacción entre el anticuerpo marcado con la peroxidasa y el anticuerpo específico para la proteína de interés se detectó mediante una reacción de quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL-plus durante 5 minutos, realizándose el revelado final mediante el uso de un scanner STORM.

Para comprobar que los cambios en el contenido de expresión de los receptores de interés no fueran consecuencia de variaciones en la cantidad de proteína sembrada.

Las membranas se incubaron con un *buffer* conteniendo β-mercaptoetanol 50 mM, SDS 2% y Tris-HCl 62,5 mM (pH= 6,8) durante 20 minutos 55°C para remover la unión de los anticuerpos primarios y secundarios. Posteriormente las membranas se lavaron 4 veces con PBS-T, se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-T y se incubaron con un anticuerpo anti-Actina de ratón (1:2500) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubaron con

un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a enzima peroxidasa (1/5000) y se procedió a detectar las bandas específicas por quimioluminiscencia.

La intensidad de las bandas específicas fue cuantificada por densitometría óptica, utilizando el programa Image J (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland, USA). Los resultados de densidad óptica media correspondiente a cada banda de proteína de interés se expresaron como relativos a los valores obtenidos de actina para una de las bandas elegida al azar.

III.6- HISTOLOGIA TESTICULAR.

III.6.1- Obtención y preparación de los tejidos.

Se disecaron testículos de crías de 28, 35 y 60 días de vida, C y EP que fueron pesados y seccionados coronalmente en 2, 3 o 6 partes iguales (dependiendo si el testículo pertenecía a una rata de 28, 35 o 60 días de edad, respectivamente). A continuación fueron inmersos en la solución fijadora de Bouin alcohólico (0.4% de ácido pícrico, 7% ácido acético, 70% etanol 80°, 30% formaldehído) para realizar análisis de histomorfometría gonadal o en una solución de formaldehído al 10% para análisis de inmunohistoquímica.

Los cortes se realizaron en porciones no mayores a los 5 mm para permitir que los fijadores pudieran penetrar de forma homogénea por todo el tejido. Luego de 24 horas de fijación los testículos fueron sometidos a deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (50°, 70°, 80°, 96° y 100°) y luego expuestos a xilol durante 2 horas. Finalmente, fueron incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm de ancho utilizando un micrótomo manual. Cada corte fue montado en portaobjetos silanisados. Para el análisis de los parámetros histológicos que se describen a continuación se tuvieron en cuenta dos cortes seriados, extraídos de 4 zonas diferentes a lo largo del eje longitudinal del testículo de cada animal.

III.6.2- Evaluación de parámetros de histomorfometría gonadal.

Los cortes de testículos fijados con la solución de Bouin alcohólico fueron teñidos con los colorantes hematoxilina y eosina: Los cortes histológicos se desparafinaron en xilol e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100°, 96° y 70°) y finalmente en agua destilada. Se sumergieron en hematoxilina durante 2 minutos, y luego se lavaron en agua corriente hasta la

visualización del viraje de color. A continuación, los cortes se sumergieron en eosina acuosa 1% durante 2 minutos y se lavaron en agua corriente. Por último, los mismos fueron deshidratados, sumergiéndolos en concentraciones crecientes de etanol (70°, 96° y 100°), aclarados con xilol y montados en bálsamo. Para el análisis que se detalla a continuación, los cortes fueron examinados en microscopio de luz utilizando un software computacional específico: NIS ELEMENT BASIC READ de Nikon.

Como parámetros de histomorfometría gonadal, se evaluaron características descriptas a continuación. Este trabajo fue supervisado por los Dres. Marcela Venara У Rodolfo Rey (Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital Gutierrez).

III.6.2- a)- Diámetro tubular medio.

El diámetro tubular medio se determinó mediante la selección de los 50 túbulos seminíferos mas circulares, a un aumento de 10X por animal, por edad y por condición experimental (Chandra y col., 2010). La circularidad en los túbulos seminíferos se constató midiendo los diámetros verticales y horizontales, asegurándose de que ambos fueran lo más similares posibles, obteniéndose un promedio de ambos diámetros como valor final por túbulo seminífero.

III.6.2- b) Cuantificación del número de células de Leydig.

El número de células de Leydig por unidad de volumen de testículo se calculó mediante el uso de la ecuación de Floderus (Tapanainen y col., 1984).

$$NV = NA/(T + D - 2h)$$

Donde NA= número de núcleos de células de Leydig por unidad de área del corte; T= grosor del corte; D= diámetro nuclear promedio; 2h= casquete polar (alto de la sección nuclear mínima reconocible).

El número de núcleos de células de Leydig por unidad de área se estimó luego de contar el número de células que caían dentro de una grilla de 200µm de lado en 100 campos diferentes (por animal), a un aumento de 40X. Los núcleos que se superponían con los bordes de la grilla fueron ignorados. El valor D se obtuvo al medir el eje horizontal y vertical de los núcleos,

considerándose para este valor aquellos núcleos en los cuales ambos valores coincidían.

III.6.2- c) Análisis del desarrollo espermatogénico mediante el criterio de puntajes de Johnsen.

La morfología, así como también la progresión de la maduración del epitelio germinal del túbulo seminífero se categorizó utilizando el criterio de puntajes de Johnsen (Johnsen, 1970). Este sistema de puntuación fue estandarizado por Johnsen en 1970 y permitía evaluar la maduración de los túbulos seminíferos humanos. Se basa en hallazgos histológicos del testículo y en los estados de maduración de las células germinales de los túbulos seminíferos. La adaptación del puntaje de Johnsen para ratas fue estandarizado en el año 1985 por Lewis-Johnes y Kerrigan (1985). Brevemente, el criterio aplica un puntaje que va de 1 a 10 a cortes transversales de túbulos seminíferos: 10= completa; 9=presencia de espermatogénesis espermatozoides desorganización del epitelio germinal; 8=pocos espermatozoides presentes en la región luminal del epitelio germinal; 7=ausencia de espermatozoides con presencia de espermátidas elongadas (o maduras); 6=espermátidas inmaduras presentes en transición hacia maduras; 5=presencia de espermátides inmaduras y espermatocitos meióticos I; 4=presencia de espermatocitos meióticos I; 3=solamente se detecta presencia de espermatogonias; 2=ausencia de células germinales, pero presencia de células de Sertoli; 1=ausencia de células germinales y de Sertoli.

Se calculó el puntaje de Johnsen medio por animal, por condición experimental, tras analizar 100 cortes transversales de túbulos seminíferos al azar por animal a un aumento de 40X. Nuevamente en este caso, se constató la circularidad en los túbulos seminíferos seleccionados para la medición.

III.6.3- Inmunohistoquímica del receptor de andrógenos.

Los cortes histológicos de testículos fueron desparafinados en xilol e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol y *buffer* TBS (tris buffer salino 0.05M). Se realizó una exposición antigénica, sometiendo las muestras a microondas en *buffer* citrato 0.01 M (pH= 6): 4 minutos a 700 W, 14 minutos a 280 W, seguido de 20 min en reposo dentro del microondas. La actividad de la

enzima peroxidasa endógena se bloqueó tratando los cortes con una solución de 3% H₂O₂ en 10% metanol durante 20 minutos. A continuación, se agregó sobre cada corte saponina 0.5 % en TBS por 5 minutos para permeabilizar los cortes, seguido de un bloqueo con suero normal de cabra al 10% en buffer TBS con 1% BSA durante una hora a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario anti-AR (1/100; preparado en una solución 0.02M NaPO₄H₂.H₂O, 0.15M NaCl, azida sódica 1% BSA, pH 7.6) se realizó en cámara húmeda a 4 ºC hasta el día siguiente. Se realizaron controles negativos con ausencia del primer anticuerpo. Al día siguiente los cortes fueron lavados 5 veces con TBST (Tween-20 0.05% en TBS) durante 5 minutos y se agregó el segundo anticuerpo biotinilado anti IgG de conejo desarrollado en cabra (dilución 1:1000), en 2% suero normal de cabra-TBS. La incubación con este segundo anticuerpo se realizó durante 1.30 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se agregó el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de un lavado con TBST, se procedió al revelado de la reacción utilizando una solución de 0.01% H₂O₂ y 0.05% DAB en buffer Tris-HCl 50 mM (pH=7.6). La reacción se frenaba mediante enjuague con buffer TBS. Por último, se deshidrataron los cortes sumergiéndolos en una serie de concentraciones ascendentes de etanol, seguido de xilol y por último se realizó el montaje de los mismos utilizando bálsamo de Canadá. Los cortes fueron analizados en el microscopio óptico en un aumento de 40X y las fotografías procesadas con el programa Image Pro Plus. Para la cuantificación del resultado se delimitó una grilla cuadrada de 500 µm de lado y se cuantificó el número de células de Leydig, peritubulares y de Sertoli inmunopositivas para el AR. Los resultados se expresaron como N° de células inmunopositivas para AR/ mm² de testículo.

III.7- ESTUDIOS DE MORFOLOGÍA CEREBRAL.

III.7.1- Perfusión cardíaca.

Para los experimentos de estudio de morfología neuronal se utilizaron cerebros de ratas pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (C, EP, VEH y FLU) de 28 y 75 días de vida. Las mismas fueron anestesiadas intra-peritonealmente con una solución anestésica de Ketamina/ clorhidrato de xilacina (75 mg/kg; 10 mg/kg respectivamente). El efecto de ambas anestesias

sobre las ratas se evaluó mediante la ausencia de reflejos corneales y en las traseras. Inmediatamente. las ratas fueron perfundidas patas intracardíacamente a través del ventrículo izquierdo mediante el uso de una bomba peristáltica con una solución salina de lavado a To ambiente (NaCl 0.9%, NaNO₂ 0.05% p/v, 50 unidades internacionales de heparina) y luego con una solución fijadora conteniendo paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M, pH 7.4. El volumen empleado y la velocidad de flujo utilizadas se ajustaban de acuerdo a la edad del animal que se estaba usando. De esta manera para ratas de 28 días se utilizó una velocidad de 5 ml/minuto y para ratas de 75 días se utilizó una velocidad de 8 ml/minuto.

Finalizada la perfusión, los cerebros fueron removidos y fijados por inmersión durante 4 horas a 4ºC en solución fijadora. A continuación, los cerebros fueron colocados en una solución de sacarosa al 15% en PBS 0.1M, pH 7.4 a 4°C, hasta su completa inmersión (aproximadamente 24 horas). Cuando eso sucedía, los cerebros eran cambiados a una solución conteniendo 30% de sacarosa en PBS 0.1M, pH 7.4, a 4°C. Cuando la inmersión de los mismos se completaba (48 horas, aproximadamente), los cerebros eran congelados primero a -40°C y luego a -80°C donde se los almacenaba hasta su procesamiento.

Se realizaron cortes coronales seriados de 25 µm de las áreas de interés mediante el uso de un criostato. Para cada área los cortes realizados se fueron recolectando de forma de poder obtener en cada pocillo alrededor de 10 cortes representativos de diferentes regiones de la región de interés (es decir que dependiendo del área y de la edad del animal que se estaba procesando, pudieron obtenerse de 7 a 12 wells con aproximadamente 10 cortes por well).

Los cortes fueron almacenados a -20°C en una solución crioprotectora de Glicerol/PBS 50%. Las áreas cerebrales utilizadas fueron seleccionadas conforme a las estructuras anatómicas correspondientes del atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1986): para CPF se tomaron como referencia las láminas 6 a 11, analizándose las capas II y III de la corteza dorsofrontal. Para HPC frontal se tomaron como referencia las láminas 28 a la 34 del atlas, analizándose el estrato radiado (SR) de la región CA1. Finalmente para VTA se utilizaron como referencia las láminas 38 a la 43 del atlas.

III.7.2- Inmunofluorescencia.

Se utilizaron cortes conteniendo VTA de ratas VEH y FLU, de 28 y 75 días. Los mismos fueron procesados en libre flotación de forma simultánea y en condiciones estandarizadas. Cortes de VTA de ratas pertenecientes a diferentes tratamientos prenatales pero igual edad fueron procesados en el mismo día. Se realizaron 3 lavados con una solución PBS- 0.15% Tritón X-100 (TA). Para evitar uniones inespecíficas, se procedió a la permeabilización y bloqueo con una solución compuesta por 5% suero fetal bovino en TA durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. A continuación los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes anti-NeuN (dilución 1:1000) y anti-TH (dilución 1/1000), utilizando TA como solución diluyente, hasta el día siguiente a 4℃. Luego de 5 lavados de 5 minutos con TA se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 4 horas en agitación a temperatura ambiente y en oscuridad: para detectar el anticuerpo anti-NeuN se utilizo un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluorósforo Alexa fluor 488 (1:1000) y para detectar el anticuerpo anti-TH se utilizo un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con cianina (cy3) (dilución 1:250). A continuación se realizaron 4 lavados con TA y un lavado con PBS. Luego los cortes fueron contrateñidos con Hoescht 33342 durante 10 minutos con el objetivo de visualizar núcleos celulares. Por ultimo se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y los cortes fueron montados sobre portaobjetos gelatinizados. Luego de dos horas, se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia DAKO y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su observación.

La evaluación del número de neuronas totales empleando el marcador NeuN y el número de neuronas TH⁺ en VTA se realizó mediante el análisis seriado de cortes del área de cada animal (por edad y tratamiento prenatal), utilizando un n=4 por condición. Los límites de la estructura en el corte coronal se determinaron en las imágenes digitalizadas (objetivo 4X) donde se delimito el área a cuantificar. Por cada animal se contaron 6 cortes conteniendo el área de interés y se cuantificaron 2 a 3 campos de cada corte seriado (de ambos hemisferios cerebrales) en imágenes tomadas a una mayor magnificación (objetivo 20X). Debido a la forma en la cual se recolectaron los cortes, donde la

cuantificación de cada sección se llevó a cabo en una de cada 8 (para DPN 28) o de cada 10 (para DPN 75) secciones (aproximadamente separadas cada 600μm), se descarta la probabilidad de cuantificar dos veces una misma neurona. Una vez adquiridas las imágenes de fluorescencia se procedió al análisis de las mismas mediante el uso del programa Image Pro Plus. Se cuantificó el número total de células TH⁺ y NeuN⁺ en VTA, mediante el conteo de células positivas para cada inmunomarcador dentro de un área rectangular de 400 x 300 μm de lado. La superposición digitalizada de las fotos obtenidas con cada marcador para un mismo campo permitió observar el número de células que expresaban inmunomarcación positiva para ambos marcadores. Este último resultado se expresó como % de neuronas TH⁺ y se calculó luego de contar el número de células TH⁺NeuN⁺/número total de células NeuN⁺ x 100.

III.7.3- Inmunohistoquímica.

Se utilizaron cortes de CPF e HPC de ratas C, EP y cortes de CPF, HPC y VTA de ratas VEH y FLU de 28 y 75 días, que también fueron procesados en libre flotación, simultáneamente y en condiciones estandarizadas (el inmunomarcador fue procesado el mismo día para individuos de diferentes tratamientos, pero de una misma edad). Una vez seleccionados los cortes, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TA. A continuación se inhibió la actividad de la enzima peroxidasa endógena tratando a los cortes con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5% en TA durante 30 minutos en agitación. Luego de 3 lavados de 5 minutos con TA, los cortes fueron incubados durante una hora en una solución de bloqueo conteniendo suero fetal bovino al 5% en TA. Luego de dos lavados de 5 minutos con TA, los cortes fueron incubados hasta el día siguiente con anticuerpo anti-MAP2 (1:1000). Luego de lavar 5 veces (durante 5 minutos con TA), se realizó una incubación durante 2 horas con anticuerpo secundario acoplado a biotina. Posteriormente, los cortes fueron lavados 3 veces, durante 5 minutos, con TA y se incubaron durante 90 minutos con el complejo de avidina-peroxidasa (1:500). A continuación se realizaron 5 lavados de 5 minutos con TA y 2 lavados de 5 minutos con una solución de buffer acetato 0.1 M, pH 6.0 (TB). Los cortes fueron incubados en oscuridad con una solución 0.035% de DAB

conteniendo 2.5% de (NH₄)₂SO₄ en TB. El revelado se realizó añadiendo 0.1% de peróxido de hidrógeno (30%) a la solución durante un lapso de 1.30 minutos. Finalizada la reacción enzimática, los cortes recibieron 5 lavados de 5 minutos con TB y 2 lavados con PBS. Por ultimo, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados. Al día siguiente se expusieron a concentraciones crecientes de alcohol (30°, 50°, 70°, 95° y 100°) durante 2 minutos y a xilol durante 5 minutos. Se aplicó como medio de montaje DPX y se cubrió los cortes con cubreobjetos para su observación por microscopia de luz.

Los estudios morfométricos utilizados para la inmunomarcación de proteínas de citoesqueleto fue realizado según ha sido descripto anteriormente (Barros y col., 2006). El análisis de la arborización dendrítica empleando MAP2 se llevo a cabo a partir de 5 cortes seriados de cada área por cada animal. Se tomaron entre 2 a 4 campos por hemisferio cerebral, por corte y por animal (de acuerdo al área cerebral en cuestión), a un aumento de 20X. Las imágenes observadas en el microscopio óptico fueron digitalizadas y procesadas con una resolución de 256 niveles de grises por cada pixel. Para evaluar las fibras inmunoreactivas para MAP2 en las neuronas, el área total de las fibras inmunomarcadas se correlaciono con el área total correspondiente a una gradilla de 400x 300 ó 200x 200 µm de lado (la primera para CPF y VTA, la segunda para la región CA1 del HPC), dando como resultado un parámetro de área relativa. Los valores que se muestran para cada análisis representan los promedios de los experimentos realizados para cada edad y grupo experimental en cada área analizada.

III.8- ANALISIS ESTADÍSTICO.

Para cada experimento se emplearon de 4 a 9 crias elegidas al azar de entre 4 a 9 camadas diferentes, a razon de 1 cria por camada para cada condición experimental. Para el experimento de evaluación de distancia anogenital en individuos C y EP, los datos se recolectaron a partir de todos los machos obtenidos de 7 a 10 camadas por condición experimental y se realizaron pruebas estadísticas específicas para evaluar la presencia de algún efecto diferencial debido a que algunos individuos pertenecían a una misma camada (analisis de la varianza, ANOVA, anidado). Como no se hallaron diferencias significativas en este respecto, el análisis se procedió del modo que se detalla

a continuación. El análisis estadístico de todos los datos se realizó empleando los programas estadísticos: SPSS versión 15.0 e INFOSTAT 2011. En todos los casos, se consideró una diferencia estadísticamente significativa para valores de p<0.05. Los resultados se expresaron como medias ± error estándar (EE).

Para el análisis de los datos se utilizaron los diferentes modelos estadísticos paramétricos:

t-student prueba bilateral: para la comparación estadística entre medias de dos muestras independientes. Se empleó para el análisis de datos de los experimentos de: ganancia de peso corporal materno neto, análisis de Indice órgano-somático, diámetro tubular seminífero medio, número de células de Leydig, inmunohistoquímica del receptor de andrógenos, Western blot de receptores y estudios de morfometría neural.

Las diferencias estadísticas significativas entre grupos independientes analizados mediante este modelo estadístico se señalaron con una, dos o tres estrellas de acuerdo al valor de p: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

ANOVA de 2 vías: para la evaluación de los efectos de dos factores fijos y su interacción (por ejemplo "tratamiento prenatal", "edad" y la interacción entre ambos), en el análisis de datos de: peso corporal de las crías, distancia anogenital, RT-PCRq y niveles séricos de LH, testosterona, andrógenos totales y Diol. Cuando la interacción entre factores era positiva, se proseguía mediante *el análisis por efectos simples*. Si la interacción entre factores era no significativa, el análisis de los datos se realizaba mediante *análisis de efectos principales*. Para efectuar comparaciones múltiples de a pares luego del ANOVA se realizó la prueba de <u>Tukey</u> ó de <u>Tukey-Kramer</u> (si los datos no estaban balanceados).

Los efectos dentro y entre factores se señalaron mediante letras. En todos los casos la presencia de letras iguales (intra ó entre factores) indican ausencia de diferencias estadísticas significativas entre grupos,

mientras que la presencia de letras diferentes señalan la presencia de diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

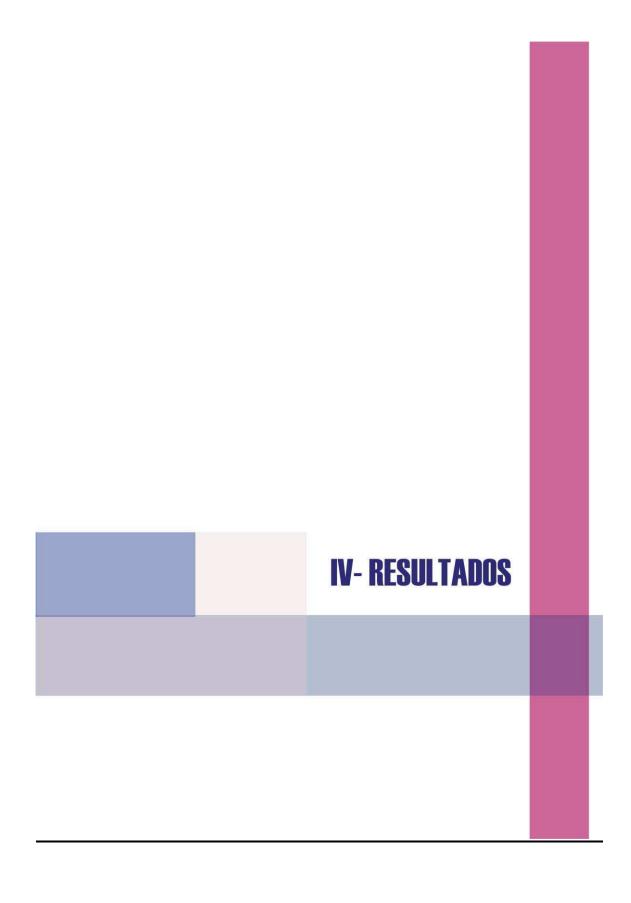
ANOVA DE 3 vías: para la evaluación de los efectos de tres factores fijos y su interacción. El análisis se realizó de forma similar al descripto para ANOVA de 2 vías. Este método estadístico se utilizó para el análisis de los datos de: niveles séricos de prolactina y corticosterona, donde los tres factores fijos fueron "tratamiento prental", "edad" y "condición de estrés agudo".

Como se explicó para ANOVA DE 2 vías, la presencia de letras diferentes señala la existencia de diferencias significativas entre esos grupos (p<0.05).

- ANOVA de Medidas repetidas: para la evaluación de los efectos del factor tiempo en un mismo factor, se empleó para analizar los datos de: ganancia de peso corporal materna diaria durante la gestación y para la evaluación del descenso testicular en las crías.

También se empleó el criterio de letras para señalar la existencia o no de diferencias significativas entre grupos.

En algunos casos, los datos debieron ser transformados con operaciones matemáticas (tales como LOG10 ó raíz cuadrada) para poder cumplir con los supuestos de *normalidad en la distribución de los datos* e *igualdad de varianzas*, necesarios para poder aplicar los métodos estadísticos paramétricos. Para el análisis de datos mediante el método de medidas repetidas, también se chequearon los supuestos de esfericidad y Box-M. Para los datos obtenidos en la asignación de puntajes mediante el criterio de Johnsen, y para los casos en donde no fue posible cumplir con los supuestos paramétricos (niveles de FSH en suero) se aplicó el modelo no paramétrico de Kruskal Wallis, empleando el método de Mann-Whitney *U*-test para comparaciones entre datos de a pares cuando era necesario.



CAPITULO 1

CARACTERIZACION MATERNA Y DE LAS CAMADAS EN EL MODELO DE ESTRES PRENATAL

IV 1.1- EVALUACION DE PARAMETROS MATERNOS Y DE LA CAMADA.

Se estudió la ganancia de peso corporal diaria durante la gestación de hembras preñadas pertenecientes a los grupos C y EP. Los resultados mostraron que las ratas asignadas al tratamiento EP presentaban una marcada disminución en la ganancia de peso corporal diaria al día siguiente del inicio del protocolo de estrés (DG 15) respecto al valor registrado en las ratas C para ese día ($F_{(1,24)}$ =15.67, p=0.025 C vs EP para DG 15), recuperando la ganancia de peso corporal diaria a los valores de las ratas C durante los días subsiguientes (**figura IV.1A**). La evaluación de la ganancia de peso corporal neta al DG 22 mostró que ésta se hallaba reducida en un 30% en el grupo EP en comparación a la ganancia de peso corporal total alcanzada durante la gestación por las ratas C (**figura IV.1B**; $T_{(4)}$ = 2.97, p=0.0413).

A los 35 días post-parto, se evaluaron los niveles en suero basales de prolactina y de corticosterona maternos. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales en las concentraciones séricas basales de ambas hormonas (**tabla IV.1**). De todos modos, una tendencia hacia una menor concentración en los niveles circulantes de prolactina y una mayor concentración de corticosterona fueron registrados en las madres que habían recibido estrés gestacional.

Al momento del nacimiento se evaluaron diferentes parámetros de las camadas. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales en cuanto a la duración de la gestación ni al tamaño de la camada entre individuos. Tampoco se hallaron evidencias de pérdida ó malformaciones de miembros ó tejidos, en ninguna de las crías recién nacidas (tabla IV.2).

Como puede observarse en la **tabla IV.3**, la ganancia de peso de las crías de ambos grupos experimentales aumenta conforme a la edad ($F_{(2,29)}$ =3931.31, p<0.001 para factor edad). Sin embargo al DPN 28 los machos EP presentaban

una disminución del 21.5% en el peso corporal respecto al observado en los machos pertenecientes al grupo C ($F_{(1,29)}$ =9.11, p=0.0054 para factor tratamiento prenatal).

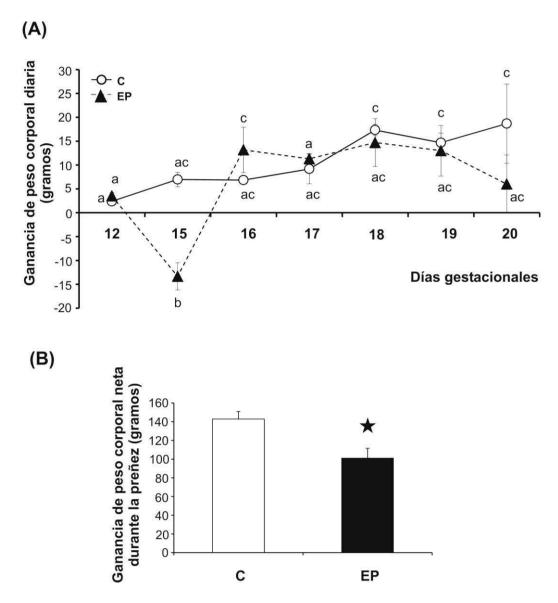


Figura IV.1- Ganancia corporal diaria (A) y neta (B) obtenida durante el transcurso de la gestación en hembras preñadas control (C) ó estrés (EP).

(A) Los puntos representan la media de la ganancia corporal diaria ± EE. Se obtuvieron diferencias significativas debidas a los efectos de los factores: día gestacional, tratamiento experimental aplicado e interacción entre los mismos. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=3; ANOVA de medidas repetidas- Tukey). (B) Las barras representan la media de la ganancia corporal neta durante la preñez ± EE. La estrella señala la presencia de diferencias estadísticas significativas entre tratamientos experimentales. (n=3; p<0,05; prueba *t*-student).

HORMONAS MATERNAS	PROLACTINA	0.4 ± 0.25 (4)	0.2 ± 0.12 (6)
(ng/ml de suero)	CORTICOSTERONA	179.4 ± 16.77 (4)	201.9 ± 8.54 (4)

Tabla IV.1- Concentraciones en suero de prolactina y corticosterona de madres a los 35 días posteriores al parto. El número entre paréntesis indica el número de madres utilizadas para el análisis de los diferentes parámetros.

PARAMETRO EVALUADO		CONTROL	ESTRES PRENATAL
DURACION DE LA GESTACION (días)		22.6 ± 0.4 (5)	22.6 ± 0.37 (5)
TAMAÑO DE LA CAMADA	N° CRIAS TOTALES	11.6 ± 0.81 (5)	12.2 ± 1.07 (5)
	N° CRIAS MACHO	6.6 ± 0.68 (5)	6 ± 0.71 (5)
	N° CRIAS HEMBRA	4.8 ± 0.73 (5)	6.2 ± 0.7 (5)

Tabla IV.2- Características de la camada. El número entre paréntesis indica el número de camadas utilizadas para el análisis de los diferentes parámetros.

PESO CORPORAL	CONTROL	ESTRES PRENATAL	
DPN 1	6.83 ± 0.16 ^a	6.33 ± 0.09 ^a	
DPN 28	73.57 ± 1.44 ^b	57.75 ± 1.49 ^c	
DPN 75	354.83 ± 6.05 ^d	343.33 ± 2.323 ^d	

Tabla IV.3- Peso corporal de las crías macho pertenecientes a ambos grupos experimentales, evaluado a diferentes edades. DPN= días postnatales. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas debidas a los efectos del factor edad y al factor tratamiento prenatal. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=6; ANOVA de 2 vías- Tukey).

IV 1.2- RESPUESTA AL ESTRES AGUDO DE LA DESCENDENCIA.

La respuesta al estrés inducida por una sesión de estrés por inmovilización a ratas prepuberales y adultas (C y EP) y la recuperación al mismo fueron evaluadas mediante el análisis de los niveles de prolactina y corticosterona presentes en suero. Los resultados se compararon con los niveles séricos de hormonas en condiciones basales (ratas que no fueron expuestas al estrés).

IV 1.2.1- Niveles séricos de prolactina.

Como puede observarse en la figura IV.2, los resultados obtenidos en la liberación de la prolactina tras aplicarse una sesión de estrés por inmovilización mostraron variaciones de acuerdo a la edad de los individuos en la cual se analizaban los datos y al tratamiento prenatal al cual éstos pertenecían. En individuos de 28 días de vida, el patrón de liberación de prolactina frente a un estrés agudo y frente a un estrés seguido de dos horas de recuperación fue similar entre individuos C y EP: el estrés agudo indujo un incremento transitorio en los niveles de prolactina en los individuos pertenecientes a ambos grupos experimentales. Luego de dos horas de recuperación al estrés las concentraciones de la hormona se reestablecían a los valores hallados en condiciones basales ($F_{(2.60)}$ = 3.4, p<0.05 factor tratamiento postnatal para C, DPN 28 y $F_{(2.60)}$ = 4.43, p<0.005 factor tratamiento postnatal para EP, DPN 28). A los 75 días el perfil de liberación de prolactina frente a un estrés agudo y el perfil de restitución de los niveles hormonales hacia las concentraciones basales tras dos horas de recuperación al estrés en las ratas C era similar al descripto en las ratas prepuberales ($F_{(2.60)}$ = 24.1, p<0.001 factor tratamiento postnatal para C, DPN 75). Sin embargo, en los machos EP adultos se observó que éstos presentaban un incremento del 53% en las concentraciones basales de prolactina en relación a los valores registrados en las ratas C de la misma edad. Además, tras aplicar una sesión de estrés agudo las concentraciones de prolactina disminuyeron por debajo de los valores basales registrados en los individuos prenatalmente estresados. Por otra parte, los niveles de prolactina en individuos EP expuestos al estrés agudo no pudieron reestablecerse a los valores basales luego de las dos horas de reposo al estrés (F_(2,60)= 6.5, p<0.001 factor tratamiento postnatal para EP, DPN 75; $F_{(1.60)}$ = 4.54, p<0.05

factor tratamiento prenatal para BASAL, DPN 75; $F_{(1,60)}$ = 39.49, p<0.001 factor tratamiento prenatal para ESTRÉS AGUDO, DPN 75).

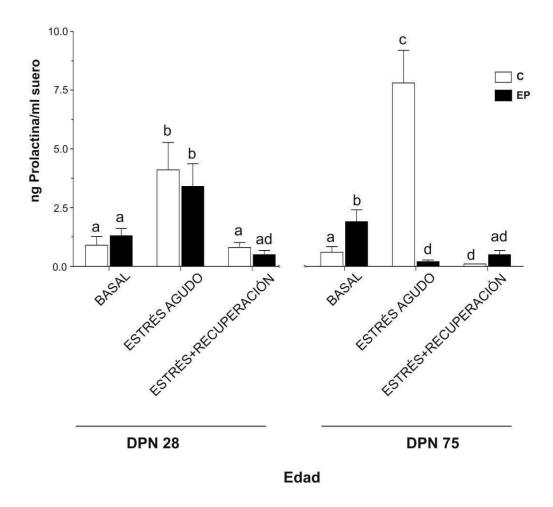


Figura IV.2- Efecto del estrés prenatal (EP) sobre la liberación de prolactina en suero de ratas prepuberales y adultas como consecuencia de la exposición a un estrés agudo. C= control; DPN= día postnatal. Las barras indican la media de los niveles séricos de prolactina (ng/ml) por grupo experimental ± EE. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas debidas a los efectos del factor edad, al factor tratamiento prenatal, al factor tratamiento postnatal y a la interacción entre los tres factores. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=6; ANOVA de 3 vías-Tukey).

IV 1.2.2- Niveles séricos de corticosterona.

A los 28 días, el patrón de respuesta de liberación de corticosterona en suero frente a una sesión de estrés agudo por inmovilización y su recuperación fue similar en crías C y EP (figura IV.3): frente a un estrés agudo los niveles séricos de corticosterona se incrementaban, restituyéndose concentraciones a los niveles basales tras dos horas de recuperación al estrés $(F_{(2.60)} = 10.53, p < 0.001 factor tratamiento postnatal para C, DPN 28; <math>F_{(2.60)} =$ 38.72, p<0.001 factor tratamiento postnatal para EP, DPN 28). No obstante en los individuos EP, la restitución en los niveles de corticosterona se produjo incluso por debajo de los registrados en condiciones basales, a diferencia de lo ocurrido en las ratas C (F_(1.60)= 21.66, p<0.001 factor tratamiento prenatal para ESTRÉS+RECUPERACIÓN, DPN 28).

A los 75 DPN, el patrón de liberación de corticosterona debida al estrés fue similar al observado en ratas prepuberales, tanto C como EP: la sesión de estrés agudo indujo un incremento en la liberación de corticosterona en ratas pertenecientes а ambos experimentales, retornando grupos concentraciones a los valores registrados en condiciones basales, luego de dos horas de recuperación ($F_{(2.60)}$ = 40.76, p<0.001 factor tratamiento postnatal para C, DPN 75; y $F_{(2,60)}$ = 23.83, p<0.001 factor tratamiento postnatal para EP, DPN 75). El incremento observado en la liberación de corticosterona tras un estrés agudo en individuos adultos fue mayor que el observado en ratas de 28 días: las concentraciones de corticosterona aumentaron un 26% en individuos C y un 19% en ratas EP ($F_{(1.60)}$ = 10.14, p<0.01 factor edad para C, ESTRÉS AGUDO; y $F_{(1,60)}$ = 5.42, p<0.05 factor edad para EP, ESTRÉS AGUDO).

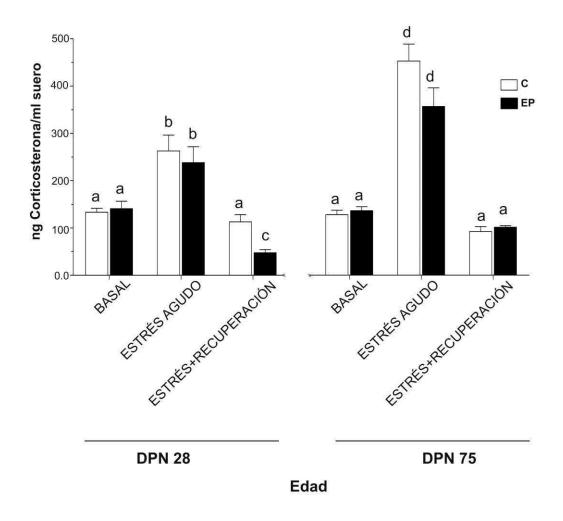


Figura IV.3- Efecto del estrés prenatal (EP) sobre la liberación y recuperación de corticosterona en suero de ratas prepuberales y adultas como consecuencia de la exposición a un estrés agudo. C=control; DPN= día postnatal. Las barras indican la media de los niveles de corticosterona en suero por grupo experimental ± EE. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas debidas a los efectos del factor edad, al factor tratamiento prenatal, al factor tratamiento postnatal y a la interacción entre los tres factores. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=6; ANOVA de 3 vías- Tukey).

CAPITULO 2

ESTRÉS PRENATAL Y EL EJE HIPÓFISO-TESTICULAR DE LA DESCENDENCIA

IV 2.1- EVALUACION DE PARAMETROS DEL DESARROLLO SEXUAL DE LAS CRIAS.

La distancia anogenital de individuos C y EP fue evaluada a los DPN 1 y 21. Para ambas edades se observó que las ratas EP presentaban una menor distancia anogenital en comparación a la observada en las ratas C (**figura IV.4A**; $F_{(1,114)}=18.75$, p<0.001 para factor tratamiento prenatal).

Por otra parte, el análisis del descenso testicular estudiado a partir del día 21 postnatal reveló que los individuos EP presentaban un retraso en dicho evento en relación a lo observado en las ratas C (**figura IV.4B**): al DPN 21 el 42% de las ratas C evaluadas ya habían completado el descenso de sus testículos dentro de la bolsa del escroto, mientras que lo mismo pudo evidenciarse sólo en el 3% de las ratas EP analizadas a la misma edad ($F_{(1,7)}$ = 6.582, p<0.05 para factor prenatal en DPN 21). Al DPN 23, la mayoría de las ratas pertenecientes al grupo C evaluadas habían completado el descenso testicular, mientras que las ratas EP recién pudieron alcanzarlo dos días después (DPN 25, $F_{(4,28)}$ =18.13, p<0.005 para factor edad en grupo EP).

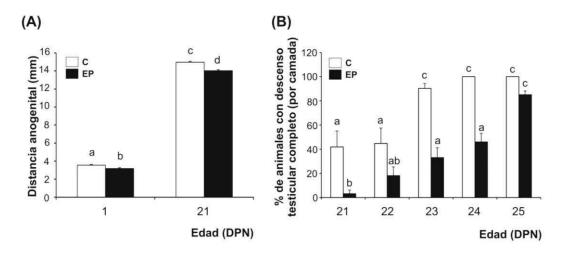


Figura IV.4- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre parámetros del desarrollo sexual en las crías macho. C=control; DPN= día postnatal. A) Las barras representan la media de la distancia anogenital ± EE. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad y al factor tratamiento prenatal. Los grupos sin letras en común son significativamente

diferentes entre sí con p<0.05 (n=48 a 67 individuos por grupo; ANOVA de 2 vías- Tukey). **B)** Los valores representan el porcentaje promedio de ratas por camada con descenso testicular completo dentro de la bolsa del escroto ± EE. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad, al factor tratamiento prenatal y al factor interacción. Letras diferentes indican p<0.05 (n=5 camadas analizadas por grupo; ANOVA de medidas repetidas-Tukey).

IV 2.2- EVALUACION DE NIVELES SERICOS DE HORMONAS DEL EJE HIPOFISARIO-TESTICULAR.

IV 2.2.1- Gonadotrofinas.

Las concentraciones séricas de FSH en las ratas C presentaron el perfil normal de la hormona: se registraron altos niveles durante la prepubertad (DPN 28) que luego disminuían hasta alcanzar los niveles fisiológicos normales en ratas adultas al DPN 75 (H=15.64, p=0.0035 para factor edad en C). En las ratas EP de 28 días, los niveles de FSH obtenidos en suero se encontraron disminuidos en comparación a los valores registrados en las ratas C de la misma edad y dicha reducción se mantuvo en las demás edades evaluadas en sueros de ratas EP (figura IV.5A; H= 7.37, p= 0.0047 para C vs EP, DPN 28).

Las concentraciones en suero de LH en las ratas C permanecieron prácticamente constantes en las edades evaluadas, registrándose una caída hacia el DPN 60, restituyéndose los niveles hacia el DPN 75. En cambio, las ratas EP presentaban una reducción del 80% en las concentraciones de LH al DPN 28 y del 55.4% al DPN 75, en comparación a las concentraciones de hormona observadas en individuos C para las mismas edades (**figura IV.5B**; $F_{(1.51)}$ =25.43, p<0.001 para DPN 28 y $F_{(1.51)}$ =8.66 p<0.001 para DPN 75).

IV 2.2.2- Andrógenos testiculares.

El análisis de las concentraciones séricas de andrógenos totales en ratas C a diferentes edades, reveló que el perfil hormonal alcanzaba un pico hacia el DPN 60 que luego descendía hacia el DPN 75. Si bien las ratas EP presentaron un perfil de andrógenos totales similar al descripto para ratas C, los niveles registrados fueron significativamente mayores que los hallados en ratas controles (**figura IV.6A**; $F_{(1,32)=}46.89$, p<0.001 para factor tratamiento prenatal). Sin embargo al analizarse las concentraciones de testosterona

mediante un método más específico se observó que a los 75 DPN, los niveles de la hormona en suero de ratas estresadas prenatalmente estaban disminuidos en un 74% en comparación a los valores observados en ratas C (**figura IV.6B**; $F_{(1,54)}$ =10.59, p<0.001 para C vs EP para DPN 75). Por ultimo se analizaron las concentraciones séricas de Diol. Los resultados mostraron que las concentraciones de la hormona en suero de ratas C aumentaban alcanzando un pico en el DPN 35 y luego disminuían hasta alcanzar los valores fisiológicos normales en crías adultas. En ratas EP sin embargo, las concentraciones de Diol se hallaron significativamente aumentadas un 61.5% en ratas de 28 días de edad (en comparación a los valores observados de Diol en sueros de crías C), alcanzando un pico máximo a los 45 días de edad (**figura IV.6C**; $F_{(1,56)}$ =17.02, p<0.001 para DPN 28 y $F_{(1,56)}$ =35.68, p<0.001 para DPN 45, C vs EP).

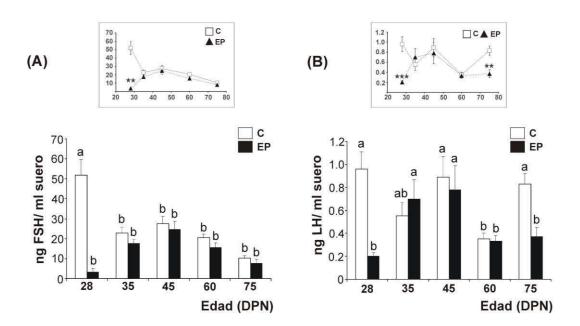


Figura IV.5- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre los niveles séricos de gonadotrofinas. C=control; DPN= día postnatal. Las barras representan la media de los ng/ml de suero de la hormona folículo estimulante (FSH) (A) y luteinizante (LH) (B) ± EE. Para FSH se obtuvieron diferencias estadísticas debidas al factor edad y debidas al factor tratamiento prenatal. Para LH se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en los factores edad, tratamiento prenatal y en la interacción de los mismos. Los insertos muestran los mismos resultados pero expresados como gráficos de perfiles con el objetivo de aportar una mayor claridad a la comprensión de los mismos. Las

estrellas señalan la presencia de diferencias estadísticas significativas exclusivamente entre grupos C y EP para una misma edad (**p<0.01; ***p<0.001). Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n= 6-7; para FSH: Kruskal Wallis; para LH: ANOVA de 2 vías- Tukey).

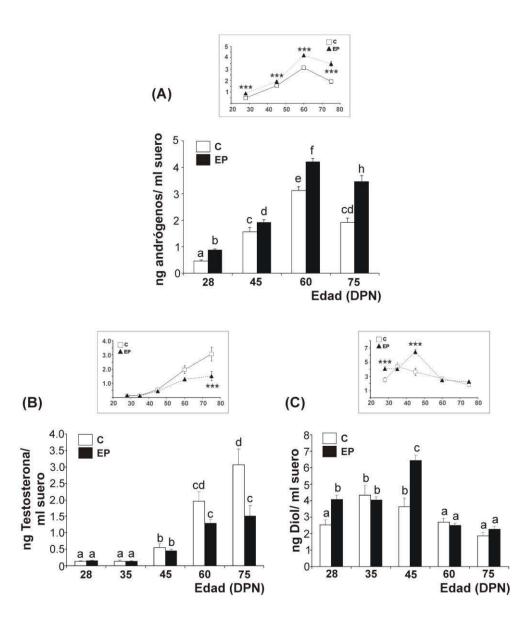


Figura IV.6- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre los niveles séricos de andrógenos testiculares en las crías. Andrógenos totales= testosterona +DHT; C= control; DPN= día postnatal. Las barras representan la media de los ng/ml de suero de andrógenos totales (A); testosterona (B); ó 5α, 3α 17β androstanediol (Diol) (C) ± EE. Para andrógenos totales se obtuvieron diferencias estadísticas debidas al factor edad y debidas al factor tratamiento prenatal. Para las otras dos hormonas se obtuvieron diferencias estadísticas

significativas en los factores edad, tratamiento prenatal y en la interacción de los mismos. En los insertos se muestran los mismos resultados pero expresados como gráficos de perfiles con el objetivo de aportar una mayor claridad a la comprensión de los mismos. Las estrellas señalan la presencia de diferencias estadísticas significativas exclusivamente entre grupos C y EP para la misma edad (***p<0.001). Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n= 5-9; ANOVA de 2 vías-Tukey).

IV 2.3- HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR DE LA DESCENDENCIA.

El análisis de cortes histológicos de testículo de ratas C y EP de 28, 35 y 60 DPN, teñidos con hematoxilina-eosina no mostró diferencias en la histología testicular general entre grupos: en todos los casos se observó la túnica albugínea cubriendo todo el perímetro del tejido compuesto por los túbulos seminíferos y el espacio intersticial entre éstos. No se evidenciaron malformaciones ni anormalidades respecto a la forma y características de las células del epitelio germinal de los túbulos seminíferos ni en las células propias del intersticio.

A los 28 días de edad no se hallaron diferencias estadísticas significativas entre grupos C y EP, en ninguno de los parámetros de histomorfometría testicular evaluados. Ambos grupos experimentales presentaban túbulos seminíferos normales poco desarrollados: la mayoría de ellos aún obstruidos y con estadios espermáticos del epitelio seminífero poco diferenciados. Sin embargo, el análisis de la maduración espermática en el epitelio seminífero de ratas de 35 DPN y adultas mostró que en las ratas EP existía un adelantamiento en la maduración de la serie espermática en comparación a lo que se observaba en individuos C de las mismas edades. Empleando el criterio de Johnsen se analizaron los estadios presentes en la última capa del epitelio germinal de los túbulos seminíferos de ratas de 35 días (figura IV.7A). Los estadios preponderantes en las ratas C eran de espermatocito meiótico (puntaje= 4) y de espermátida inmadura o redondeada (puntaje= 5); mientras que en los epitelios seminíferos de las ratas EP los estadios preponderantes eran los de espermátida redondeada en estados más avanzados de maduración (comenzando a elongarse, puntaje= 6) y de espermátide madura o

elongada (puntaje= 7) (H=313.24; p<0.001 para DPN 35). El promedio de puntajes se muestran en la **figura IV.7B**

A PUNTOS 5 PUNTOS 6 PUNTOS 7 PUNTOS (B)

Figura IV.7- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la histología testicular en ratas de 35 días postnatales (DPN). (A) Las imágenes pertenecen a cortes histológicos de testículos teñidos con hematoxilina-eosina, mostrando en detalle cortes transversales de túbulos seminíferos de ratas C (control) ó EP (aumento 40X, la barra negra de calibración señala 50μm). Las flechas indican el estadio de la última capa del epitelio germinal del túbulo seminífero considerada para asignar el puntaje según el criterio de Johnsen: 4= espermatocitos I; 5= presencia de espermátides inmaduras y espermatocitos I; 6= espermátidas inmaduras presentes en transición a maduras; 7= presencia de espermátidas elongadas. (B) Las barras muestran el promedio de puntajes obtenidos en cada grupo experimental ± EE. Las estrellas señalan p<0.001 (n=4; Kruskal Wallis).

C

EP

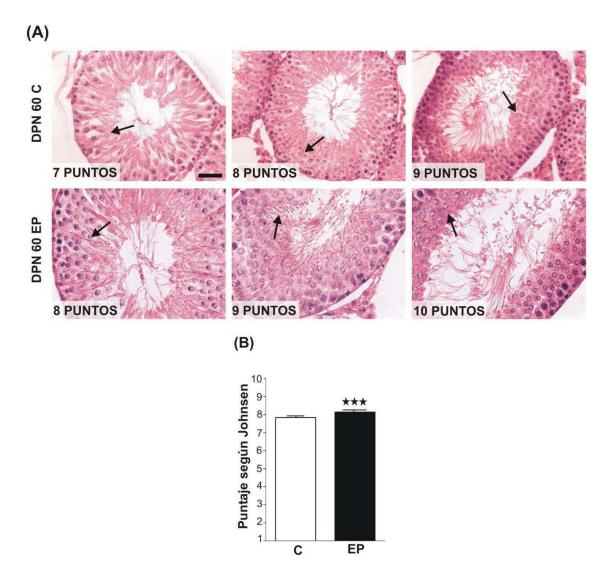


Figura IV.8- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la histología testicular en ratas de 60 días postnatales (DPN). (A) Las imágenes pertenecen a cortes histológicos de testículos teñidos con hematoxilina-eosina, mostrando en detalle cortes transversales de túbulos seminíferos de ratas C (control) ó EP (aumento 40X, la barra negra de calibración señala 50μm). Las flechas indican el estadio de la última capa del epitelio germinal del túbulo seminífero considerada para asignar el puntaje según el criterio de Johnsen: 7=presencia de espermátidas elongadas; 8=pocos espermatozoides presentes; 9=espermatozoides presentes con espermatogénesis desorganizada; 10= espermatogénesis completa. (B) Las barras muestran el promedio de puntajes obtenidos en cada grupo experimental ± EE. Las estrellas señalan p<0.001 (n=4; Kruskal Wallis).

La **figura IV.8** muestra la maduración del epitelio germinal para ratas de 60 días: en las ratas pertenecientes al grupo C se observaron estadios de la espermatogénesis que abarcaban desde la presencia de espermátida madura

o elongada hasta la presencia de espermatozoides con el epitelio seminífero desorganizado (puntajes de 7 a 9 **figura IV.8A**). Sin embargo en las ratas EP no se hallaron estadios de espermátide elongada y sí se encontraron estadios de epitelio seminífero completo (puntajes de 8 a 10 **figura IV.8B**) (H=17.66, p<0.001 para DPN 60).

Coincidiendo con los hallazgos observados en cuanto a la maduración del epitelio germinal, el análisis del diámetro tubular medio de túbulos seminíferos en ratas de 35 días mostró que éste era mayor en las ratas EP en comparación al valor obtenido en las crías C (**figura IV.9**; T₍₆₎=25.82; p<0.001). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre grupos C y EP en el diámetro tubular medio de los túbulos seminíferos en crías de 60 días de edad.

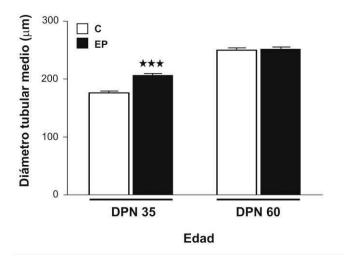


Figura IV.9- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre el diámetro tubular medio de túbulos seminíferos testiculares en ratas de 35 y 60 días. C= control; DPN= día postnatal. Las barras señalan el diámetro tubular medio \pm EE. Las estrellas indican la existencia de diferencias estadísticas significativas en el diámetro tubular medio entre ratas C y EP de 35 DPN (n=4; ***p< 0.001; prueba t-student).

Finalmente, la cuantificación del número de células de Leydig por cm³ de testículo mediante la ecuación de Floderus demostró que las ratas EP de 35 y 60 días de vida poseían menos células/cm³ de testículo en comparación a los valores hallados en ratas C de la misma edad (**Tabla IV.4**; $T_{(4)}$ = 5.75, p<0.01 para DPN 35; y $T_{(4)}$ = 3.69 p<0.05 para DPN 60).

	С	EP
DPN 35	2.7 ± 0.24	1.62 ± 0.21**
DPN 60	1.44 ± 0.15	1.18 ± 0.18*

Tabla IV.4- Efecto del estrés prenatal sobre el número de células de Leydig. Los valores fueron calculados mediante el uso de la ecuación de Floderus y representan la media del número de células de Leydig/cm³ x 10⁷ (n=3; prueba *t*-student).

IV 2.4- EVALUACION DE RECEPTORES Y ENZIMAS TESTICULARES

IV 2.4.1- Expresión del AR en testículo.

IV 2.4.1- a) Expresión proteica del AR en testículo mediante Western blot.

Con el objetivo de estudiar la expresión del AR en testículo se realizó un análisis de la expresión proteica en homogeneizados de testículos de crías de 28, 35 y 60 días, C y EP, mediante la técnica de Western blot. El anticuerpo anti-AR marcó una banda de proteína de 110 kilodaltons (kDa) de peso molecular, correspondiente al peso molecular del receptor AR. Dicha banda pudo visualizarse en extractos testiculares de ratas pertenecientes a ambos grupos experimentales y en todas las edades evaluadas (figura IV.10A). Sin embargo solo se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales para ratas de 60 días, donde la expresión proteica del receptor estaba reducida en un 42% respecto a la expresión alcanzada por los individuos C de la misma edad (figura V.11; T₍₆₎= 3.02, p= 0.0235).

IV 2.4.1-b) Inmunohistoquímica del AR en testículo.

La inmunomarcación del AR fue evaluada en testículos de ratas C y EP de 35 y 60 días de vida. En ambas edades y en ambos grupos experimentales, se registraron marcas inmunopositivas para el receptor en los núcleos de las células de Leydig, mioides peritubulares y de Sertoli (**figuras IV.11**). En ratas de 35 días, se observó que el estrés maternal indujo un aumento del 145% en el número de células de Sertoli inmunopositivas para el AR en comparación al número hallado en las ratas C (**figura IV.11B vs figura IV.11C**; T₍₇₎=4.43, p=0.0214). En las crías de 60 días no se observaron diferencias estadísticas

significativas en la inmunomarcación positiva del AR registrada en los distintos tipos celulares entre ratas C y EP (**figura IV.11A**).

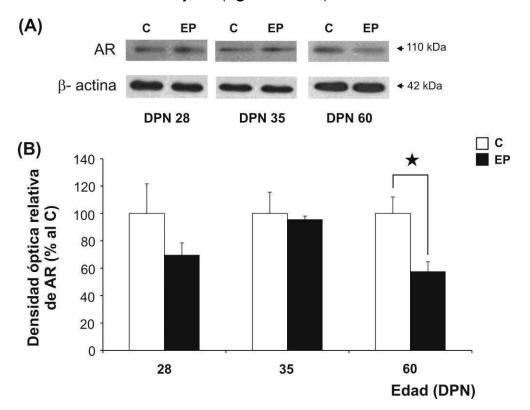


Figura IV.10- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión del receptor de andrógenos (AR) en homogeneizado total de testículos de ratas de 28, 35 y 60 días postnatales (DPN). C= control. (A) imagen de inmunoblot representativos para el AR en crías C y EP a distintas edades. La banda inmunoreactiva para el AR migró hacia los 110 kDa. La expresión de actina indica la existencia de carga de proteína uniforme en cada una de las calles. (B) Las barras muestran el promedio de la densidad óptica correspondiente a cada banda de proteína obtenida por tratamiento experimental y edad, expresada como cantidad del AR normalizado por la densidad óptica de actina ± EE. Con el objetivo de expresar con mayor claridad los valores, los números se expresan como porcentaje al valor del control para cada edad (n=3- 4 ratas por grupo; *p<0.05; prueba t-student).

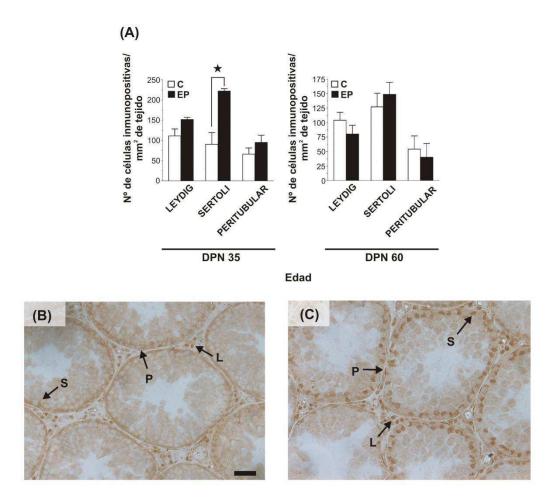


Figura IV.11- Efecto del estrés prenatal (EP) sobre el número de células inmunopositivas para receptor de andrógenos en testículos de ratas de 35 y 60 días de vida. C= control; DPN= día postnatal; L= células de Leydig; P= células mioides peritubulares; S= células de Sertoli. (A) Número de células (Sertoli, Leydig ó mioides peritubulares) con marca inmunopositiva para el AR por mm² de testículo. Los valores están señalados como media ± EE. La estrella representa la existencia de diferencias estadísticas significativas entre ratas C y EP (n=4-5; *p<0.05; prueba *t*- student). (B) y (C) Las fotos muestran un ejemplo de la inmunomarcación observada para el AR en testículos de ratas de 35 días de edad C (A) y EP (B). Se registraron marcas positivas para el AR en células de Leydig, Sertoli y mioides peritubulares (señaladas mediante flechas). La barra de calibración indica 50μm.

IV 2.4.2- <u>Niveles de expresión de ARNm del *Ar*, del *Esr1* y del *Esr2* mediante RT-qPCR.</u>

IV2.4.2- a) Expresión génica del Ar.

Se analizó la expresión génica del Ar en homogeneizados de testículos de crías de 28 y 75, C y EP. A los 28 días de vida las ratas EP mostraron un incremento del 75% en la expresión génica del receptor en relación a lo observado en ratas C de la misma edad. No obstante los niveles de ARNm del receptor de crías EP disminuyeron a los 75 días de vida, siendo similares a los valores obtenidos en las ratas C (**figura IV.12**; $F_{(1,15)}$ = 4.54, p<0.05 para C vs EP a los 28 DPN y $F_{(1,15)}$ = 18.8, p<0.001 para factor edad en ratas EP).

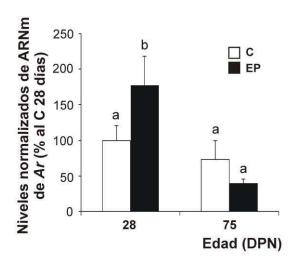


Figura IV.12- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión del ARNm del receptor de andrógenos en homogeneizado de testículos de ratas de 28 y 75 días de vida. C=control; DPN= día postnatal. Los niveles de ARNm determinados mediante RT-qPCR, fueron normalizados a la expresión del gen reportero β -2 microglobulina. Los valores se expresan como unidades arbitrarias y con el objetivo de facilitar la interpretación de los mismos, los datos se expresan como porcentaje al valor alcanzado por los ratas C de 28 días de vida. Las barras representan los valores medios de los niveles del ARNm del $Ar \pm EE$. Se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad, factor tratamiento prenatal y al factor interacción. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=4-5; ANOVA 2 vías- Tukey).

IV 2.4.2- b) Expresión génica del Esr1 y el Esr2.

La expresión génica de ambos receptores de estrógenos fue evaluada en homogeneizados de testículos de crías C y EP de 28 y 75 días de vida (**figura IV. 13**). Para el caso del *Esr1*, se observó un incremento en la expresión génica del receptor en ratas adultas pertenecientes a ambos tratamientos experimentales, en relación a los valores obtenidos por crías C y EP de 28 DPN (F_(1,15)=270.48; p<0.001 para factor edad). No se hallaron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales para la expresión génica del receptor en ninguna de las dos edades evaluadas. En cuanto a la expresión génica del *Esr2*, tampoco se hallaron cambios entre individuos de diferentes tratamientos experimentales, ni entre ratas de 28 y 75 días.

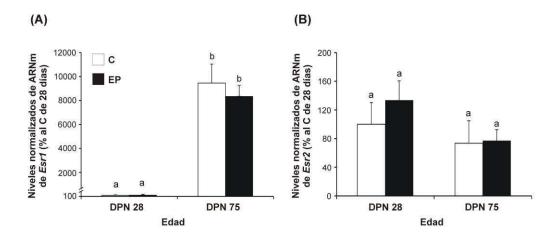


Figura IV.14- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión del ARNm del *Esr1* (A) y *Esr2* (B) en homogeneizado de testículos de ratas de 28 y 75 días de vida. C=control; DPN= día postnatal. Los niveles de ARNm determinados mediante RT-qPCR, fueron normalizados a la expresión del gen reportero β-2 microglobulina. Los valores se expresan como unidades arbitrarias y con el objetivo de facilitar la interpretación de los mismos, los datos se expresan como porcentaje al valor alcanzado por los ratas C de 28 días de vida. Las barras representan los valores medios de los niveles del ARNm de ambas isoformas para el receptor de estrógenos ± EE. Se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad, sólo para el *Esr1*. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=3-6; ANOVA 2 vías).

IV 2.4.3- Expresión génica de las enzimas esteroideogénicas *Srd5a1*, *Srd5a2* y *Cyp19* mediante RT-qPCR.

Se evaluó la expresión génica de las tres enzimas en homogeneizados de testículos pertenecientes a ratas C y EP de 28 y 75 días. Solamente los niveles de ARNm de la enzima Srd5a1 fueron afectados como consecuencia del estrés prenatal: a los DPN 28, los niveles de expresión génica de la enzima fueron un 283% mayores en testículos de crías EP, comparado con lo observado en ratas C. A los 75 DPN los niveles de ARNm de la enzima disminuyeron significativamente en ratas pertenecientes a ambos grupos experimentales en relación a los valores registrados a los 28 días, sin registrarse diferencias estadísticas entre tratamientos para esa edad (**figura IV.15A**; $F_{(1,16)}$ =288, p<0.001 C vs EP para DPN 28; $F_{(1,16)}$ = 10.8, p<0.01 para factor edad en C; $F_{(1,16)}$ =512.15, p<0.001 para factor edad en ratas EP).

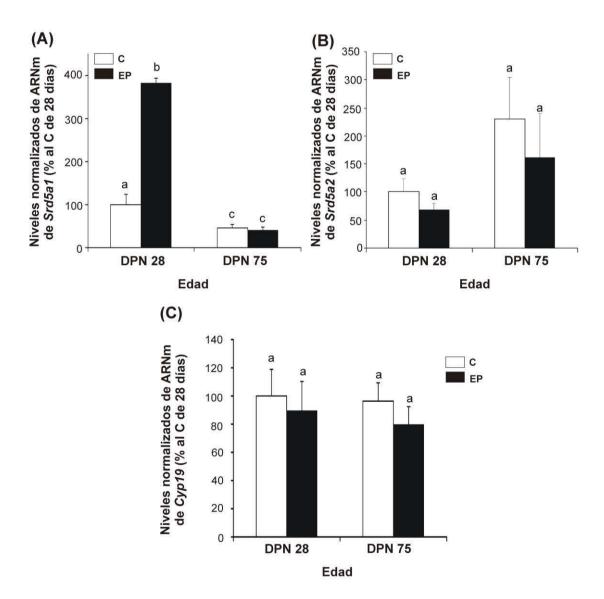


Figura IV.15- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión del ARNm de la enzima *Srd5a1* (A), *Srd5a2* (B) y *Cyp19* (C) en homogeneizado de testículo de ratas de 28 y 75 días de vida. C=control; DPN= día postnatal. Los niveles de ARNm determinados mediante RT-qPCR, fueron normalizados a la expresión del gen reportero β-2 microglobulina. Los valores se expresan en unidades arbitrarias, como porcentaje del valor alcanzado por los ratas C de 28 días de vida. Las barras representan los valores medios de los niveles del ARNm de cada enzima ± EE. Se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad, debidas al factor tratamiento prenatal y al factor interacción solamente para *Srd5a1*. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=5-6; ANOVA 2 vías, Tukey).

CAPITULO 3

ESTRES PRENATAL Y SISTEMA DOPAMINERGICO MESOCORTICO-LIMBICO EN RATAS PREPUBERALES Y ADULTAS.

IV 3.1- EVALUACION DE RECEPTORES DOPAMINERGICOS Y A HORMONAS SEXUALES EN AREAS MESOCORTICO-LIMBICAS

IV 3.1.1- Expresión proteica del D2R.

La expresión del D2R se evaluó en homogeneizados de diferentes áreas cerebrales pertenecientes al sistema DA mesolímbico cortical de ratas C y EP, a los 28 y 75 DPN. Como se observa en la **figura IV.16** solamente se observaron cambios entre grupos experimentales en la expresión proteica del D2R en HPC y VTA a los 28 días: el estrés prenatal indujo una disminución del 51.41% en los niveles proteicos del D2R en HPC ($T_{(4)}$ =2,67; p<0.05), mientras que en la región del VTA produjo un aumento del 91.32% ($T_{(4)}$ =-2,98; p=0.0406) en la expresión proteica del D2R en comparación a lo observado en los ratas C de la misma edad. A los 75 DPN no se registraron cambios en los niveles del D2R en ninguna de las áreas cerebrales analizadas entre grupos experimentales.

IV 3.1.2- Expresión del AR.

Se analizó la expresión génica y proteica del AR en homogeneizados de áreas cerebrales pertenecientes al sistema DA mesocortico-límbico de ratas C y EP de 28 y 75 días. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión proteica del receptor AR entre grupos experimentales evaluados, en ninguna de las áreas examinadas (**figura IV.17A**). Respecto a la expresión génica del Ar, no se encontraron efectos debidos a la edad ó al tratamiento prenatal aplicado sobre la expresión génica del receptor en CPF (**figura IV.17B**). En HPC de ratas C se observó que al DPN 75 la expresión del AR se incrementó en un 117.6% respecto a lo hallado en crías prepuberales pertenecientes al mismo grupo experimental ($F_{(1,16)}$ =8, p=0.0121 28 vs 75 para C). Sin embargo, dicho aumento no se produjo en HPC de individuos adultos

EP. Estos mantenían niveles de ARNm del *Ar* similares a los hallados al DPN 28 (**figura IV.17C**).

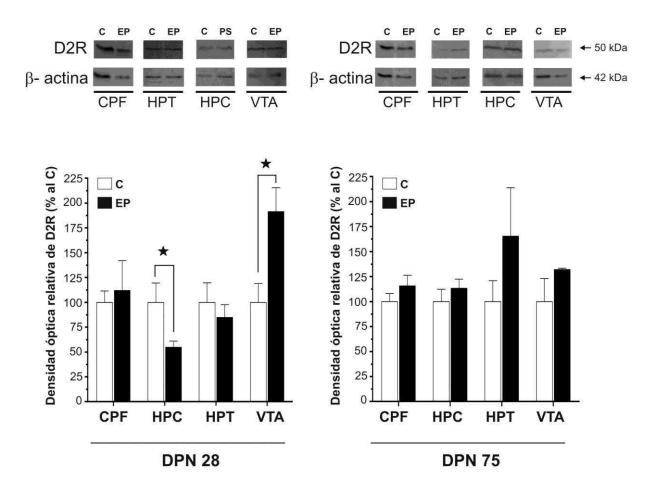


Figura IV.16- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión del receptor de dopamina de tipo D2 (D2R) en homogeneizado total de áreas cerebrales de ratas de 28 y 75 días post-natales (DPN). C= control; CPF= corteza prefrontal; HPC= hipocampo; HPT= hipotálamo; VTA= área tegmental ventral. Las imágenes pertenecen a inmunoblot representativos para el D2R en cada una de las áreas especificadas de ratas pertenecientes a cada grupo experimental evaluado. Para el D2R, la banda inmunoreactiva migró hacia los 50 kDa. La expresión de actina indica la existencia de carga uniforme de proteína en cada calle. Los diagramas de barras muestran el promedio de la densidad óptica correspondiente a cada banda de proteína (expresada como densidad óptica del D2R relativa a la densidad óptica de actina) ± EE. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido en cada control correspondiente. Las estrellas señalan la presencia de diferencias estadísticas entre grupos experimentales para dicha edad (n=3- 4; *p<0.05); prueba t-student).

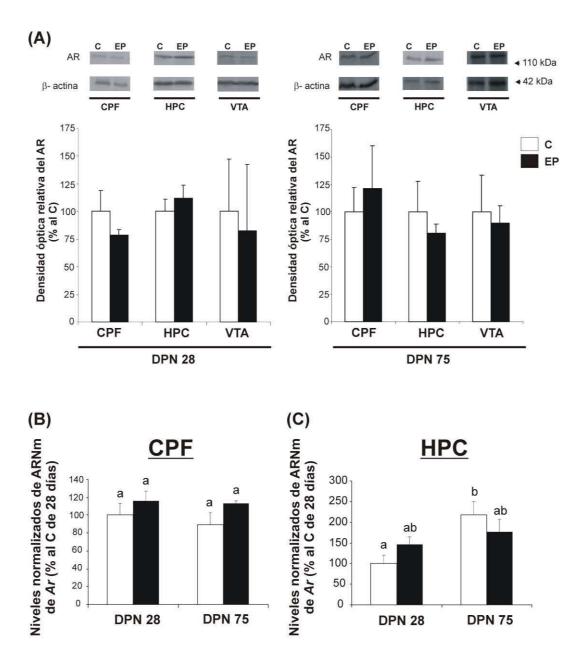


Figura IV.17- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión proteica (A) y génica (B, C) del receptor de andrógenos (AR) en homogeneizado total de áreas cerebrales de ratas de 28 y 75 días post-natales (DPN). C= control; CPF= corteza prefrontal; HPC= hipocampo; VTA= área tegmental ventral. (A) Se muestran imágenes de los inmunoblot representativas para el AR en cada una de las áreas especificadas. La banda inmunoreactiva para el AR migró hacia los 110 kDa. La expresión de la actina muestra la existencia de carga proteica uniforme en cada calle. Los diagramas de barras representan el promedio de la densidad óptica correspondiente a cada banda de proteína (expresada como densidad óptica del AR relativa a la densidad óptica de actina) ± EE. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido a

cada control correspondiente, (n=3-4; prueba *t*-student). **(B y C)** Niveles de ARNm de *Ar* determinados mediante RT-qPCR en CPF e HPC. Los niveles de mensajero obtenidos fueron normalizados a la expresión del gen reportero *Sdha*. Los valores se expresan como unidades arbitrarias los datos se expresan como porcentaje al valor alcanzado por los ratas C de 28 días de vida. Las barras representan los valores medios de los niveles del ARNm del AR ± EE. En HPC, se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad en ratas C. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=5-6; ANOVA 2 vías, Tukey).

IV 3.1.3- Expresión del ERα.

Se analizó la expresión génica y proteica del ERa en homogeneizados de cerebros de ratas C y EP, de 28 y 75 días. Los datos obtenidos del análisis de la expresión proteica para el receptor mediante Western blot revelaron la ausencia de diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales para el área VTA (figura IV.18A). Al DPN 28, tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas en CPF e HPC entre ratas C y EP en cuanto a los niveles proteicos del ERa. Sin embargo a los 75 DPN pudo observarse que el estrés prenatal inducía una disminución en la expresión proteica relativa del receptor tanto en la CPF como en el HPC de ratas EP, en relación a lo observado en crías controles de la misma edad. La disminución registrada en la expresión del ERα en CPF fue del 31%, mientras que en HPC fue del 57% (**figura IV.18**; $T_{(4)}$ =7.15, p=0.002 para CPF y $T_{(4)}$ =4.09, p=0.0095 para HPC de ratas EP de 75 DPN). Respecto a la expresión génica del Esr1, se observaron diferentes efectos en cada una de las dos áreas analizadas. En CPF se halló un efecto debido a la edad de las ratas sobre los niveles de ARNm del receptor: tanto en ratas C como EP adultas, las concentraciones de mensajero disminuían respecto a las concentraciones registradas en el estadio prepuberal (**figura IV.18B**; $F_{(1,13)}$ =6.52, p=0.0268 28 vs 75 para C). En HPC también se halló un efecto debido a la edad en ratas C: los niveles de ARNm incrementaban en un 110% en ratas adultas respecto a los niveles hallados en ratas de 28 días de vida ($F_{(1,14)}$ =5.10, p=0.0405 28 vs 75 para C). Sin embargo dicho aumento no se registró en individuos EP, ya que las concentraciones de ARNm para el Esr1 de ratas de 75 días no eran significativamente diferentes a las concentraciones de mensajero halladas en ratas C de 28 DPN pero sí se

hallaban reducidas en un 119,3 % respecto a los valores obtenidos en ratas C de 75 días (**figura IV.18C**; $F_{(1,14)}$ =6.87, p=0.0201 C vs EP para DPN 75).

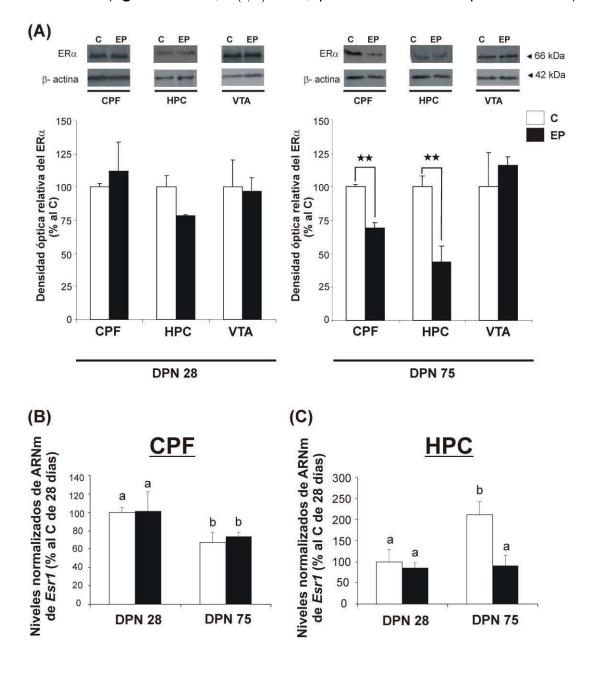


Figura IV.18- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión proteica (A) y génica (B, C) del receptor de estrógenos alfa (ERα) en homogeneizado total de áreas cerebrales de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). C= control; CPF= corteza prefrontal; HPC= hipocampo; VTA= área tegmental ventral. (A) Se muestran inmunoblot representativos para el ERα en cada una de las áreas especificadas. La banda inmunoreactiva para el ERα migró hacia los 66 kDa. La expresión de la actina muestra la existencia de carga proteica uniforme en cada calle. Los diagramas de barras representan el

promedio de la densidad óptica correspondiente a cada banda de proteína (expresada como densidad óptica del ERa relativa a la densidad óptica de actina) ± EE. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido a cada control correspondiente, para facilitar la interpretación de la magnitud en los cambios observados (n=3-4; **p<0.01; prueba t-student). (**B y C**) Niveles de ARNm de Esr1 determinados mediante RT-qPCR en CPF e HPC. Los niveles de mensajero obtenidos fueron normalizados a la expresión del gen reportero Sdha. Los valores se expresan como unidades arbitrarias y con el objetivo de facilitar la interpretación de los mismos, los datos se expresan como porcentaje al valor alcanzado por los ratas C de 28 días de vida. Las barras representan los valores medios de los niveles del ARNm del Esr1 ± EE. En CPF se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad. En HPC, se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad, tratamiento prenatal e interacción. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=5-6; ANOVA 2 vías, Tukey).

IV 3.1.4- Expresión del ERβ.

Se analizó la expresión génica y proteica del ERβ en homogeneizados de áreas cerebrales pertenecientes al sistema DA mesocortico-límbico de ratas C y EP de 28 y 75 días. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión proteica del receptor ERβ en ninguno de los grupos experimentales evaluados, ni en ninguna de las áreas examinadas (**figura IV.19**). Respecto a la expresión génica del *Esr2*, no pudieron detectarse niveles de ARNm para el receptor en CPF e HPC en ninguno de los grupos experimentales, para las edades evaluadas.

IV 3.1.5- Expresión génica de enzimas esteroideogénicas.

Se analizó la expresión génica de las enzimas *Srd5a1*, *Srd5a2* y *Cyp19* en homogeneizados de CPF e HPC de individuos C y EP, de 28 y 75 días de vida. Los niveles de ARNm de *Cyp19* no pudieron detectarse mediante RT-qPCR en ninguno de los grupos experimentales. Respecto a la expresión génica de las dos isoformas del *Srd5a* en las áreas cerebrales mencionadas, no se hallaron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales, para ninguna de las edades consideradas (**figura IV.20 A** y **B**).

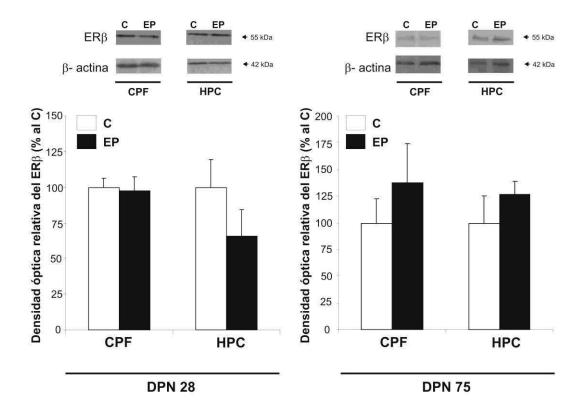


Figura IV.19- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión proteica del receptor de estrógenos beta (ER β) en homogeneizado total de corteza prefrontal (CPF) e hipocampo (HPC) de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). C= control. Se muestran inmunoblot representativos para el ER β en cada una de las áreas cerebrales. La banda inmunoreactiva para el ER β migró hacia los 55 kDa. La expresión de la actina muestra la existencia de carga proteica uniforme en cada calle. Los diagramas de barras representan el promedio de la densidad óptica correspondiente a cada banda de proteína (expresada como densidad óptica del ER β relativa a la densidad óptica de actina) \pm EE. Los valores se expresan como porcentaje del valor obtenido a cada control correspondiente. (n=4).

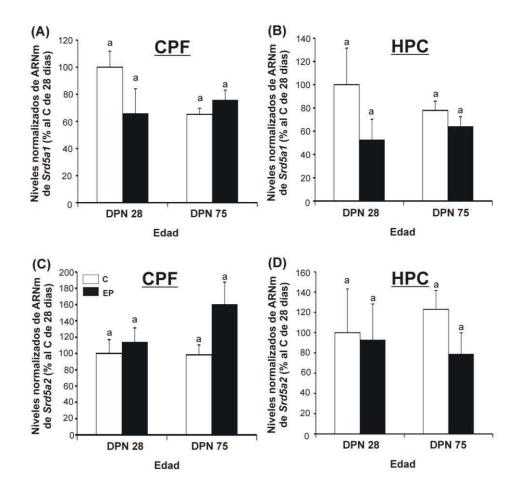
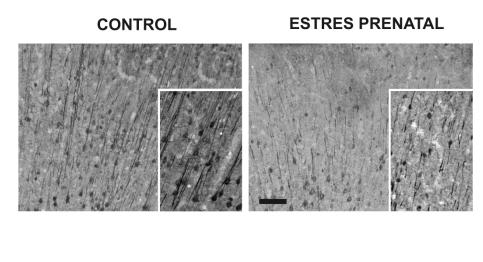


Figura IV.20- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la expresión génica de ambas isoformas de *Srd5a* en corteza prefrontal (CPF) e hipocampo (HPC) de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). C= control. Los niveles de ARNm de la isoforma 1 y 2 de la *Srd5a1* fue determinada en CPF e HPC mediante RT-qPCR (A a D). Los niveles de mensajero obtenidos fueron normalizados a la expresión del gen reportero Sdha. Los valores se expresan como unidades arbitrarias los datos se expresan como porcentaje al valor alcanzado por los ratas C de 28 días de vida. Las barras representan los valores medios de los niveles del ARNm del *Srd5a1* o *Srd5a2* ± EE. No se observaron diferencias estadísticas entre grupos experimentales debidas al factor edad, tratamiento prenatal o interacción entre ambos factores (n=5-6; ANOVA 2 vías).

IV 3.2- ARBORIZACIONES DENDRITICAS.

Se evaluó la inmunomarcación de la proteína de microtúbulo MAP2 en cortes histológicos de CPF e HPC con el objetivo de estudiar los efectos del estrés prenatal sobre los procesos neuronales. En CPF la marca inmunopositiva para el marcador se analizó a nivel de las láminas II y III corticales, donde la misma pudo detectarse como haces longitudinales y contorneando los somas neurales. El estrés prenatal indujo una reducción del 31% en el número de procesos neuronales inmunomarcados con MAP2 respecto a lo observado en ratas C de las mismas edades (**figura IV.21**; T₍₆₎=3.45, p=0.0136 para C vs EP).



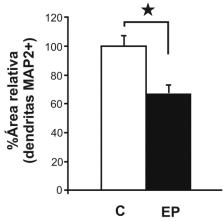


Figura IV.21- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la inmunomarcación de dendritas con MAP2 en las láminas II y III de la corteza prefrontal de ratas de 28 días postnatales (DPN). C= control. Se muestran dos fotos representativas tomadas al microscopio óptico (aumento 20X) de la inmunomarcación para MAP2 observada en cada grupo experimental. Los insertos muestran un detalle de la marca obtenida en un aumento de 40X para

cada grupo experimental. La barra de calibración señala $100\mu m$. El gráfico de barras representa el porcentaje promedio del área relativa de las dendritas inmunomarcadas con MAP2 \pm EE, para cada grupo experimental. Las estrellas señalan diferencias estadísticas significativas entre individuos C y EP a cada edad estudiada (n=4; *p<0.05; prueba t-student).

En HPC, la inmunotinción para MAP-2 en dicha región hipocampal pudo visualizarse en torno a los somas de las neuronas piramidales como también en la matriz estriatal en forma de haces longitudinales. El análisis de la inmunomarcación para MAP2 presentó un resultado similar al observado CPF: el EP indujo una reducción del 27% en la inmunomarcación de MAP2 en relación a la marca observada en individuos C de la misma edad (**figura IV.22**; $T_{(6)}$ =2.85, p=0.029).

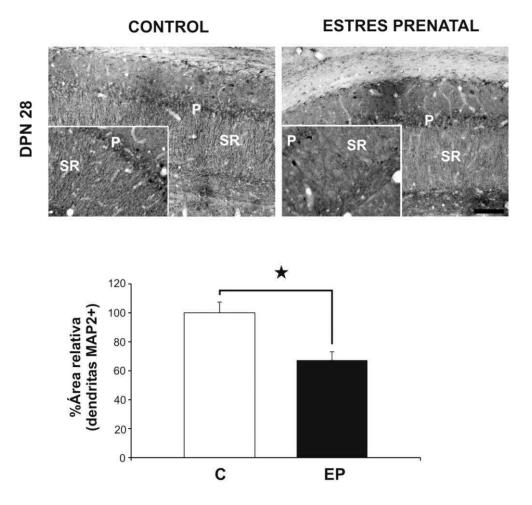


Figura IV.22- Efectos del estrés prenatal (EP) sobre la inmunomarcación de dendritas con MAP2 en la región CA1 del hipocampo de ratas de 28 días post-natales (DPN). C= control; P= capa de neuronas piramidales; SR= estrato radiado. Se muestran dos fotos representativas tomadas al microscopio óptico (aumento 20X) de la inmunomarcación para MAP2 observada en cada

grupo experimental. Los insertos muestran un detalle de la marca obtenida en un aumento de 40X para cada grupo experimental. La barra de calibración señala $100\mu m$. El gráfico de barras muestra el porcentaje promedio del área relativa de las dendritas inmunomarcadas con MAP2 \pm EE. La estrella señala diferencias estadísticas significativas entre individuos C y EP (n=4; *p<0.05; prueba t-student).

CAPITULO 4

ADMINISTRACION PRENATAL DE FLUTAMIDA Y SISTEMA DOPAMINERGICO MESOCORTICO-LIMBICO EN RATAS PREPUBERALES Y ADULTAS.

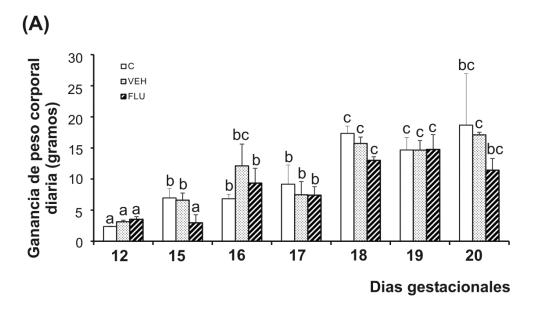
IV 4.1- EVALUACION DE PARÁMETROS MATERNOS Y DE LA CAMADA.

Se estudió la ganancia de peso corporal diaria y la ganancia de peso corporal total durante la gestación en hembras preñadas inyectadas con solución vehículo y con flutamida. La ganancia de peso corporal diaria se evaluó al DG 12 y desde los DG 15 al 21. En ambos grupos experimentales, se observó un aumento en la ganancia de peso corporal diaria conforme aumentaban los días de gestación ($F_{(6,6)}$ =14.89, p<0.001 para factor dia gestacional). No obstante en los DG 15, 18 y 20 la magnitud de la ganancia corporal diaria registrada en las ratas pertenecientes al grupo FLU era menor que la obtenida en las ratas VEH **figura IV.23**; $F_{(1,6)}$ =7.98, p= 0.0302 para factor tratamiento). No obstante, no se registraron diferencias en la ganancia corporal total adquirida durante el transcurso de la preñez para ninguno de los dos grupos.

Como un control adicional, se comparó la ganancia de peso corporal diaria y la ganancia de peso corporal total durante la preñez de hembras inyectadas con solución vehículo y de hembras que no habían sido perturbadas durante el transcurso de la gestación (control). No se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en la ganancia de peso corporal diaria entre tratamientos ($F_{(1,5)}$ =0.58; p=0.4806, para factor tratamiento), pero se encontró que las ratas VEH presentaban un reducción del 15% en la ganancia de peso corporal total durante el transcurso de la gestación en comparación a la ganancia de peso corporal total registrada durante la gestación de hembras C ($T_{(5)}$ =2.65; p=0.0452)

En la **tabla IV.5** se presentan las características de las camadas pertenecientes a los grupos VEH y FLU. No se hallaron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales en cuanto a la duración de la gestación o el tamaño de la camada. Tampoco se hallaron evidencias de pérdida ó malformaciones de miembros ó tejidos, en ninguna de las crías recién nacidas. No fue posible determinar el sexo de las ratas recién nacidas

pertenecientes al grupo FLU, ya que la distancia anogenital de todos los individuos era similar (ver más adelante). Recién hacia el DPN 4 el tamaño del botón genital de los machos y de las hembras había crecido lo suficiente como para poder distinguir de forma diferencial el sexo de los individuos.



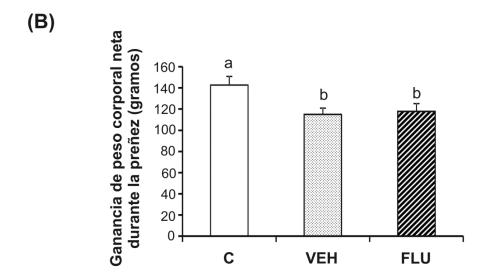


Figura IV.23- Ganancia corporal diaria (A) y neta (B) durante el transcurso de la gestación en hembras preñadas expuestas a solución vehículo (VEH), flutamida (FLU) o que permanecieron libres de perturbaciones (C) durante la última semana de gestación. (A) Los puntos representan la media de la ganancia corporal diaria ± EE. Se obtuvieron diferencias significativas debidas a los efectos de los factores: día gestacional y tratamiento experimental aplicado. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=4; ANOVA de medidas repetidas- Tukey). (B)

Las barras representan la media de la ganancia corporal neta durante la preñez ± EE. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=4; ANOVA de una vía).

La **Tabla IV.6** muestra los resultados obtenidos al analizar la ganancia del peso corporal en las crías FLU y VEH. No se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales para ninguna de las edades evaluadas, aunque una tendencia hacia un mayor peso corporal pudo registrarse en individuos FLU de 75 días de edad respecto al hallado en machos VEH (p= 0.0523).

PARÁMETRO EVALUADO	VEHÍCULO	FLUTAMIDA
DURACIÓN DE LA GESTACIÓN (días)	22.75 ± 1.08	23 ± 0.0
TAMAÑO DE LAS CAMADAS	12. 75 ± 2.99	14 ± 2.45

Tabla IV.5- Características de la camada. Se observa la duración de la gestación en días y el tamaño de la camada, expresados como valores promedio ± EE.

PESO CORPORAL	VEHÍCULO	FLUTAMIDA
DPN 1	6.67 ± 1.03 ^a	7.00 ± 1.10 ^a
DPN 28	85.17 ± 12.02 ^b	79.00 ± 4.00 ^b
DPN 75	326.7 ± 6.0 ^c	348.8 ± 7.6 ^c

Tabla IV.6- Peso corporal de las crías macho pertenecientes a ambos grupos experimentales, evaluado a diferentes edades. DPN= días post natales. Se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05. (n=6; p=0.0523; ANOVA de 2 vías).

IV 4.2- EVALUACION DE PARAMETROS DEL DESARROLLO SEXUAL DE LAS CRIAS.

IV 4.2.1- Distancia anogenital.

La distancia anogenital de las crías pertenecientes a ambos grupos experimentales se midió a los DPN 1, 10 y 21. En todas las edades

consideradas para el experimento, la distancia anogenital de las crías hembras FLU no presentó diferencias estadísticamente significativas al compararse con la distancia anogenital registrada en las crías hembra VEH ($F_{(1,5)}$ =5.82, p=0.0607 para hembras VEH vs hembras FLU). En cambio la distancia anogenital en los machos expuestos prenatalmente a flutamida se observó disminuída en comparación a la distancia anogenital registrada en los machos VEH de la misma edad (**figuras IV.24A-C vs D-F** y **figura IV.24J**; $F_{(1,57)}$ =168.2, p<0.001 para factor tratamiento prenatal machos VEH vs machos FLU). Al mismo tiempo, y en todas las edades evaluadas, la distancia anogenital de los machos FLU presentó valores similares a los hallados en las hembras FLU (**figuras IV.24D-F vs G-I** y **figura IV.24J**; $F_{(1,57)}$ =9.4x10⁻⁵, p=0.9923 para factor sexo machos FLU vs hembras FLU). Por último, no se hallaron diferencias estadísticas significativas en la distancia anogenital medida en hembras VEH ó FLU.

Se registraron anomalías en la formación del pene hacia el DPN 21 en los machos FLU donde se observó que el mismo no se encontraba completamente cerrado y el orificio uretral se hallaba ubicado más basalmente y presentaba un mayor díametro que el registrado en los individuos VEH (**figura IV.24C vs figura IV.25F**). Dicha anomalía se mantuvo hasta edades adultas inclusive.

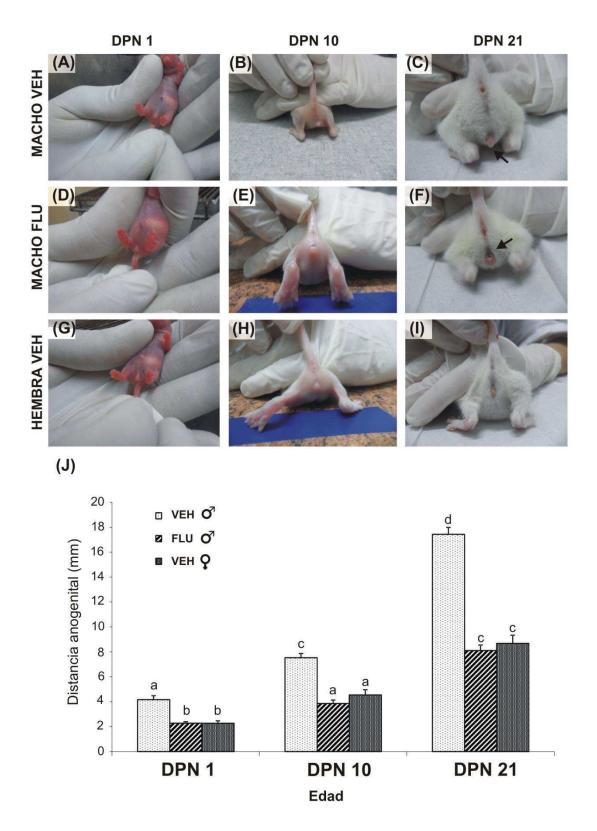


Figura IV.24- Distancia anogenital observada en machos pertenecientes a los grupos experimentales vehículo (VEH) ó flutamida (FLU) y hembras VEH a los días postnatales 1 (A; D; G), 10 (B; E; H) y 21 (C; F; I). Las flechas en (C) y en (F) señalan la morfología diferencial del pene de un individuo VEH y la de otro FLU, respectivamente. En (J) las barras muestran la distancia anogenital promedio ± EE a lo largo del tiempo entre los individuos de

los diferentes tratamientos prenatales. Se observaron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad y al factor tratamiento prenatal. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=6; ANOVA de 2 vías- Tukey para machos VEH vs machos FLU y para machos FLU vs Hembras).

IV 4.2.2- Descenso testicular.

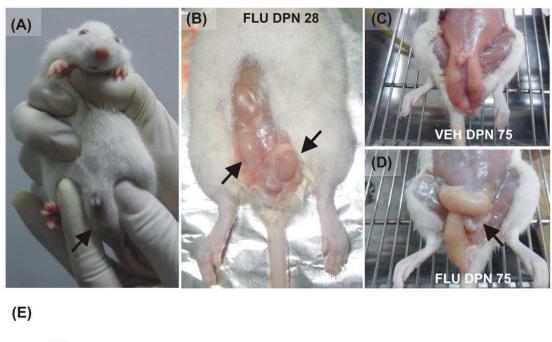
El descenso testicular de los machos pertenecientes a los grupos VEH y FLU fue evaluado a partir del DPN 21. La totalidad de los machos VEH analizados completaba el descenso de ambos testículos dentro de la bolsa del escroto hacia el DPN 23, mientras que para la misma edad, sólo el 50% de los individuos FLU completaban el descenso. Recién hacia el DPN 25 pudo observarse que la mayoría de los individuos FLU completaban el descenso testicular, sin embargo aún hacia el DPN 28 se registró una proporción de individuos que permanecían con el descenso completo. Dichas individuos presentaban uno de los testículos dentro del escroto, pero el otro en la cavidad abdominal (**figuras IV.25A** y **B**) y el porcentaje de ratas que presentaban dicha anomalía se mantuvo incluso hasta edades adultas (**figuras IV.25C** y **D**; $F_{(1.5)}$ =12.09, p=0.0132 para factor tratamiento; $F_{(5,30)}$ =18.55, p<0.0001 para factor edad). Por último, se observó que los testículos de los individuos FLU poseían una menor irrigación en comparación a los testículos de las ratas VEH y que dicho patrón también se hacía evidente en crías adultas.

IV 4.2.3- Determinación del índice órgano-somático.

Se evaluó el índice órgano-somático del testículo, epidídimo, vesícula seminal e hipófisis de ratas VEH y FLU, de 28 y 75 días de edad. Para el caso de ratas adultas también se estudió el índice órgano-somático de la próstata, que a edades más tempranas no pudo determinarse por ser muy dificultosa su distinción. Se observaron diferencias estadísticas en el índice órgano somático de la vesícula seminal de individuos de 28 como de 75 días de vida, que habían recibido flutamida prenatalmente. Se registró una hipotrofia en la vesícula seminal de las ratas FLU (**figura IV.26B**; $T_{(6)}$ =-10.13, p=0.0005 VEH vs FLU para vesícula seminal DPN 28; $T_{(6)}$ = 5.52, p=0.0015 VEH vs FLU para vesícula seminal DPN 75).

IV 4.3- EVALUACION DE NIVELES SERICOS DE TESTOSTERONA EN INDIVIDUOS PREPUBERALES Y ADULTOS.

Se evaluaron los niveles séricos de testosterona en ratas VEH y FLU de 28 y 75 días mediante RIA. No se hallaron diferencias estadísticas significativas en las concentraciones de la hormona debidas al tratamiento prenatal recibido, para ninguna de las edades examinadas (**figura IV.27**).



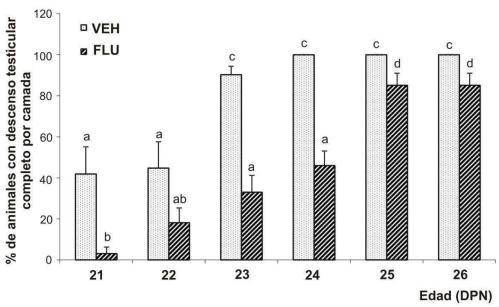


Figura IV.26- Efectos de la administración prenatal de flutamida (FLU) sobre el descenso testicular. DPN= día postnatal; VEH= vehículo. (A) la foto corresponde a un individuo FLU de 28 días de edad, donde se observa que el testículo izquierdo se encuentra descendido dentro de la bolsa del escroto,

pero no así el testículo derecho. **(B)** La foto muestra este mismo efecto interno en otro individuo FLU de 28 días de edad (ver flechas negras). **(C-D)** Las fotos corresponden a dos individuos adultos pertenecientes a diferentes grupos experimentales. La flecha en (D) señala la presencia de criptorquidia en el individuo FLU. **(E)** Las barras representan el porcentaje promedio de ratas por camada con descenso testicular completo dentro de la bolsa del escroto ± EE. Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas debidas al factor edad y al factor tratamiento prenatal. Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05 (n=4 camadas analizadas por grupo; ANOVA de medidas repetidas- Tukey).

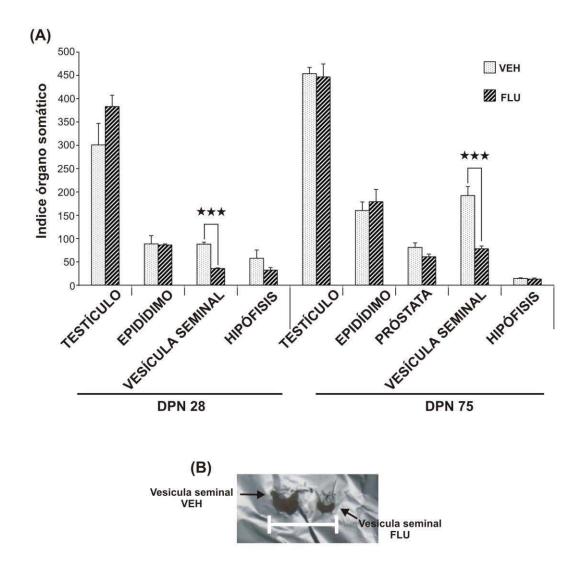


Figura IV.26- Efectos de la administración prenatal de la flutamida (FLU) sobre el Índice órgano-somático de testículo, epidídimo, vesícula seminal, hipófisis y prostata de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). VEH=vehículo. (A) Las barras representan la media ± EE del índice órgano-somático de cada órgano [donde el índice representa: (peso húmedo del órgano/peso corporal del individuo)x 100]. Las estrellas señalan la presencia

de diferencias estadísticas entre ratas de diferentes tratamientos prenatales (n=4; ***p<0.001; prueba de *t*-student). **(B)** detalle de la vesícula seminal de un individuo VEH y de otro individuo FLU, ambos de 28 DPN. La barra de calibración señala 1 cm. Nótese la hipotrofia de la vesícula FLU.

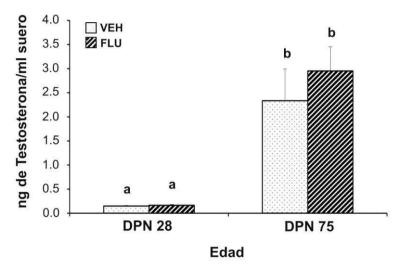


Figura IV.27- Efectos de la administración prenatal de flutamida (FLU) sobre los niveles de testosterona en suero de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). VEH= vehículo. Las barras representan el valor medio de los ng de testosterona/ml de suero ± EE (n=4; ANOVA de 2 vías). Los grupos sin letras en común son significativamente diferentes entre sí con p<0.05

IV 4.4- ESTUDIOS DE MORFOLOGIA NEURAL EN CEREBRO.

IV 4.4.1- Estudio de arborizaciones dendríticas empleando el marcador MAP2.

Se evaluó la inmunomarcación de la proteína de microtúbulo MAP2 en CPF, HPC y VTA con el objetivo de estudiar los efectos de la administración prenatal de flutamida sobre los procesos neuronales. De acuerdo a la incidencia del corte, al área cerebral evaluada y a la edad del animal en la cual se estaba realizando la evaluación, la marca inmunopositiva para MAP2 pudo observarse ya sea de forma esférica (contorneando los somas neurales) o en forma de haces longitudinales.

Para CPF la marca inmunopositiva para MAP2 se evaluó a la altura de las láminas II y III de la corteza, donde la misma pudo detectarse principalmente en forma de haces longitudinales y al igual que lo observado al realizar el experimento en ratas C y EP, en individuos de 28 días de vida VEH y FLU también pudo observarse contorneando los somas neurales. Para ambas edades evaluadas, la administración prenatal de flutamida indujo una reducción en el número de procesos neuronales inmunomarcados con MAP2 (**figura IV.28**). En ratas FLU de 28 días de vida, se registró una disminución del 16% ($T_{(6)}$ =-2.83, p=0.0298) mientras que la reducción fue del 15% en ratas FLU adultas en comparación a lo observado por individuos VEH ($T_{(6)}$ =-5.34, p=0.0128).

En HPC, la marca inmunopositiva para MAP2 se evaluó en la región CA1. La inmunotinción para MAP-2 en dicha región hipocampal pudo visualizarse en torno a los somas de las neuronas piramidales como también en la matriz estriatal en forma de haces longitudinales. El análisis de la inmunomarcación para el marcador reveló que la administración prenatal de flutamida también inducía una reducción en la marca en ambas edades evaluadas (**figura IV.29**): a 28 días, la flutamida indujo una reducción del 48% en la inmunomarcación de MAP2 ($T_{(6)}$ =-6.06, p=0.009), mientras que a 75 días la disminución fue del 20%en relación a la marca observada en individuos VEH a las mismas edades ($T_{(6)}$ =-4.02, p=0.0101).

Por último, la estimación de procesos neuronales en VTA mediante la inmunomarcación con MAP2 arrojó el mismo resultado que el obtenido en las

otras áreas cerebrales: la administración prenatal de flutamida disminuía el número de dendritas inmunomarcadas a 28 días como a 75 DPN (**figura IV.30**). En VTA la marca pudo observarse como haces longitudinales. En individuos prepuberales pertenecientes al grupo FLU, se observó una reducción del 24% en los niveles de MAP2 en comparación a lo observado en ratas VEH ($T_{(6)}$ =-4.89, p=0.0045). En ratas adultas FLU, la reducción hallada fue del 31% ($T_{(6)}$ =3.74, p=0.0097).

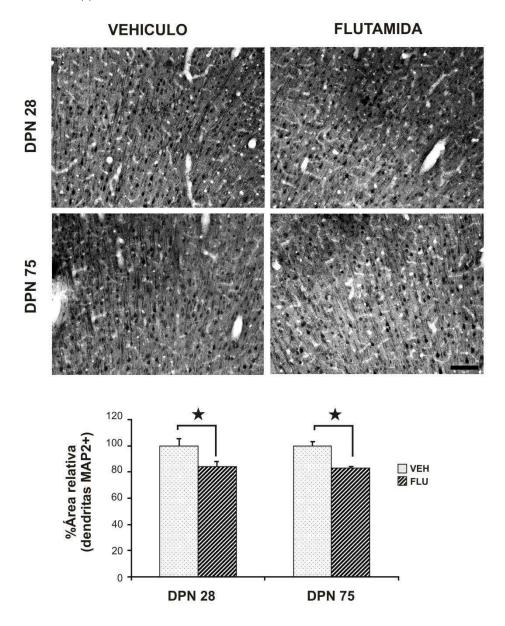


Figura IV.28- Efectos de la administración prenatal de flutamida (FLU) sobre la inmunomarcación de dendritas con MAP2 en las láminas II y III de la corteza prefrontal de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). VEH= vehículo. Se muestran fotos representativas tomadas al microscopio óptico (aumento 20X) de la inmunomarcación para MAP2 observada en cada grupo

experimental. La marca positiva para el marcador pudo observarse contorneando los somas neurales ó como fibras longitudinales. La barra de calibración señala $100\mu m$. El gráfico de barras representa el porcentaje promedio del área relativa de las dendritas inmunomarcadas con MAP2 en CPF \pm EE, para cada grupo experimental. Las estrellas señalan diferencias estadísticas significativas entre individuos VEH y FLU a cada edad estudiada (n=4; *p<0.05; prueba t-student).

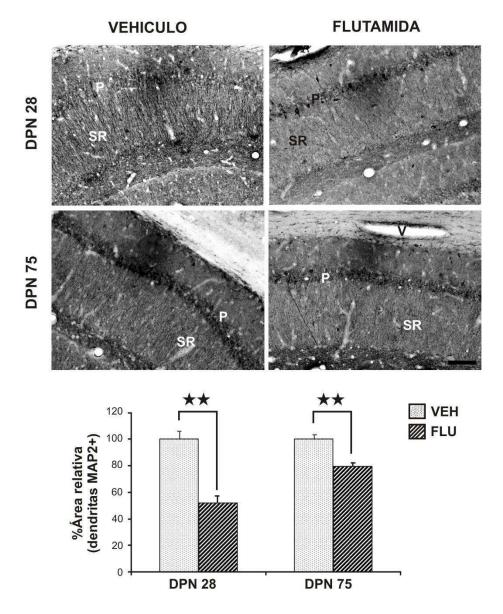


Figura IV.29- Efectos de la administración prenatal de flutamida (FLU) sobre la inmunomarcación de dendritas con MAP2 en la región CA1 del hipocampo de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). VEH= vehículol; P= capa de neuronas piramidales; SR= estrato radiado; V= vaso sanguíneo. Se muestran fotos representativas tomadas al microscopio óptico (aumento 20X) de la inmunomarcación para MAP2 observada en cada grupo experimental. La marca positiva para el marcador pudo observarse contorneando los somas

neurales en la región de neuronas piramidales ó como fibras longitudinales en el estrato radiado. La barra de calibración señala 100μm. El gráfico de barras muestra el porcentaje promedio del área relativa de las dendritas inmunomarcadas con MAP2 en la región CA1± EE. Las estrellas señalan diferencias estadísticas significativas entre individuos VEH y FLU (n=4; **p<0.01; prueba *t*-student).

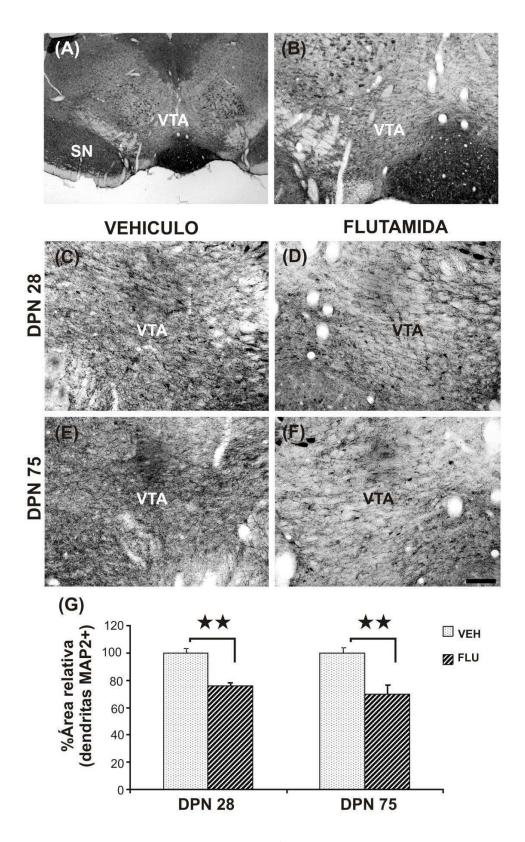


Figura IV.30- Efectos de la administración prenatal de flutamida (FLU) sobre la inmunomarcación de dendritas con MAP2 en el área tegmental ventral (VTA) de ratas de 28 y 75 días post-natales (DPN). VEH= vehículo; SN= substantia nigra. (A-B) Se muestra una foto panorámica y otra a mayor magnificación (aumentos 4X y 20X) del área estudiada. (C-F) Se muestran

cuatro fotos representativas tomadas al microscopio óptico (Aumento 20X) de la inmunomarcación para MAP2 observada en cada grupo experimental. La marca positiva para el marcador pudo observarse como fibras longitudinales en la zona de VTA. La barra de calibración señala 100µm. El gráfico de barras muestra el porcentaje promedio del área relativa de las dendritas inmunomarcadas con MAP2 en VTA ± EE. Las estrellas señalan diferencias estadísticas significativas entre individuos VEH y FLU (n=4; **p<0.01; prueba *t*-student).

IV 4.4.2- Cuantificación de cuerpos neuronales NeuN+ y TH+.

Se cuantificó el número total de neuronas dopaminérgicas en VTA de ratas VEH y FLU de 28 y 75 días. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-NeuN específico de neuronas, que dio una marca nuclear de color verde homogénea a lo largo de todo el corte histológico y un anticuerpo anti-TH específico para la enzima tirosina hidroxilasa (TH) marcador de células dopaminérgicas. La marcación para TH pudo observarse en el citoplasma de las células y en los procesos neuronales de las mismas, de color rojo, a lo largo de toda el área VTA y SN. Para ambos marcadores, el patrón de marcación observado fue similar en las crías VEH y FLU de 28 y 75 DPN (figura IV.31): no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales respecto al número de células NeuN⁺ (figura IV.32A). Por otro lado se llevó a cabo la cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas mediante la cuantificación de células que expresaban al mismo tiempo ambos marcadores. Para ello se realizó una colocalización computacional de las imágenes extraídas para cada marcador. Los resultados mostraron que los ratas FLU de 28 días presentaban una reducción del 35% en el porcentaje de neuronas dopaminérgicas, en comparación a las crías vehículo de la misma edad (figura IV.32B; $T_{(6)}$ =-2.71, p=0.0329). Dicha diferencia no se observó en individuos adultos.

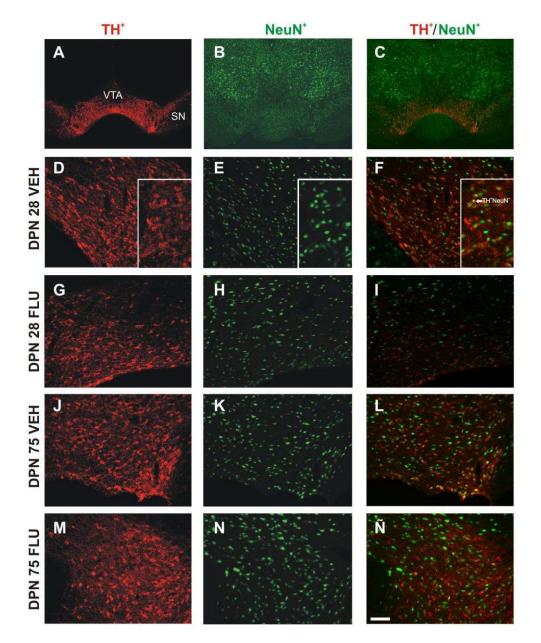


Figura IV.31- Inmunofluorescencia doble mostrando la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en rojo, el marcador neuronal NeuN en verde y la colocalización de ambos marcadores en el área tegmental ventral (VTA) de ratas que recibieron prenatalmente vehículo (VEH) ó flutamida (FLU), de 28 y 75 días post-natales (DPN). SN= substantia nigra. (A-C) Se muestran fotos panorámicas del área VTA a un aumento 4X y cómo se visualizaban ambos marcadores. (D-Ñ) se muestran fotos de ambos marcadores y la colocalización de los mismos para cada grupo experimental y cada edad considerada a una magnificación de 20X. Los insertos en (A-C) muestran fotos en detalle a un aumento de 40X y en (C) se muestra en amarillo (flecha blanca) un ejemplo de una neurona expresando ambos marcadores. La barra de calibración señala 100 μm.

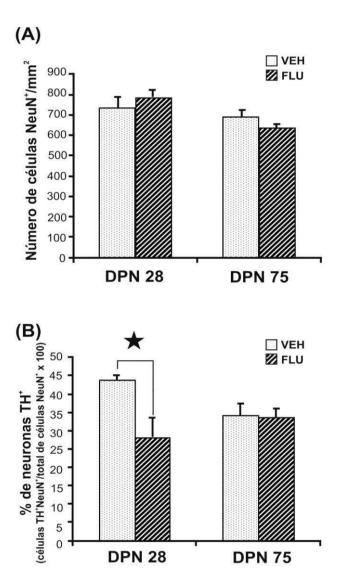


Figura IV.32- Efectos de la administración prenatal de flutamida (FLU) sobre el número de células TH+ (A), NeuN+ (B) y sobre el porcentaje de neuronas dopaminérgicas (C) en el área tegmental ventral de ratas de 28 y 75 días postnatales (DPN). (A-B) Las barras representan la media del número de células expresando cada uno de los inmunomarcadores ± EE. (C) el número de neuronas dopaminérgicas se obtuvo tras examinar el porcentaje de células que expresaban ambos marcadores/total de neuronas *100. El gráfico muestra el valor medio obtenido ± EE. La estrella muestra la presencia de diferencias estadísticas debidas al tratamiento prenatal (n=4; p<0.05, prueba *t*-student).

V- DISCUSIÓN

CAPITULO 1

CARACTERIZACION MATERNA Y DE LAS CAMADAS EN EL MODELO DE ESTRES PRENATAL

V 1.1- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE PARAMETROS MATERNOS Y DE LA CAMADA.

Existe un amplio consenso que una exposición repetida y/o excesiva a situaciones estresantes contribuyen a generar alteraciones en el organismo, especialmente cuando suceden durante etapas tempranas del desarrollo prenatal (Chrousos, 2009; Mastorci y col., 2009; Sandman y col., 2011). Por otra parte la preñez, el trabajo de parto y la lactancia son períodos de gran actividad cerebral en las madres durante los cuales tiene lugar una serie de comportamientos complejos y adaptaciones neurobiológicas, gracias a las cuales pueden sobrellevar cada una de las etapas y a la vez asegurar la salud de sus infantes (Darnaudery y col., 2004; Champagne y Meaney, 2006; Slattery y Neumann, 2008).

Existen múltiples modelos de estrés prenatal en roedores descriptos en la literatura. En este trabajo de tesis se utilizó el protocolo descripto por Ward y Weisz en 1984, quienes demostraron que la inmovilización de la madre durante la última semana de gestación, activa al eje HHA materno e interfiere con el desarrollo de varios circuitos neurales y sistemas neuroendócrinos de la cría (Ward y Weisz, 1984; Weinstock, 2001; Huizink y col., 2004; Mastorci y col., 2009; Charil y col., 2010). Se ha demostrado que la exposición a estrés por inmovilización agudo o crónico en un individuo adulto (no gestante) produce una disminución en la ganancia de peso corporal que persiste hasta pasados 40 días de concluido el estrés (Smagin y col., 1999). Este efecto ocurriría por la acción catabólica de los glucocorticoides sobre la masa muscular y el tejido adiposo, al mismo tiempo que la liberación de CRH a nivel central inhibiría el apetito (Smagin y col., 1999; Scherer y col., 2011). Coincidiendo con el grupo de Darnaudery y colaboradores (2004), nuestros resultados muestran que la exposición a estrés por inmovilización durante la última semana de gestación

induce una reducción en la ganancia de peso corporal materna durante la preñez (Darnaudery y col., 2004).

En relación a las características de las camadas, el estrés prenatal por inmovilización no produjo diferencias en la duración de la gestación, ni en el tamaño de la camada. No se registraron malformaciones de miembros o tejidos. El peso corporal de nacimiento de las crías estresadas tampoco se vio afectado. Sin embargo, y al igual que lo descripto por otros autores (Vallee y col., 1996), se halló que las crías estresadas prenatalmente presentaban una marcada reducción en el peso corporal a los 28 días de vida, respecto al registrado en las ratas C. Al igual que el desarrollo cognitivo, el crecimiento corporal de la cria está sujeto a la influencia de múltiples factores entre los cuales se incluye el estado nutricional de la madre, la calidad de su leche, el cuidado materno y la respuesta al estrés de su eje HHA (Tang y col., 2012). Algunos autores han sugerido que el incremento en los niveles fisiológicos de glucocorticoides maternos como consecuencias del estrés durante la gestación genera un aumento de comportamientos del tipo "ansioso" y "depresivo" en las madres que disminuyen significativamente el cuidado maternal (Darnaudery y col., 2004; Champagne y Meaney, 2006). A su vez, la prolactina ha sido propuesta como un factor esencial en la modulación del eje HHA materno. Se ha demostrado que la disminución en los niveles séricos de prolactina disminuye el cuidado maternal (Slattery y Neumann, 2008; Larsen y Grattan, 2012). Como una primera aproximación a evaluar el estado del sistema de estrés materno, se decidió analizar los niveles basales de corticosterona y de prolactina maternas en suero tras dos semanas de haberse realizado el destete para que el estrés de separación de las crías no afectara los resultados. Si bien el estrés gestacional no indujo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de ambas hormonas, la presencia de una tendencia hacia un aumento en los niveles de corticosterona y hacia una reducción en los niveles de prolactina en las madres que habían sido expuestas al estrés durante la gestación nos llevaría a pensar de que posiblemente, de haberse realizado la medición durante el período de lactancia, los resultados podrían haber sido otros.

V 1.2- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LA RESPUESTA AL ESTRES AGUDO DE LA DESCENDENCIA.

Los efectos del estrés prenatal sobre el eje HHA de la descendencia han sido muy estudiados y se ha demostrado que su funcionamiento se ve alterado como consecuencia del estrés gestacional (Maccari y col., 1995; Weinstock, 2001; Huizink y col., 2004; Mastorci y col., 2009). En nuestro sistema, observamos que la respuesta a un estrés agudo en crias EP de 28 dias fue similar a la de los controles. Sin embargo los valores de corticosterona registrados a las dos horas de recuperación al estrés se hallaron por debajo de los niveles basales, señalando una probable hiporeactividad en el eje HHA de las crías EP. Por otra parte, no se registraron diferencias entre los niveles de corticosterona basales de individuos C y EP a edades adultas. El análisis de la literatura muestra que algunos autores hallaron diferentes respuestas al estres agudo en ratas adultas que fueron estresadas prenatalmente mostrando en algunos casos, que éstos presentaban una mayor reactividad al estrés (Henry y col., 1994; Weinstock, 2001; Morley-Fletcher y col., 2003; Darnaudery y col., 2004; Mastorci y col., 2009). Si bien las discrepancias halladas con nuestros resultados podrían estar relacionados al tipo de agente estresante al cual fue expuesta la madre y a la duración en el tiempo de exposición al mismo, y/o también podrían depender de otros factores como la edad y el sexo del individuo en el cual dichos efectos se analizaban (Koehl y col., 1999; Matthews, 2001; Huizink y col., 2004), nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que el estrés gestacional podría estar induciendo un efecto "adaptativo" o "protector" sobre la respuesta al estrés del individuo permitiéndole desempeñar una mejor respuesta al enfrentarse a situaciones novedosas (Pallares y col., 2007).

Si bien la prolactina cumple principalmente su acción en procesos reproductivos y comportamentales, tambien participa del mantenimiento de la homeostasis ya que regula el sistema inmune, el balance osmótico y la angiogénesis. Su secreción se encuentra controlada por una gran variedad de estímulos provenientes del medio externo e interno del animal entre los cuales se encuentra el estrés. Frente a la exposición a un agente estresante se produce un incremento en la secreción de prolactina que estaría relacionado a

su acción inmuno-moduladora sobre los efectos inducidos por el estrés. En cambio, tras la liberación de glucocorticoides como consecuencia de la activación del sistema de estrés, los niveles de prolactina se restituyen a los niveles basales va que éstos actúan directamente a nivel de los lactótrofos hipofisarios inhibiendo su secreción (Freeman y col., 2000; Jaroenporn y col., 2007). Los resultados obtenidos en nuestro modelo mostraron que el patrón de liberación de prolactina de individuos EP expuestos al estrés agudo variaba según la edad en la cual se estaba realizando la observación. A los 28 días la respuesta fue similar en ratas C y EP: luego de aplicar el estrés por inmovilización los valores hormonales aumentaban, pero tras dos horas de recuperación al estrés sus valores se reestablecían a los basales. En cambio a los 75 DPN, el patrón de respuesta de liberación de la hormona frente al estrés agudo difería significativamente entre grupos experimentales. Las ratas EP presentaban una hiperprolactinemia en condiciones basales. hipoprolactinemia luego de aplicarse la sesión de estrés agudo por inmovilización. Estos resultados coinciden con los hallados por el grupo de Kinsley y colaboradores (1989) en ratas adultas prenatalmente estresadas donde los autores concluyen que el estrés prenatal produce una hiporeactividad al estrés agudo.

La hiperprolactinemia se ha asociado a disfunciones en el eje HHA. Se ha registrado que la adrenalectomía induce un incremento de prolactina que puede ser revertido con la administración exógena de glucocorticoides. Por otro lado, se ha mostrado que la prolactina también actúa sobre la glándula adrenal regulando la liberación de corticosterona. La inducción de una hipoprolactinemia inhibe la acción del eje HHA, mientras que la inducción de una hiperprolactinemia ejerce una hipertrofia de la glándula adrenal (Freeman y col., 2000; Jaroenporn y col., 2007).

La inhibición en la liberación de prolactina como consecuencia de la exposición a un estrés agudo ha sido descripta en individuos con hiperprolactinemia, posiblemente como mecanismo protector. Dicha respuesta inhibitoria también se ha descripto en otras situaciones fisiológicas donde los niveles basales de prolactina son muy elevados tales como el pico hormonal

inducido en la fase de proestro en las hembras o en el pico nocturno de la preñez o pseudopreñez (Freeman y col., 2000).

En nuestro trabajo, creemos que la hiperprolactinemia observada en las crías EP adultas no se debería a una disfunción del eje HHA ya que no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona basales entre individuos adultos C y EP. Alternativamente, la hiperprolactinemia podria estar relacionada a una disfuncion de la vía dopaminérgica encargada de modular la liberación de la prolactina. Si bien está descripto que el estrés prenatal altera las vias dopaminérgicas mesencefálicas, aun no se han descripto sus efectos sobre la via tuberoinfundibular. Nuestros resultados serían una evidencia indirecta de la existencia de la presencia de una desregulación en la inhibición tónica de dicha vía en individuos EP que alteraría la liberación de la DA, produciendo una mayor liberación de prolactina en condiciones basales.

Es importante señalar que la relevancia fisiológica del aumento registrado en las concentraciones basales de prolactina en este trabajo podría estar relacionada con la acción moduladora que la hormona ejerce sobre el eje HHT Si bien la prolactina es necesaria para una función testicular adecuada se ha demostrado que en exceso, ejerce efectos inhibitorios sobre el eje reproductor (Waeber y col., 1983).

V 1.2- CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1.

Estudios previos han demostrado que la preñez y la lactancia son dos períodos de gran vulnerabilidad al estrés tanto para la madre como para el feto. En la madre, el estrés gestacional se ha asociado al desarrollo de comportamientos del tipo "depresivo" o "ansioso" y a una disfunción del eje HHA. En la descendencia, las consecuencias inducidas por el estrés sobre el eje han mostrado depender del tipo de estrés aplicado y de la duración en el tiempo del mismo. El protocolo de estrés utilizado en este trabajo, que consiste en inmovilizar a la madre durante la última semana de gestación, indujo una reducción en la ganancia de peso corporal de la madre durante la gestación. Si bien no hemos evaluado parámetros de comportamiento maternal es interesante destacar que las crias EP mostraron el mismo peso de nacimiento que las crías C, pero luego de 28 dias el peso corporal de las mismas se

encontraba disminuído en comparación al registrado en los individuos controles de la misma edad. Este resultado estaría sugiriendo que la calidad del comportamiento maternal de las madres que fueron estresadas durante la gestación podría haber sido deficiente, y que por dicha razón se observa una reducción en la ganancia de peso de su cria.

Por otra parte, la respuesta del eje HHA de la descendencia parecía no verse prácticamente afectada por la exposición temprana al estrés. La liberación de corticosterona luego del estrés agudo registrada en individuos prepuberales y adultos fue similar entre las ratas de ambos grupos experimentales. No obstante la recuperación al estrés en individuos EP de 28 días fue mayor que la de los controles, sugiriendo que probablemente el estrés prenatal estaría confiriendo una ventaja adaptativa sobre la respuesta individual y adaptación al estrés frente a situaciones que pudieran representar un riesgo.

Por último, se encontró que los individuos prenatalmente estresados presentaban una hiperprolactinemia basal, hiporeactiva al estrés agudo. No existen en la literatura antecedentes sobre los efectos del estrés gestacional sobre la liberación de prolactina, pero nuestros resultados nos estarían indicando que la hiperprolactinemia encontrada podría estar relacionada con las disfunciones en los niveles hormonales del eje HHT halladas en nuestro sistema.

CAPITULO 2

ESTRES PRENATAL Y EL EJE HIPOFISARIO-TESTICULAR DE LA DESCENDENCIA

V 2.1- EFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE PARÁMETROS DEL DESARROLLO SEXUAL DE LAS CRÍAS.

La evaluación de parámetros de la morfometría sexual externa tales como la distancia anogenital y el descenso testicular en la bolsa del escroto, permite obtener información de una forma rápida y poco invasiva de parámetros del desarrollo durante la ventana temporal donde tiene lugar la diferenciación sexual del cerebro. La observación y análisis de la distancia anogenital permiten inferir si las concentraciones de andrógenos durante dicha etapa del desarrollo fueron las apropiadas (Goto y col., 2004). Por otra parte, las características del descenso testicular otorgan información acerca del estado del eje HHT fetal (Hughes y Acerini, 2008; Scott y col., 2009). En la mayoría de los mamíferos el testículo debe descender desde el abdomen hacia una posición extracorpórea para proveer de esta manera una menor temperatura que permita el desarrollo de la espermatogénesis. En la rata, este evento sucede en dos fases, una de las cuales es controlada por los picos perinatales de andrógenos (Hughes y Acerini, 2008). Al mismo tiempo, en los fetos macho, el correcto funcionamiento del eje HHT fetal es necesario para el crecimiento del pene y para el adecuado descenso testicular (Scott y col., 2009). Estudios realizados en ratas han demostrado que la producción deficiente de testosterona durante la ventana temporal crítica de la masculinización del cerebro fetal inducen desórdenes en la masculinización que incluyen malformaciones en el pene, criptorquidia, poco desarrollo de la próstata y una distancia anogenital reducida (Scott y col., 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el estrés prenatal indujo una reducción en la distancia anogenital en machos al DPN 1 y 21 y un retraso de dos días en completar el descenso testicular de ambos testículos en la bolsa del escroto en comparación al tiempo requerido para los individuos C. Estos resultados confirman y extienden trabajos previos del laboratorio (Barros y col., 2004), a la vez que coinciden con otros estudios que han hallado alteraciones en la organización de la genitalia masculina debida a la presencia de insultos prenatales (Shono y Suita, 2003; Gerardin y col., 2005). Mas áun, se ha demostrado que ambos parámetros también se ven alterados como consecuencia de la exposición prenatal de anti-andrógenos durante los días gestacionales 14 al 19 (Gray y col., 2001; Vinggaard y col., 2005; Hughes y Acerini, 2008). Dichas evidencias señalan una correlación directa entre los picos de testosterona embrionarios durante los días 18.5-19.5 de gestación y el desarrollo de características morfométricas, sugiriendo que el estrés prenatal estaria interfiriendo con dicho pico de testosterona.

V 2.2- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LAS CONCENTRACIONES SERICAS DE HORMONAS DEL EJE HIPOFISARIO-TESTICULAR.

V 2.2.1- Efectos del estrés prenatal sobre la liberación de gonadotrofinas.

Tanto la producción de espermatozoides como la secreción de hormonas testiculares dependen de la estimulación de las gonadotrofinas FSH y LH. La FSH juega un rol muy importante en el desarrollo y maduración de los testículos hacia su estado adulto. Su secreción es negativamente regulada por la hormona testicular inhibina, testosterona y estradiol (McLachlan y col., 2002; Whirledge y Cidlowski, 2010). Durante la pubertad, a medida que los testículos van madurando y los niveles de testosterona sintetizados por éstos se incrementan, las concentraciones en suero de la FSH van disminuyendo. Por otra parte, el aumento en los niveles de LH durante la pubertad controla la síntesis testicular de testosterona. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el estrés prenatal redujo las concentraciones de FSH y LH en ratas prepuberales. Este efecto sobre la LH también se observó en individuos de 75 días.

El patrón de liberación de gonadotrofinas por parte de la hipófisis es establecido desde la vida fetal, durante la ventana temporal de la diferenciación sexual del cerebro. Alteraciones durante esta etapa generan disfunciones en el patrón sexual característico de liberación de gonadotrofinas (McCarthy, 2011). En ratas se ha mostrado que el estrés prenatal durante la última semana de gestación genera una reducción en los niveles de LH fetales a los 19 días de

gestación (Weinstock, 2001; Shono y Suita, 2003) que sería causada por el aumento en los niveles de CRH maternos como consecuencia del estrés que a su vez inducen efectos inhibitorios sobre la producción de GnRH. De esta manera menores cantidadades de GnRH fetales modularía diferencialmente la formación del eje HHT generando consecuencias a largo plazo sobre su funcionamiento (Shono y Suita, 2003). Nuestros resultados coinciden con lo observado por el grupo de Rodríguez y colaboradores quienes demostraron que el estrés prenatal induce una reducción en los niveles de LH en ratas adultas (Rodriguez y col., 2007). No hemos encontrado antecedentes sobre los efectos a largo plazo del estrés prenatal sobre los niveles de FSH.

V 2.2.2- <u>Efectos del estrés prenatal sobre la liberación de andrógenos</u> testiculares.

Las concentraciones apropiadas de testosterona durante la pubertad son necesarias para el inicio y el mantenimiento de la espermatogénesis (Russell y col., 1998), pero también, para la aparición y el mantenimiento de caracteres sexuales secundarios y el remodelado del cerebro durante la pubertad (McLachlan y col., 2002). No obstante, varios de los efectos de la testosterona son mediados por su metabolito DHT, la cual puede ser reversiblemente oxidada a Diol tanto en testículos como en otros tejidos, incluyendo al cerebro (Auchus, 2004). Esta conversión metabólica es considerada como una forma de inactivar DHT pero a la vez, como una fuente de DHT cuando las concentraciones de la hormona son inapropiadas (Naess y col., 1975; Pettersson y col., 2009). Si bien la testosterona es el andrógeno predominante producido en los testículos maduros, la DHT y el Diol son los esteroides dominantes en los testículos inmaduros desde estadios neonatales hasta la pubertad (Podesta y Rivarola, 1974; Tapanainen y col., 1984; Killian y col., 2003; Auchus, 2004).

Los resultados de este trabajo mostraron que el estrés prenatal indujo modificaciones a largo plazo en las concentraciones séricas de los diferentes andrógenos evaluados. Por un lado, se registró un incremento en los niveles de andrógenos totales en suero (testosterona + DHT) en las ratas EP para todas las edades consideradas. Además, se registró un incremento en las concentraciones de Diol en individuos de 28 y 45 días de edad, prenatalmente

estresados. Por último, se halló una reducción en las concentraciones séricas de testosterona en individuos adultos.

Los efectos del estrés prenatal sobre los niveles en circulación de testosterona en las crías adultas ha sido estudiado por varios autores cuyos hallazgos fueron similares a los encontrados en este trabajo (Weinstock, 2001; Shono y Suita, 2003; Ward y col., 2003; Gerardin y col., 2005; Rodriguez y col., 2007). A su vez, el decremento en las concentraciones de testosterona coincide con la disminución registrada en los niveles de LH en ratas EP adultas.

El aumento en los niveles de andrógenos totales (testosterona+DHT) concomitantemente con la reducción en la concentración sérica de testosterona en crias EP, nos indujo a pensar que el aumento de andrógenos totales podría deberse a un incremento en la conversión de testosterona a DHT. Como una primera aproximación hacia la evaluación de lo anterior, se analizaron los niveles de ARNm de ambas isoformas de la enzima 5αR, responsable de la metabolización de la testosterona a DHT, en homogeneizados de testículo de ratas prepuberales y de ratas adultas. El incremento hallado en los niveles de ARNm de *Srd5a1* en ratas EP de 28 días apoyaría la teoría de que el aumento en los niveles de andrógenos totales sería a expensas de DHT. Por otra parte, siendo que la DHT se convierte reversiblemente a Diol, el incremento hallado en los niveles de este último metabolito en los individuos EP jóvenes a su vez también apoyaría lo anterior.

Alternativamente, se ha descripto que el Diol puede ser sintetizado a traves de una segunda via que no involucra testosterona como un sustrato intermedio (Auchus, 2004). Se podria especular que en la cria joven EP, el Diol se podria sintetizar por esta via alternativa como un mecanismo compensatorio a la disminución en los niveles circulates de las hormonas estimulatorias LH y FSH registrada en dichos individuos.

V 2.2.3- <u>Efectos del estrés prenatal sobre el rol de la prolactina en la liberación</u> de gonadotrofinas y andrógenos testiculares.

Como se expuso previamente, los individuos EP de 75 días de edad presentaron una reducción en las concentraciones séricas de LH y de

testosterona. A la vez, y en línea con estos resultados, los individuos adultos que habían sido expuestos a estrés durante la gestación también presentaron elevadas concentraciones basales de prolactina. La acción de la prolactina en el eje reproductor tiene lugar principalmente en el testículo, donde controla el funcionamiento de la actividad testicular y la síntesis de la testosterona. La prolactina actúa a nivel de las células de Leydig donde aumenta la expresión de los receptores a LH. Se ha descripto que un exceso de prolactina genera efectos inhibitorios sobre la reproducción masculina: la inducción de hiperprolactinemia en ratas mediante el implante de prolactinomas ó mediante la administración de sulpiride (antagonista dopaminérgico) ha mostrado generar atrofia testicular, una reducción en el número de receptores de LH, supresión en el patrón secretor de gonadotrofinas y una disminución en los niveles circulantes de testosterona (Waeber y col., 1983; Bartke, 2004). De esta manera, el aumento observado en las concentraciones de prolactina en individuos EP adultos contribuiría a la desregulación del eje reproductor. Los resultados obtenidos permitirían postular que el estrés prenatal no solo ejercería una alteración en la comunicación hipófiso-testicular alterando los niveles hormonales a lo largo de la vida del individuo, sino que también parecería producir una desregulación del eje reproductor a largo plazo, interfiriendo con las funciones moduladoras que otros ejes endócrinos ejercen sobre el eje HHT como lo es la liberación de prolactina.

V 2.3- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LA HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR DE LA DESCENDENCIA.

Las células de Leydig expresan receptores para glucocorticoides desde la etapa fetal hasta la vida adulta, motivo por el cual se ha postulado que dichas células serían vulnerables a la acción de los esteroides adrenales cuando éstos se encuentran en exceso. En coincidencia con las investigaciones que han mostrado que los glucocorticoides disminuyen la tasa de mitosis de las células de Leydig y que además inducen apoptosis (Gao y col., 2002; Pedrana y col., 2008), los resultados obtenidos mostraron que el estrés prenatal indujo una disminución a largo plazo en el número de células de Leydig por cm³.

Por otra parte, se evaluaron los efectos del estrés prenatal sobre la maduración del epitelo germinal del túbulo seminífero utilizando el criterio de clasificación de Johnsen (Johnsen, 1970). Los resultados obtenidos mostraron que el estrés aplicado durante la gestación indujo un avance en los estadios de maduración del epitelio germinal en individuos de 35 y de 60 días de edad. Al mismo tiempo, el incremento en el diámetro tubular medio de túbulos seminiferos de ratas EP confirmaría lo anterior ya que a mayor cantidad de células en estadios espermatogénicos avanzados, mayor es el diámetro tubular.

El proceso de espermatogénesis depende de la estimulación ejercida por la FSH en el testículo. Debido a que en nuestro trabajo las concentraciones séricas de la gonadotrofina se encontraron disminuídas en individuos EP prepuberales, se especuló que tal vez otro mecanismo adicional a la estimulación ejercida por FSH podría estar participando en este avance en la maduración del epitelio germinal inducido por el estrés prenatal. En efecto, algunos autores han demostrado que la espermatogénesis podría ser iniciada y mantenida en ausencia aparente de la estimulación ejercida por la FSH (Russell y col., 1998; McLachlan y col., 2002; O'Shaughnessy y col., 2010). Estudios previos demostraron que el bloqueo de la acción androgénica en los testículos ya sea mediante la administración de un antagonista del AR, o por la supresión intratesticular de LH o testosterona, inducía un aumento significativo en la concentración testicular de DHT y de Diol mediante la regulación positiva de la actividad de las enzimas 5αR. Dichas ratas producían espermatozoides a pesar de la supresión hormonal (McLachlan y col., 2002). Por otra parte experimentos en los cuales se realizaban implantes intratesticulares con DHT demostraron que cuando el metabolito se encontraba en exceso, reducía los niveles séricos de LH y disminuía las concentraciónes de testosterona intratesticulares. Al mismo tiempo se ha mostrado que la DHT es más efectiva que la testosterona en mantener la espermatogénesis cuando ambas son administradas (en concentraciones comparables) de manera intra-testicular (Chen y col., 1994). Asimismo la DHT y el Diol, pero no la testosterona, han mostrado estimular la tasa meiótica en las espermatogonias (Chemes y col., 1976; Killian y col., 2003). Se ha observado que la primera ola espermatogénica en la rata coincidía con los picos de actividad de ambas isoformas de la 5αR y con los picos de concentraciones intra-testiculares de los metabolitos producidos por su acción. No así con los picos de la testosterona. En conjunto, estas observaciones también apoyarían la teoría de que en nuestro sistema el aumento de Diol y de andrógenos totales, como consecuencia de una regulación positiva de la enzima 5αR1, serían los responsables del avance en la espermatogénesis observado incluso a pesar de la reducción en los niveles de gonadotrofinas y del número de células de Leydig también registrados en nuestro sistema. Por el momento no disponemos de evidencias experimentales acerca de si dicho avance en la producción de espermatozoides podría significar alguna anticipación de las funciones reproductivas. Tampoco se han realizado analisis de la cantidad o calidad del esperma producido por las crías adultas.

Además de la información genética los factores ambientales juegan un rol muy importante en el remodelado de diferentes fenotipos y de la capacidad reproductiva que tendrá el individuo. La desnutrición materna y el estrés gestacional han mostrado ser señales de gran importancia durante el desarrollo fetal. Desde el punto de vista evolutivo si las condiciones del medio externo son hostiles y la supervivencia representara un riesgo, sería entonces muy ventajoso para la especie programar al eje reproductivo a modo de asegurar un avance en la maduración del mismo, incluso a expensas de que el crecimiento corporal no sea aún el adecuado. Sería posible pensar que el bajo peso corporal registrado en la prepubertad, el aumento en las concentraciones de andrógenos totales y el avance en la espermatogénesis sería una respuesta adaptativa que permitieran a los individuos prenatalmente estresados anticipar su capacidad reproductiva cuando las condiciones externas son hostiles, como fuera discutido por el grupo de Schöpper y colaboradores.(Schopper y col., 2012).

V 2.4- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LOS RECEPTORES TESTICULARES A HORMONAS SEXUALES.

V 2.4.1- Efectos del estrés prenatal sobre el AR.

Teniendo en cuenta nuestros resultados sobre los niveles circulantes de gonadotrofinas y andrógenos en ratas EP se decidió explorar en mayor profundidad los efectos del estrés prenatal sobre el estado del AR en el testículo. En una primera instancia se observó que la expresión proteica del receptor solamente se encontraba afectada por el estrés gestacional en individuos EP adultos. Este resultado coincidía con los menores niveles de testosterona y de LH circulantes en suero observados en nuestro sistema. Sin embargo el análisis de niveles de ARNm del receptor mostro que las ratas prepuberales, no así las adultas, que habían sido expuestas a estrés gestacional presentaban mayores niveles de mensajero que las controles. Al mismo tiempo una mayor inmunoreactividad en las células de Sertoli fue observada al DPN 35 de ratas EP, sugiriendo una mayor expresión del receptor en dichas células. Se ha encontrado que la expresión del AR en las células de Sertoli (no así, en las células de Leydig o peritubulares), es esencial para la acción androgénica sobre la estimulación de las espermatogonias y el desarrollo de los espermatocitos en ratas con el gen del receptor AR silenciado en cada uno de los tres tipos celulares (Rey y col., 2009; O'Shaughnessy y col., 2010). Estas observaciones apoyarían la hipótesis de que un aumento en el número de metabolitos derivados de la 5α-reducción de la testosterona presente en ratas puberales, en combinación con un aumento de la expresión del AR en las células de Sertoli, podría ser responsable del avance en la maduración de tipos celulares específicos, de esta manera acelerando el proceso de espermatogénesis.

V 2.4.2- <u>Efectos del estrés prenatal sobre los niveles de ARNm del Esr1, Esr2 y</u> <u>Cyp19</u>.

Por último si bien los andrógenos cumplen un rol principal en la maduración del epitelio germinal y en la regulación endocrina de la espermatogénesis, los estrógenos también juegan un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de la función reproductiva y la fertilidad. Se ha sugerido que un balance adecuado entre andrógenos y estrógenos sería necesario para mantener la función reproductiva (Lucas y col., 2011). La acción de la enzima P450 aromatasa cataliza la transformación irreversible de andrógenos en estrógenos. Esta enzima se ha registrado en el retículo endoplasmático de numerosos tejidos de vertebrados y en particular, en los testículos de los mamíferos, en diferentes tipos celulares variando de acuerdo a la edad del individuo. En ratas inmaduras, su localización se ha registrado principalmente

en las células de Sertoli, mientras que en adultos se localiza principalmente en las células de Leydig. Asimismo también se ha encontrado que las células germinales de individuos adultos también son una fuente de aromatasa (Carreau y col., 2003). En este trabajo de tesis, no se hallaron diferencias entre grupos experimentales para ninguna de las edades evaluadas en cuanto a los niveles de ARNm de la enzima.

Por otra parte los estrógenos ejercen su acción mediante la unión a los ER específicos, que a su vez modulan la transcripción de genes específicos. La expresión de ambas isoformas varía según el tejido, estado de desarrollo y edad del individuo. En ratas se ha reportado que la expresión de los ARNm de ambos ERs no cambia en homogeneizados totales de testículos de 10 a 30 días de vida, mientras que sus niveles incrementan en ratas desde 30 a 70 días. En ratas adultas la expresión del ARNm del Esr1 se ha registrado más elevada en el túbulo seminífero que en el compartimento intersticial, mientras que la expresión del Esr2 se expresa por igual en ambos compartimentos testiculares (Lucas y col., 2011). En nuestro sistema, el estrés prenatal no generó efectos en la expresión de mensajero de ambas isoformas del receptor, para ninguna de las edades contempladas. A pesar de no haberse cuantificado los niveles de estrógenos en circulación en los individuos prenatalmente estresados, estos resultados indicarían que al menos la expresión de la maquinaria de síntesis y acción de estrógenos en el testículo de las crías EP no se vería afectada por el estrés prenatal, al menos en las dos edades tenidas en cuenta.

V 2.5- CONCLUSIONES DEL CAPITULO 2.

Los efectos del estrés prenatal sobre la actividad del eje reproductor han sido ampliamente explorados y se han registrado alteraciones que van desde el patrón de liberación de hormonas sexuales hasta modificaciones en el comportamiento reproductor de la descendencia (Shono y Suita, 2003; Gerardin y col., 2005; Scott y col., 2009; Kapoor y Matthews, 2011). La acción inhibitoria de los glucocorticoides sobre los picos perinatales de testosterona y de enzimas esteroideogénicas ha mostrado ser los responsables de la femeinización del comportamiento sexual de los machos, así como también, de la inducción de alteraciones en el funcionamiento del eje HHT (Ward y Weisz,

1984; Gao y col., 2002; Hardy y col., 2005; Scott y col., 2009). No obstante los efectos a largo plazo del estrés prenatal sobre los perfiles hipofisarios y testiculares, así como también sobre el funcionamiento testicular, han sido poco explorados. Los resultados expuestos en este trabajo señalan que el estrés maternal durante la última semana de gestación induce consecuencias a largo plazo sobre el sistema reproductor masculino de la descendencia. En especial el patrón de liberación de hormonas hipofisarias y testiculares, así como también, el desarrollo testicular serían principalmente afectados por el estrés prenatal. Las alteraciones halladas en los parámetros de la morfología sexual externa de las ratas EP, tales como la menor distancia anogenital y el retraso en el descenso testicular, indicarían que durante la ventana temporal crítica del desarrollo sexual del cerebro los niveles de andrógenos en circulación fueron insuficientes. De esta manera, el eje HHT podría haber sufrido alteraciones en su formación y por esta razón los patrones de liberaciones hormonales podrían verse modificados en los individuos prenatalmente estresados. En este aspecto, los resultados obtenidos en nuestro trabajo mostraron que el estrés prenatal indujo un aumento en las concentraciones de andrógenos totales (testosterona+DHT) en todas las edades evaluadas. Al mismo tiempo en individuos prepuberales el estrés prenatal indujo una disminución en los niveles de gonadotrofinas, aumentó las concentraciones séricas de Diol e indujo un incremento en los niveles testiculares de ARNm de la enzima 5αR1 y del AR. Durante la pubertad, el estrés prenatal produjo un avance en la maduración del epitelio germinal del testículo de las crías EP, junto a una mayor inmunomarcación para el AR en las células de Sertoli y niveles aumentados de Diol. Por último, en individuos adultos, el estrés prenatal produjo una reducción en los niveles de LH y testosterona que a su vez coincidirían con los efectos negativos sobre el eje reproductor inducidos por la hiperprolactinemia registrada en dichos individuos adultos.

Podría postularse que el incremento en los niveles de Diol y de andrógenos totales, conjuntamente al aumento en los niveles del AR en las células de Sertoli, podrían ser los responsables del avance en la espermatogénesis hallada en los individuos prenatalmente estresados. Dicho avance a su vez

podría pensarse como una estrategia evolutiva ya que la percepción intrauterina del estrés sería traducida al feto como una señal de "ambiente hostil". De esta manera los mecanismos que desencadenan la reproducción podrían anticiparse asegurando la preservación de la especie.

CAPITULO 3

ESTRES PRENATAL Y SISTEMA DOPAMINERGICO MESOCORTICO-LIMBICO EN RATAS PREPUBERALES Y ADULTAS

El sistema dopaminérgico mesocórticolímbico está asociado a funciones cognitivas y a diversos comportamientos que tienen que ver con la percepción del entorno, los estados de ánimo y la integración entre la voluntad con la toma de decisiones. La exposición ante una situación de estrés en forma aguda interfiere con la síntesis, la liberación y el metabolismo de la DA, mientras que la exposición a situaciones de estrés en forma crónica originan cambios del tipo adaptativos en el funcionamiento del sistema (Cabib y Puglisi-Allegra, 1996). Se ha descripto que las crías de ratas expuestas a diferentes agentes estresantes durante la última semana de gestación presentaban un retraso en el desarrollo motor temprano, menor capacidad adaptativa frente a situaciones estresantes, modificaciones en el comportamiento sexual y déficits de aprendizaje (Weinstock, 2001; Huizink y col., 2004). Muchas de estas situaciones se han atribuido a alteraciones en diversos puntos de la neurotransmisión dopaminérgica (Fride y Weinstock, 1989; Henry y col., 1995; Diaz y col., 1997). Por esta razón, varios autores han sugerido que las alteraciones en dichas vías como consecuencia del insulto perinatal estarían asociadas a la incidencia en psicopatías tales como la esquizofrenia, el ADHD y adicción a sustancias de abuso (Deutch, 1993; Weinstock, 2001; Kinney y col., 2008). Si bien los efectos del estrés prenatal sobre el cerebro en desarrollo de la descendencia son inmediatos, también se ha descripto que algunos de los cambios inducidos por el estrés se pondrían de manifiesto a largo plazo. El cerebro adquiriría una mayor vulnerabilidad al desarrollo de psicopatías durante etapas críticas del desarrollo y la maduración cerebral, como por ejemplo la adolescencia (Diaz y col., 1997). En efecto, varias de las disfunciones en el sistema dopaminérgico inducidas por el estrés prenatal se manifiestan en períodos anteriores o posteriores a dicha etapa (Henry y col., 1995; Diaz y col., 1997; Silvagni y col., 2008; Katunar y col., 2010) señalando que las hormonas gonadales podrían estar cumpliendo un rol muy importante en este aspecto (Huttenlocher, 1979).

Teniendo en cuenta el desbalance hallado en los niveles de andrógenos en circulación en crias EP, estudiamos el rol activacional de las hormonas sexuales sobre un sistema dopaminérgico mesocórticolímbico ya vulnerabilizado por la exposición al insulto prenatal.

V 3.1- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LOS RECEPTORES A HORMONAS SEXUALES EN CEREBRO.

Los efectos del estrés prenatal sobre la morfología de áreas cerebrales sexualmente dimórficas, la distribución de los receptores a estrógenos en el hipotálamo y el comportamiento sexual de la cría macho han sido ampliamente descriptos en ratas (Henry y col., 1996; Weinstock, 2001; Gerardin y col., 2005). Sin embargo, los efectos del estrés gestacional sobre la expresión de receptores a hormonas sexuales en áreas cerebrales extra-hipotalámicas han sido poco explorados. Nuestros resultados mostraron que de los tres receptores a hormonas sexuales evaluados solamente se vió afectada por el insulto prenatal la expresión del ERa, donde se registró una disminución en los niveles proteicos del mismo tanto en la CPF como en el HPC de individuos adultos. En esta última área, también se observó que el estrés prenatal indujo una reducción en los niveles de mensajero para el receptor.

El rol de los estrógenos sobre el SNC ha sido muy estudiado durante los últimos años. Además del rol organizacional sobre el cerebro, se ha demostrado que los estrógenos participan en la protección de estructuras neurales previniendo la muerte celular e induciendo efectos antioxidantes en diversos modelos experimentales de daño neural. También se ha observado que los estrógenos promueven el desarrollo de arborizaciones dendríticas y sinaptogénesis. Por último han sido estudiados como posibles agentes de uso terapéutico en pacientes con enfermedades mentales o neurodegenerativas (McEwen y Alves, 1999; Kuppers y col., 2000; Solum y Handa, 2002; Wilson y col., 2011). Tanto en la CPF como en el HPC, la acción de los estrógenos sobre la modulación de la cognición y la promoción de procesos neurales sería inducida mediante su unión al ERα, cuya presencia se ha registrado en los somas de las neuronas piramidales corticales e hipocampales. Además en el HPC la presencia del receptor también se ha encontrado en las células de la glía (McEwen y Alves, 1999; Solum y Handa, 2002; Wilson y col., 2011). La

disminución en los niveles de estrógeno en el HPC se ha relacionado con una reducción en los procesos de potenciación a largo plazo, una menor adquisición de la memoria espacial en la prueba del *wáter maze* y una menor memoria de trabajo (McEwen y Alves, 1999). Uno de los probables mecanismos mediante los cuales los estrógenos podrían influir sobre el desarrollo de procesos neuronales es por su acción estimulante sobre la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, de sus siglas en inglés: *brain-derived neurotrophic factor*) durante el desarrollo cerebral de la rata. Este factor es importante para la supervivencia y el crecimiento neural ya que regula el crecimiento axonal y dendrítico, a la vez que interviene en la transmisión sináptica (Solum y Handa, 2002).

De esta manera, la acción benéfica de los estrógenos sobre la modulación de procesos cognitivos y morfología neural en los machos adultos prenatalmente estresados podría verse afectada en individuos adultos al poseer una menor cantidad de receptor disponible para la acción hormonal. Varios de los efectos descriptos por el estrés prenatal tales como disfunciones cognitivas (Weinstock, 2001; Huizink y col., 2004; Mastorci y col., 2009), menores procesos neurales en los individuos adultos (Barros y col., 2006) y una reducción en la expresión del BDNF en CPF e HPC (Fumagalli y col., 2004; Van den Hove y col., 2006), coinciden con una disminución en la acción de los estrógenos sobre el sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico.

Siendo que en este trabajo de tesis se halló una reducción en los niveles del receptor solamente en las crías EP adultas, pero no así en prepuberales, el recambio del ERα parecería estar sujeto al rol activacional de las hormonas gonadales durante la pubertad y no a un efecto prenatal directo. De esta manera el exceso de andrógenos registrado en las ratas prenatalmente estresadas podría modular de forma diferencial la biodisponibilidad de receptor en el cerebro adulto en las ratas expuestas al estrés gestacional.

V 3.2- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LOS NIVELES DE ENZIMAS ESTEROIDEOGENICAS EN AREAS MESOCORTICO-LIMBICAS.

La presencia y acción de los diversos neuroesteroides derivados de la testosterona en el cerebro varían de acuerdo al sexo, la especie y la etapa de

la vida en la cual se esté realizando el análisis de los mismos. La acción de las hormonas gonadales sobre la "ventana temporal crítica del desarrollo cerebral" donde ocurre la diferenciación sexual del cerebro ha sido ampliamente estudiada: se ha demostrado que el estrés prenatal disminuye los picos perinatales de testosterona, e interfiere sobre la actividad perinatal de las enzimas aromatasa y 5αR (Ward y Weisz, 1984; Ordyan y Pivina, 2005; Weinstock, 2008). Sin embargo los efectos a largo plazo del estrés prenatal sobre los neuroesteroides y las enzimas esteroideogénicas ha sido poco explorados, por lo que decidimos indagar en mayor profundidad sobre los efectos del estrés gestacional sobre los niveles de ARNm de las enzimas aromatasa y ambas isoformas de la 5αR en individuos prepuberales y adultos en las áreas cerebrales de CPF e HPC. Los resultados mostraron que el estrés prenatal no indujo diferencias en los niveles de ARNm de la Srd5a1, ni de Srd5a2 para ninguna de las edades evaluadas. Al mismo tiempo no pudieron detectarse niveles de mensajero de Cyp19 en ninguna de las edades consideradas y en ninguno de los grupos experimentales. A pesar de que la expresión de la enzimas aromatasa y 5αR2 son dependientes de los niveles de andrógenos (Torres y Ortega, 2003; Tsuruo, 2005), los resultados hallados sugieren que al menos para las edades consideradas, ni el estrés prenatal, ni los elevados niveles de andrógenos inducidos por el mismo, intervinieron en la expresión del ARNm de las enzimas esteroideogénicas.

V 3.3- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LOS D2R EN AREAS MESOCORTICO-LIMBICAS.

Los efectos del estrés prenatal sobre los receptores dopaminérgicos han sido descriptos (Henry y col., 1995). Resultados previos del laboratorio mostraron que el estrés prenatal por inmovilización produjo un aumento significativo de los receptores D2R en la CPF, NAc y la región CA1 del HPC de ratas adultas de 90 días (Berger y col., 2002), mientras que resultados preliminares habían mostrado una disminución en la expresión del D2R en HPC de ratas EP de 21 y 28 DPN. En este trabajo de tesis, los resultados mostraron que el estrés prenatal indujo efectos sobre la expresión proteica del receptor solamente en estadios prepuberales, donde se registró una disminución del D2R en el HPC y un significativo incremento en la expresión del receptor en la región del VTA. A

edades adultas, y a diferencia de los resultados observados por Berger y colaboradores (2002) no se registraron diferencias significativas entre grupos experimentales en cuanto al nivel de expresión proteica del receptor para ninguna de las tres áreas evaluadas. La discrepancia hallada entre los resultados previos del laboratorio y los actuales podría deberse principalmente a que en este trabajo de tesis, la evaluación de la expresión proteica del D2R se llevó a cabo a partir de homogeneizados totales de tejido provenientes de las áreas CPF, HPC y VTA, mientras que la cuantificación del receptor en los resultados reportados por Berger y colaboradores se realizó mediante la técnica de radioautografía cuantitativa. Esta última técnica permite analizar de forma altamente específica la cantidad de receptor D2 mediante su unión específica al ligando radioactivo en cortes histológicos de cada área en cuestión, mientras que la técnica de Western blot podria no estar detectaando las diferencias, debido a su menor especificidad.

El aumento en la expresión proteica del D2R registrado en el VTA de los individuos EP de 28 días podria estar asociado al incremento en el factor de transcripción Nurr1 en la misma área mesencefálica de ratas prenatalmente estresadas de la misma edad (Katunar y col., 2009). Durante el desarrollo fetal dicho factor es fundamental para la determinación del fenotipo de neurona dopaminérgica, supervivencia, migración e inervación de dichas neuronas. Luego, a lo largo de la vida del individuo, Nurr1 estaría involucrado en el mantenimiento del metabolismo dopaminérgico a través de la regulación en la expresión de enzimas determinadas, y también mantendría la supervivencia de las neuronas mesodiencefálicas. Recientemente se ha demostrado que la activación de Nurr1 mediante cascadas de señalización dependiente de quinasas favorece las propiedades dompaminotróficas del D2R durante el desarrollo (Chung y col., 2005). Coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, estudios preeliminares del laboratorio han registrado una mayor actividad de la enzima TH en el NAc de las ratas EP prepuberales. El aumento de la transmisión dopaminérgica de este sistema ha sido relacionado con la adicción y con efectos de sensibilización luego de la exposición repetida a drogas de abuso. Como consecuencia de las modificaciones halladas en

estas áreas, las respuestas cerebrales dependientes de este receptor se verán alteradas y con ellas los comportamientos dependientes de la DA.

Las áreas en donde los receptores dopaminergicos se hallaron mayormente alterados por el estrés prenatal, conforman parte del sistema dopaminérgico mesolímbico. Se ha registrado la presencia del D2R en el hipocampo dorsal, que a su vez recibe conexiones dopaminérgicas desde el VTA. La acción del D2R en el HPC estaría involucrada en los procesos de memoria y en la respuesta al estrés (Kamei y col., 1995). En humanos se ha registrado una reducción del D2R en el HPC de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y dicha reducción además se correlacionaba con fallas en la memoria. Esta ampliamente demostrado que la exposición a eventos estresantes tempranos se relaciona con el autismo, el desarrollo de ADHD, y a una mayor predisposición a padecer desórdenes de conducta durante la infancia en el humano (Kinney y col., 2008), así como alteraciones en el aprendizaje y la memoria en animales de experimentación (Weinstock, 2001; Huizink y col., 2004; Son y col., 2006; Mastorci y col., 2009). Por otra parte, y en línea con los resultados expuestos, el grupo de Bowman y colaboradores (2004), han registrado una reducción en el número de metabolitos dopaminérgicos en el hipocampo en machos prenatalmente estresados (Bowman y col., 2004). Tomados en su conjunto las alteraciones observadas en el número del D2R en nuestro sistema en las distintas áreas cerebrales podrían estar involucradas la mediación de dichos receptores sobre los comportamientos mencionados.

V 3.4- EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL SOBRE LAS ARBORIZACIONES DENDRITICAS.

Estudios previos del laboratorio, mostraron una reducción en la inmunoexpresión de MAP2 en CPF, CPu e HPC de crías de 90 días sugiriendo que el estrés prenatal reduciría las arborizaciones dendríticas en dichas áreas (Barros y col., 2006). Asimismo, el grupo de Hayashi y colaboradores (1998) describió una disminución en la densidad de las sinapsis en el estrato radiado del área CA3 del HPC en ratas adolescentes prenatalmente estresadas (Hayashi y col., 1998) y estudios recientes del grupo de Martinez-Tellez y colaboradores (2009) han mostrado que el estrés prenatal induce una

disminución en el largo y complejidad de las espinas dendríticas en la región de CA1 a los 65 DPN (Martinez-Tellez y col., 2009). De esta forma, el estrés prenatal se ha postulado como un agente capaz de afectar los procesos de eliminación o poda dendrítica y sináptica que ocurren normalmente desde la pubertad hasta la vida adulta (Huttenlocher, 1979), además de alterar la regulación de la síntesis proteica neural produciendo un excesivo recorte de la sinapsis y una menor síntesis de MAP2 en el cerebro.

En función de extender dichos hallazgos se evaluó el estado de los procesos neurales individuos prenatalmente estresados durante prepuberales. Para ello se tuvieron en cuenta las regiones cerebrales del estrato radiado del área CA1 del HPC y las capas II y III de la CPF de individuos C y EP de 28 días de vida. Los resultados mostraron que el estrés prenatal indujo una reducción en la inmunoreactividad para MAP2 en ambas áreas evaluadas, sugiriendo que la reducción de los procesos neuronales previamente descripta en individuos adultos se evidencia también en etapas previas a la adolescencia. Por otra parte, resultados preliminares del laboratorio donde se analizó el efecto del estrés prenatal sobre la expresión de MAP2 en VTA de ratas de 28 y 60 días arrojó un resultado similar: el estrés prenatal indujo una reducción en el número de células con marca inmunopositiva para MAP2 en ambas edades.

El proceso de neurogénesis en la rata comienza en la amígdala y en el hipotálamo alrededor del DG 12, en diversas regiones corticales alrededor del DG 14 y en las regiones CA1-CA3 del HPC alrededor del DG 15. El número de sinapsis, incluyendo elementos pre- y post- sinápticos, continúa aumentando durante las primeras semanas de vida en la rata y desde la infancia hasta la adolescencia en el humano. El establecimiento y maduración de circuitos sinápticos eficientes es esencial para el desarrollo de funciones cerebrales normales. Dado que la transmisión sináptica ocurre en las espinas dendríticas, los cambios que ocurran en su densidad o morfología generarán diferencias funcionales a nivel de la sinapsis (Segal, 2010). Por ejemplo, la reducción en la complejidad y largo de las espinas dendríticas en la región CA1 ha sido asociado a impedimentos de aprendizaje y a una reducción en la potenciación a largo plazo del hipocampo en crías EP (Weinstock, 2011). En relación a la

CPF, se ha mostrado que el estrés prenatal redujo la densidad de espinas apicales y basales de las capas II y III, al igual que lo observado en este trabajo de tesis, y que dicho efecto se correlacionaba con un incremento en los comportamientos del tipo "ansiosos" en individuos prepuberales de ambos sexos (Weinstock, 2011).

La densidad de las espinas dendríticas puede ser regulada por múltiples factores tales como el aprendizaje, la exposición a fármacos o a situaciones de estrés (MacLusky y col., 2006; Zhang y col., 2010; Weinstock, 2011). Por otra parte, se ha encontrado que los andrógenos y sus metabolitos también son capaces de modular la densidad de los contactos sinápticos y de las espinas dendríticas en la región CA1 hipocampal. La remoción de la acción hormonal mediante gonadectomías ha mostrado reducir drásticamente dichos parámetros incluso en ratas adultas, mientras que la morfología neural se recuperaba si las ratas recibían testosterona o DHT de manera exógena (MacLusky y col., 2006). Resultados similares fueron observados en cultivos neurales, donde la testosterona incrementaba la supervivencia e inducía un aumento en el largo y en el número de arborizaciones dendríticas neuronales (Kawashima y Takagi, 1994). En nuestro modelo observamos que, a pesar de encontrar niveles elevados de andrógenos totales que podrian estar estimulando la morfologia neural, las arborizaciones dendríticas se encuentran notoriamente disminuidas. Esto nos estaría indicando que el insulto prenatal estaría pautando la morfologia neuronal desde la gestación y los andrógenos no serían suficientes para revertir este patrón.

V 3.5- CONCLUSIONES DEL CAPITULO 3.

Los días embrionarios 4 al 21 constituyen un período crítico en el desarrollo de la mayoría de las áreas cerebrales en las ratas. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el estrés sufrido por la madre gestante durante este período crítico del desarrollo, produce modificaciones en el sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico que estarían asociados a la vulnerabilidad de la cría al desarrollo de respuestas comportamentales disfuncionales y desórdenes cognitivos frente a situaciones estresantes. En nuestras condiciones experimentales el estrés prenatal indujo modificaciones sobre la morfología neural y sobre el recambio en la expresión del receptor

dopaminérgico del tipo D2 y la expresión del receptor de estrógenos alfa. No obstante el estrés prenatal no alteró la expresión de enzimas esteroideogénicas, sugiriendo que la fuente de hormonas sexuales que podrían modular los efectos del estrés en nuestro sistema sería de origen gonadal y no producto de un aumento en su síntesis local cerebral. Además de la magnitud de los cambios observados como consecuencia del estrés, también nos llamó particularmente la atención el hecho de que mientras algunos efectos persistían a lo largo de toda la vida del individuo, otros cambios desaparecían (o emergían) luego de la pubertad. Sugiriendo que determinados procesos plásticos como las arborizaciones dendríticas serían programados en etapas neonatales y los efectos hormonales durante la pubertad no actuarían o inducirían cambios poco significativos sobre la morfología neural. En cambio el patrón en el recambio de receptores a estrógenos y dopaminérgicos presentó variaciones según si se evaluaban sus niveles antes o luego de la pubertad. De esta manera si bien la disponibilidad a estos receptores podría encontrarse pautada desde etapas prenatales y alteradas como consecuencia del insulto prenatal, los altos niveles de hormonas gonadales podrían redireccionar el patrón en la adultez.

CAPITULO 4

ADMINISTRACION PRENATAL DE FLUTAMIDA Y SISTEMA DOPAMINERGICO MESOCORTICO-LIMBICO EN RATAS PREPUBERALES Y ADULTAS.

A nivel perinatal los esteroides gonadales han mostrado organizar sustratos neurales que luego son nuevamente modulados por la acción de las hormonas sexuales durante la pubertad. Se ha discutido ampliamente el rol supresor del estrés prenatal sobre los picos perinatales de testosterona y las consecuencias que dicho efecto conlleva sobre la organización del comportamiento sexual, sobre la regulación de los ejes reproductores y sobre la morfología de las áreas cerebrales dimórficas de la descendencia. Sin embargo, aun no han sido exploradas las consecuencias a largo plazo sobre la supresión del rol organizacional de los andrógenos sobre otros circuitos neurales, en especial aquellos que regulan comportamientos mayores como el sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico.

La presencia de alteraciones en parámetros de la morfología sexual externa en las ratas prenatalmente estresadas de este trabajo de tesis ha sido directamente asociada con la presencia de una disfunción en los picos perinatales de testosterona. Al mismo tiempo, en este trabajo se ha mostrado que dichos individuos presentaban niveles anormales de andrógenos testiculares en circulación. Por último, observamos que el estrés prenatal inducía disfunciones a largo plazo sobre el sistema dopaminérgico mesocórticolímbico, aunque la manifestación de algunas de estas permanecían durante toda la vida del individuo estresado mientras que otras emergían (o desaparecían) luego de la pubertad sugiriendo que el rol activacional de las hormonas gonadales podría estar actuando en la expresión de dichos efectos. A fin de explorar los efectos organizacionales que las hormonas gonadales podrían inducir sobre la morfología neural, se utilizó un modelo de manipulación prenatal con flutamida. La flutamida es un antagonista del receptor de andrógenos, cuya administración prenatal ha mostrado inducir

efectos supresivos sobre la maduración sexual y el comportamiento reproductor en ratas (Clemens y col., 1978).

V 4.1- EFECTOS DE LA ADMINISTRACION PRENATAL DE FLUTAMIDA SOBRE PARAMETROS MATERNOS Y DE LA CAMADA.

Tanto la administración subcutánea de solución vehículo como de solución conteniendo flutamida desde los DG 15 al 21 disminuyeron la ganancia de peso corporal total durante la preñez en comparación a la ganancia de peso corporal registrada en hembras que no fueron perturbadas durante la gestación. Si bien la reducción registrada era de mucho menor magnitud que la hallada en hembras que habían sido expuestas al protocolo de estrés por inmovilización durante la gestación, los resultados muestran que la manipulación de la rata preñada y la administración de una inyección subcutánea constituyen un evento estresante *per se*. Al mismo tiempo, tanto al día siguiente de iniciado el tratamiento como hacia el final de la gestación la ganancia de peso corporal diaria hallada en las hembras FLU fue menor que la registrada en las hembras VEH.

V 4.2- EFECTOS DE LA ADMINISTRACION PRENATAL DE FLUTAMIDA SOBRE PARAMETROS DEL DESARROLLO SEXUAL DE LAS CRIAS Y LAS CONCENTRACIONES SERICAS DE TESTOSTERONA.

Existen varios antecedentes que muestran que la inhibición de la acción androgénica durante etapas críticas del desarrollo sexual del cerebro inhibe el descenso testicular y altera la morfología de los genitales de la rata (McCormick y Mahoney, 1999; Casto y col., 2003). En el presente estudio y, al igual que lo observado por el grupo de Casto y colaboradores (2003), la administración prenatal de flutamida hizo imposible diferenciar a las crías de acuerdo a su sexo al momento del nacimiento: la distancia anogenital, la apariencia externa de los genitales al igual que el área del escroto era similar entre machos y hembras. Al mismo tiempo todos los individuos de las camadas FLU presentaban brotes mamarios, que generalmente se encuentran presentes solamente en las crías hembra. Por otro lado, la reducción en la distancia anogenital hallada en las ratas prenatalmente expuestas a flutamida se mantuvo en el tiempo: hacia el DPN 40 recién pudo observase una distancia

anogenital significativamente diferente entre machos y hembras FLU (resultados no mostrados), sin embargo la misma seguía siendo menor que la de las ratas VEH de la misma edad incluso hacia los 75 días de vida (McCormick y Mahoney, 1999; Casto y col., 2003). Al mismo tiempo se registró una formación anómala del pene donde el seno urogenital no se hallaba completamente sellado y la uretra se encontraba en una posición más basal en comparación a la de los individuos VEH. Otros autores también describieron un efecto similar de la flutamida sobre la formación del pene (Imperato-McGinley y col., 1992) e incluso se ha descripto la presencia de una "vagina ciega" y no funcional (Casto y col., 2003; Goto y col., 2004). A su vez, la administración prenatal de flutamida indujo un retraso en el descenso testicular de los individuos expuestos a este tratamiento, pero además un bajo porcentaje de ratas por camada presentó uno de ambos testículos en la cavidad abdominal, el cual presentaba un menor tamaño y una menor irrigación sanguínea (Goto y col., 2004). Dicha patología se conoce con el nombre de "criptorquidia" y sucede cuando los niveles de andrógenos perinatales son inapropiados y generan un canal inguinal disfuncional que impide el descenso del testículo al escroto (Goto y col., 2004). La variación intra-camada registrada en la incidencia de dicho efecto estaría dada por la exposición fetal concentraciones desiguales de la droga inyectada en la madre según su ubicación en la placenta (van der Schoot, 1992).

Se ha descripto que la administración prenatal de la flutamida inducía una reducción del peso testicular, como también del epidídimo, la próstata y vesículas seminales. En este trabajo solamente se han registrado diferencias en el índice órgano-somático de las vesículas seminales de individuos FLU donde tanto en individuos prepuberales como adultos dichas estructuras se hallaban visiblemente atrofiadas en relación a las vesículas seminales de ratas VEH. Algunos autores han descripto que la administración de dosis iguales o mayores de flutamida a la utilizada en este trabajo bloquea la formación de la vesícula, no haciéndose presente en los individuos FLU adultos.

En relación a los efectos de la administración prenatal de flutamida sobre las concentraciones en suero de testosterona, no se observaron alteraciones en los niveles de hormona para ninguna de las edades analizadas coincidiendo

con los hallazgos de otros autores para la dosis de flutamida utilizada (Casto y col., 2003).

Por último se ha postulado que el mecanismo mediante el cual la flutamida ejercería sus efectos sobre el individuo en desarrollo, como los hallados en este trabajo, sería al interferir con la aromatización de la testosterona. Si bien dicho efecto ocurriría naturalmente ya que al unirse al AR la flutamida disminuiría la disponibilidad de testosterona capaz de interactuar con su receptor, también se ha mostrado que la ocupación del AR controla a su vez la expresión de la enzima aromatasa (Casto y col., 2003).

V 4.3- EFECTOS DE LA EXPOSICION PRENATAL A FLUTAMIDA SOBRE LA MORFOLOGIA NEURAL DEL SISTEMA DOPAMINERGICO MESOCORTICO-LIMBICO.

Teniendo en cuenta las alteraciones descriptas en el metabolismo dopaminérgico mesocórticolímbico en las crías prenatalmente estresadas fue que nos interesó explorar en mayor profundidad el efecto organizacional de los andrógenos en los cambios plásticos en las áreas que constituyen dicho circuito en estadios prepuberales y adultos.

V 4.3.1- Arborizaciones dendríticas.

La administración prenatal de flutamida indujo una reducción en la inmunomarcación para MAP2 en las neuronas del VTA, el HPC y la CPF en ambas edades evaluadas, sugiriendo la existencia de una reducción de los procesos neuronales en el sistema dopaminérgico mesocórticolímbico.

Estudios previos han evaluado los efectos de la administración perinatal de flutamida a las crías recién nacidas y han mostrado que en etapas prepuberales éstas presentaban una reducción en el número de neuronas maduras en la región CA1 y en el giro dentado del hipocampo, así como también una menor densidad de espinas dendríticas (Zhang y col., 2010). Los hallazgos de dichos investigadores sugirieron que la presencia perinatal de andrógenos y sus metabolitos era fundamental para la formación de espinas sinápticas durante el desarrollo del hipocampo, así como también para la inducción de neurogénesis.

Se ha postulado que los efectos neonatales de los andrógenos sobre los procesos neuronales sería el de preparar a las neuronas a responder a claves ambientales que disparen el desarrollo de arborizaciones dendríticas en estadios posteriores del desarrollo. En este sentido la administración neonatal de flutamida bloquearía dicho efecto organizacional de los andrógenos y el aumento en los niveles de testosterona durante la pubertad sería insuficiente como para revertir dicho efecto (Zhang y col., 2010).

V 4.3.2- Recuento estereológico del número de neuronas NeuN+ y TH+.

Los resultados obtenidos mostraron que las crías expuestas prenatalmente a flutamida no presentaron cambios en el número total de neuronas determinado mediante la inmunomarcación con NeuN en ninguna de las edades evaluadas cuando fueron comparadas con los individuos tratados con solución vehículo. Sin embargo se observó una reducción significativa en el número de neuronas TH positiva en individuos FLU de 28 días.

Existen en la literatura varios antecedentes sobre los efectos moduladores de los andrógenos sobre la enzima limitante de la síntesis dopaminérgica. Se ha descripto que el tratamiento in vivo con testosterona aumentaba la expresión de TH en diferentes áreas cerebrales (Weltzien y col., 2005) y se ha demostrado que el AR es capaz de regular positivamente la transcripción del gen que codifica para la enzima sugiriendo de esta manera una interrelación positiva entre la DA y la hormona sexual (Jeong y col., 2006). Por otra parte, el grupo de Johnson y colaboradores han evaluado la expresión de la enzima en la SN y el VTA de ratas macho adultas gonadectomizados con o sin suministro de testosterona exógena ó DHT. Los autores mostraron que la inmunomarcación para TH incrementaba al extraerse las gónadas en ambas regiones mesencefálicas y que la administración de testosterona o su metabolito inhibían dicho incremento, presentando una inmunomarcación para la enzima similar a la de los controles. Así, los autores sugirieron que la testosterona cumpliría un rol supresivo en las vías DA mesencefálicas de animales adultos (Johnson y col., 2010).

Si bien los efectos activacionales de los andrógenos sobre la enzima TH han sido explorados, pocos estudios han evaluado el rol organizacional de las hormonas. De forma similar al efecto observado en el VTA de individuos

tratados prenatalmente con flutamida en nuestro trabajo, se ha mostrado que la extracción perinatal de las gónadas inducía una reducción en la inmunomarcación para la enzima TH en la corteza cingulada anterior de individuos adultos. A su vez dichos efectos eran atenuados si los individuos gonadectomizados recibían testosterona de forma exógena (Kritzer, 1998).

V 4.4- CONCLUSIONES DEL CAPITULO 4.

La correcta organización del tracto reproductivo masculino así como la apropiada formación del cerebro depende de la exposición a testosterona y sus metabolitos en las concentraciones fisiológicas durante etapas críticas del desarrollo perinatal. Mediante la administración de flutamida durante la última semana de gestación se ha manipulado la disponibilidad de andrógenos testiculares fetales en el individuo en desarrollo. Se ha observado una alteración en la maduración sexual de las crías macho incluyendo anomalías en la gentialia externa e interna, sin afectar los niveles circulantes de testosterona. No obstante en el cerebro, la exposición prenatal de flutamida afectó a largo plazo el desarrollo de procesos neurales en el sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico y disminuyó el número de neuronas TH positivas en el VTA. De esta manera, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que una de las posibles vías mediante las cuales el estrés prenatal podría interferir con el desarrollo del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico sería mediante la supresión de los efectos organizacionales de los andrógenos sobre el cerebro en desarrollo ya que las consecuencias inducidas sobre dicho sistema remedan a las descriptas por el estrés prenatal.

CONCLUSIONES GENERALES

Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha estudiado en detalle los efectos a largo plazo del estrés prenatal sobre diferentes aspectos bioquímicos y comportamentales del sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico en la cría macho. Si bien las alteraciones inducidas por el estrés prenatal persistían durante la vida del individuo, algunas de las consecuencias variaban según la edad a la cual eran evaluados: algunos cambios que se manifestaban previo a la pubertad no se hacían evidentes a edades adultas, mientras que en otros casos se observaba el efecto contrario. De esta manera, se hipotetizó que el rol activacional de las hormonas gonadales durante la etapa de la adolescencia sería responsable de las discrepancias temporales halladas en los resultados.

Por otro lado, varios autores han descripto que el pico de secreción de las hormonas sexuales durante la adolescencia coincide con el perfil de incidencia en ciertas psicopatologías que a la vez se asocian con disfunciones en el sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico. Coincidentemente, los individuos que habían sido expuestos a un estrés severo durante la gestación presentan una mayor incidencia de estas patologias.

En base a estos antecedentes el objetivo general de este trabajo de tesis doctoral fue el de avanzar sobre el conocimiento del rol de las hormonas gonadales masculinas sobre las alteraciones a largo plazo que sufre la neurotransmisión dopaminérgica en la cría estresada durante la gestación. En una aproximación a este objetivo se analizaron los efectos activacionales de las hormonas sexuales sobre diferentes parámetros endocrinos y del sistema dopaminérgico de individuos prenatalmente estresados. Luego se analizaron los efectos organizacionales de las hormonas sexuales sobre el sistema dopaminérgico en individuos que habían sido expuestos a la administración prenatal de flutamida. Los resultados más importantes de este trabajo fueron:

 El estrés prenatal indujo una menor reactividad del sistema de estrés de la cría de una forma que dependía de la edad. En etapas prepuberales éstos presentaban una pronta restitución en los niveles de corticosterona tras dos horas de concluido la exposición a la sesión de estrés, mientras que se observó una hiporeactividad de la prolactina frente a la exposición al estrés agudo en individuos adultos.

- El estrés prenatal indujo una desregulación del eje reproductor masculino produciendo, entre otros efectos, un significativo aumento en las concentraciones de andrógenos totales en circulación y un avance en la espermatogénesis.
- El estrés prenatal produjo alteraciones en el recambio de receptores dopaminérgicos del tipo D2 y de estrógenos alfa en el sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico, observandose variaciones pre y postpuberales.
- El estrés prenatal indujo una reducción permanente en las arborizaciones dendríticas de las crías en el sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico.
- La exposición prenatal a flutamida afectó la morfología de los genitales externos e internos de las crías, sin modificar los niveles de testosterona en circulación.
- La exposición prenatal a flutamida afectó la morfología neural del sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico reduciendo las arborizaciones dendríticas y disminuyendo el número de neuronas TH⁺ en el VTA de individuos prepuberales.

Los resultados expuestos en este trabajo sugieren que la inhibición de los efectos organizacionales de los andrógenos durante estadios tempranos del desarrollo de un individuo, remeda a los efectos inducidos por el estrés prenatal sobre la morfología neural del sistema dopaminérgico mesocórtico-límbico. Sin embargo, el rol activacional de las hormonas durante la etapa puberal modularía de forma diferencial algunos de los efectos organizacionales de las mismas que fueron a su vez alterados durante la gestación por la exposición a estrés.

En resumen, la alteración de las concentraciones de hormonas sexuales durante etapas críticas del desarrollo fetal como consecuencia del efecto del estrés sobre los picos fetales de testosterona interfieren con la organización no

solo del eje neuroendócrino y su morfologia externa sino que produce alteraciones en la morfologia cerebral y mas especificamente en el sistema dopaminergico mesocortico-límbico que persisten a lo largo de la vida.

Los resultados de este trabajo ofrecen evidencias irrefutables sobre la gran relevancia social que tiene el cuidado de la salud física, emocional y mental de la madre durante el embarazo, en función de preservar a largo plazo la salud y el desarrollo de su descendencia. En un futuro no muy lejano, desearíamos que el Estado tuviera en cuenta las investigaciones científicas realizadas en este tema, e implementara planes de concientización, ayuda y contención a las madres gestantes que pudieran estar expuestas a agentes estresantes psicosociales, al mismo tiempo que provea la estimulación temprana de sus niños con el objetivo de revertir al menos de forma parcial, las consecuencias de dicho estrés.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adrover E, Berger MA, Perez AA, Tarazi FI, Antonelli MC Effects of prenatal stress on dopamine D2 receptor asymmetry in rat brain. Synapse 61:459-462.2007.

Alonso-Solis R, Abreu P, Lopez-Coviella I, Hernandez G, Fajardo N, Hernandez-Diaz F, Diaz-Cruz A, Hernandez A Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. Cell Mol Neurobiol 16:357-382.1996.

Andersen SL Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? Neurosci Biobehav Rev 27:3-18.2003.

Andersen SL, Thompson AP, Krenzel E, Teicher MH Pubertal changes in gonadal hormones do not underlie adolescent dopamine receptor overproduction. Psychoneuroendocrinology 27:683-691.2002.

Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, Perlmann T, Ericson J Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. Cell 124:393-405.2006.

Auchus RJ The backdoor pathway to dihydrotestosterone. Trends Endocrinol Metab 15:432-438.2004.

Baier CJ, Katunar MR, Adrover E, Pallares ME, Antonelli MC Gestational restraint stress and the developing dopaminergic system: an overview. Neurotox Res 22:16-32.2012.

Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. J Neurosci 16:3943-3949.1996a.

Barbazanges A, Vallee M, Mayo W, Day J, Simon H, Le Moal M, Maccari S Early and later adoptions have different long-term effects on male rat offspring. J Neurosci 16:7783-7790.1996b.

Barlow SM, Knight AF, Sullivan FM Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. Teratology 18:211-218.1978.

Barros VG, Berger MA, Martijena ID, Sarchi MI, Perez AA, Molina VA, Tarazi FI, Antonelli MC Early adoption modifies the effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. J Neurosci Res 76:488-496.2004.

Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC Astrocyteneuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. J Neurosci Res 83:787-800.2006.

Bartke A Prolactin in the male: 25 years later. J Androl 25:661-666.2004.

Bear M, Connors B, Paradiso M (2001) Neuroscience. Exploring the Brain. USA.

Berger MA, Barros VG, Sarchi MI, Tarazi FI, Antonelli MC Long-term effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. Neurochem Res 27:1525-1533.2002.

Beyer C, Hutchison JB Androgens stimulate the morphological maturation of embryonic hypothalamic aromatase-immunoreactive neurons in the mouse. Brain Res Dev Brain Res 98:74-81.1997.

Bialek M, Zaremba P, Borowicz KK, Czuczwar SJ Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. Pol J Pharmacol 56:509-518.2004.

Biosystems A (2004) Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.

Bisagno V, Ferrini M, Rios H, Zieher LM, Wikinski SI Chronic corticosterone impairs inhibitory avoidance in rats: possible link with atrophy of hippocampal CA3 neurons. Pharmacol Biochem Behav 66:235-240.2000.

Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. Endocrinology 145:3778-3787.2004.

Bradford MM A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.1976.

Cabib S, Puglisi-Allegra S Stress, depression and the mesolimbic dopamine system. Psychopharmacology (Berl) 128:331-342.1996.

Calandra RS, Baranao JL, Bertini L, Calvo JC, Charreau EH, Chiauzzi VA, Suescun MO, Tesone M Effects of prolactin on the male gonad and sex accessory organs. Prog Clin Biol Res 87:87-112.1982.

Cannizzaro C, Plescia F, Martire M, Gagliano M, Cannizzaro G, Mantia G, Cannizzaro E Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: interaction with a brief, daily maternal separation. Behav Brain Res 169:128-136.2006.

Carboni E, Barros VG, Ibba M, Silvagni A, Mura C, Antonelli MC Prenatal restraint stress: an in vivo microdialysis study on catecholamine release in the rat prefrontal cortex. Neuroscience 168:156-166.2010.

Cardinal RN, Winstanley CA, Robbins TW, Everitt BJ Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. Ann N Y Acad Sci 1021:33-50.2004.

Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. Reprod Biol Endocrinol 1:35.2003.

Casto JM, Ward OB, Bartke A Play, copulation, anatomy, and testosterone in gonadally intact male rats prenatally exposed to flutamide. Physiol Behav 79:633-641.2003.

Catalani A, Alema GS, Cinque C, Zuena AR, Casolini P Maternal corticosterone effects on hypothalamus-pituitary-adrenal axis regulation and behavior of the offspring in rodents. Neurosci Biobehav Rev 35:1502-1517.2011.

Celotti F, Negri-Cesi P, Poletti A Steroid metabolism in the mammalian brain: 5alpha-reduction and aromatization. Brain Res Bull 44:365-375.1997.

Cingolani H, Houssay A (2000) Fisiología Humana de Houssay: El Ateneo.

Clemens LG, Gladue BA, Coniglio LP Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. Horm Behav 10:40-53.1978.

Coffey D (1988) Androgen Actions and the Sex Accesory Tissues. In: The Physiology of Reproduction(p, ed), p 100: p.

Corbier P, Kerdelhue B, Picon R, Roffi J Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. Endocrinology 103:1985-1991.1978.

Cottrell EC, Seckl JR Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. Front Behav Neurosci 3:19.2009.

Counis R, Laverriere JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler ML, Magre S Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. Reprod Nutr Dev 45:243-254.2005.

Creutz LM, Kritzer MF Estrogen receptor-beta immunoreactivity in the midbrain of adult rats: regional, subregional, and cellular localization in the A10, A9, and A8 dopamine cell groups. J Comp Neurol 446:288-300.2002.

Champagne FA, Chretien P, Stevenson CW, Zhang TY, Gratton A, Meaney MJ Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. J Neurosci 24:4113-4123.2004.

Champagne FA, Meaney MJ Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. Biol Psychiatry 59:1227-1235.2006.

Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. Food Chem Toxicol 48:972-979.2010.

Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S Prenatal stress and brain development. Brain Res Rev 65:56-79.2010.

Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP Pediatric stress: hormonal mediators and human development. Horm Res 59:161-179.2003.

Chemes HE, Podesta E, Rivarola MA Action of testosterone, dihydrotestosterone and 5alpha androstane 3alpha, 17beta diol on the spermatogenesis of immature rats. Biol Reprod 14:332-338.1976.

Chen H, Chandrashekar V, Zirkin BR Can spermatogenesis be maintained quantitatively in intact adult rats with exogenously administered dihydrotestosterone? J Androl 15:132-138.1994.

Chinta SJ, Andersen JK Dopaminergic neurons. Int J Biochem Cell Biol 37:942-946.2005.

Chrousos GP Stress and disorders of the stress system. Nat Rev Endocrinol 5:374-381,2009.

Chrousos GP, Gold PW The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA 267:1244-1252.1992.

Chung S, Hedlund E, Hwang M, Kim DW, Shin BS, Hwang DY, Jung Kang U, Isacson O, Kim KS The homeodomain transcription factor Pitx3 facilitates differentiation of mouse embryonic stem cells into AHD2-expressing dopaminergic neurons. Mol Cell Neurosci 28:241-252.2005.

Darnaudery M, Dutriez I, Viltart O, Morley-Fletcher S, Maccari S Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam rat. Behav Brain Res 153:211-216.2004.

Deminiere JM, Piazza PV, Guegan G, Abrous N, Maccari S, Le Moal M, Simon H Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers. Brain Res 586:135-139.1992.

Deutch AY Prefrontal cortical dopamine systems and the elaboration of functional corticostriatal circuits: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. J Neural Transm Gen Sect 91:197-221.1993.

Diaz R, Fuxe K, Ogren SO Prenatal corticosterone treatment induces longterm changes in spontaneous and apomorphine-mediated motor activity in male and female rats. Neuroscience 81:129-140.1997.

Dluzen DE Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. J Neurocytol 29:387-399.2000.

Dominguez-Salazar E, Portillo W, Baum MJ, Bakker J, Paredes RG Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual

behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. Physiol Behav 75:337-346.2002.

DonCarlos LL, Garcia-Ovejero D, Sarkey S, Garcia-Segura LM, Azcoitia I Androgen receptor immunoreactivity in forebrain axons and dendrites in the rat. Endocrinology 144:3632-3638.2003.

Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology 147:1154-1158.2006.

Fawcett DW (1989) Tratado de Histología: Interamericana – McGraw -Hill.

Feuerstein TJ Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. Handb Exp Pharmacol 289-338.2008.

Fink G (1988) Gonadotropin secretion and its control. In: The physiology of reproduction(Neill, E. K. y. J., ed), pp 1349-1377 New York: Raven Press.

Fink G (2000) Neuroendocrine regulation of pituitary function. In: Neuroendocrinology in physiology and medicine(Freeman, P. C. y. M., ed), pp 107-133 Totowa NJ: Humana Press.

Finlay JM, Zigmond MJ The effects of stress on central dopaminergic neurons: possible clinical implications. Neurochem Res 22:1387-1394.1997.

Foster DL, Jackson LM, Padmanabhan V Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. Mol Cell Endocrinol 254-255:109-119.2006.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev 80:1523-1631.2000.

Fride E, Weinstock M Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. Life Sci 42:1059-1065.1988.

Fride E, Weinstock M Alterations in behavioral and striatal dopamine asymmetries induced by prenatal stress. Pharmacol Biochem Behav 32:425-430.1989.

Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Chandrashekar V, Rao JN, Bartke A, Calandra RS Testicular gamma-aminobutyric acid and circulating androgens in

Syrian and Djungarian hamsters during sexual development. Int J Androl 19:164-170.1996.

Fumagalli F, Bedogni F, Perez J, Racagni G, Riva MA Corticostriatal brainderived neurotrophic factor dysregulation in adult rats following prenatal stress. Eur J Neurosci 20:1348-1354.2004.

Gao HB, Tong MH, Hu YQ, Guo QS, Ge R, Hardy MP Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. Endocrinology 143:130-138.2002.

Ge RS, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP Opposing changes in 3alphahydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat leydig cells during pubertal development. Biol Reprod 60:855-860.1999.

Gerardin DC, Pereira OC, Kempinas WG, Florio JC, Moreira EG, Bernardi MM Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. Physiol Behav 84:97-104.2005.

Gilad GM, Gilad VH Strain, stress, neurodegeneration and longevity. Mech Ageing Dev 78:75-83.1995.

Goto K, Koizumi K, Takaori H, Fujii Y, Furuyama Y, Saika O, Suzuki H, Saito K, Suzuki K Effects of flutamide on sex maturation and behavior of offspring born to female rats treated during late pregnancy. J Toxicol Sci 29:517-534.2004.

Grattan DR Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. Reproduction 123:497-506.2002.

Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. Hum Reprod Update 7:248-264.2001.

Graybiel AM Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. Trends Neurosci 13:244-254.1990.

Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C Stress hormone and male reproductive function. Cell Tissue Res 322:147-153.2005.

Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. Int J Dev Neurosci 16:209-216.1998.

Henry C, Arsaut J, Arnauld E, Demotes-Mainard J Transient neonatal elevation in hypothalamic estrogen receptor mRNA in prenatally-stressed male rats. Neurosci Lett 216:141-145.1996.

Henry C, Guegant G, Cador M, Arnauld E, Arsaut J, Le Moal M, Demotes-Mainard J Prenatal stress in rats facilitates amphetamine-induced sensitization and induces long-lasting changes in dopamine receptors in the nucleus accumbens. Brain Res 685:179-186.1995.

Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. J Neuroendocrinol 6:341-345.1994.

Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. Neurosci Biobehav Rev 29:1335-1346.2005.

Hu GX, Lian QQ, Lin H, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP, Ge RS Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. Steroids 73:1018-1024.2008.

Hughes IA, Acerini CL Factors controlling testis descent. Eur J Endocrinol 159 Suppl 1:S75-82.2008.

Huhtaniemi I Molecular aspects of the ontogeny of the pituitary-gonadal axis. Reprod Fertil Dev 7:1025-1035.1995.

Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? Psychol Bull 130:115-142.2004.

Huttenlocher PR Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. Brain Res 163:195-205.1979.

Huttunen MO, Niskanen P Prenatal loss of father and psychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry 35:429-431.1978.

Imperato-McGinley J, Sanchez RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. Endocrinology 131:1149-1156.1992.

Ishiwata H, Shiga T, Okado N Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. Neuroscience 133:893-901.2005.

Iversen L, Iversen S, Bloom F (2009) Introduction to neuropsychopharmacology. New York: Oxford University Press.

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG Dopamine receptors and brain function. Neuropharmacology 35:1503-1519.1996.

Jaroenporn S, Nagaoka K, Kasahara C, Ohta R, Watanabe G, Taya K Physiological roles of prolactin in the adrenocortical response to acute restraint stress. Endocr J 54:703-711.2007.

Jeong H, Kim MS, Kwon J, Kim KS, Seol W Regulation of the transcriptional activity of the tyrosine hydroxylase gene by androgen receptor. Neurosci Lett 396:57-61.2006.

Johnsen SG Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1:2-25.1970.

Johnson ML, Day AE, Ho CC, Walker QD, Francis R, Kuhn CM Androgen decreases dopamine neurone survival in rat midbrain. J Neuroendocrinol 22:238-247.2010.

Kamei H, Kameyama T, Nabeshima T Activation of both dopamine D1 and D2 receptors necessary for amelioration of conditioned fear stress. Eur J Pharmacol 273:229-233.1995.

Kapoor A, Matthews SG Testosterone is involved in mediating the effects of prenatal stress in male guinea pig offspring. J Physiol 589:755-766.2011.

Katunar MR, Saez T, Brusco A, Antonelli MC Inmunocytochemical expression of dopamine-related transcription factors Pitx3 and Nurr1 in prenatally stressed adult rats. Journal of Neuroscience Research 87:1014-1022.2009.

Katunar MR, Saez T, Brusco A, Antonelli MC Ontogenetic Expression of dopamine-Related Transcription Factors and Tyrosine Hydroxylase in Prenatally Stressed Rats. Neurotoxicity Research 18:69-81.2010.

Kawakami M, Higuchi T, Matsuura M Immobilization stress and prolactin secretion in male rats. Possible roles of dopamine and TRH. Neuroendocrinology 29:262-269.1979.

Kawashima S, Takagi K Role of sex steroids on the survival, neuritic outgrowth of neurons, and dopamine neurons in cultured preoptic area and hypothalamus. Horm Behav 28:305-312.1994.

Kebabian JW, Calne DB Multiple receptors for dopamine. Nature 277:93-96.1979.

Kemme K, Kaiser S, Sachser N Prenatal maternal programming determines testosterone response during social challenge. Horm Behav 51:387-394.2007.

Killian J, Pratis K, Clifton RJ, Stanton PG, Robertson DM, O'Donnell L 5alphareductase isoenzymes 1 and 2 in the rat testis during postnatal development. Biol Reprod 68:1711-1718.2003.

Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ, Miller AM Prenatal stress and risk for autism. Neurosci Biobehav Rev 32:1519-1532.2008.

Kinsley CH, Mann PE, Bridges RS Alterations in stress-induced prolactin release in adult female and male rats exposed to stress, in utero. Physiol Behav 45:1073-1076.1989.

Kippin TE, Szumlinski KK, Kapasova Z, Rezner B, See RE Prenatal stress enhances responsiveness to cocaine. Neuropsychopharmacology 33:769-782.2008.

Knickmeyer RC, Baron-Cohen S Fetal testosterone and sex differences in typical social development and in autism. J Child Neurol 21:825-845.2006.

Koehl M, Bjijou Y, Le Moal M, Cador M Nicotine-induced locomotor activity is increased by preexposure of rats to prenatal stress. Brain Res 882:196-200.2000.

Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. J Neurobiol 40:302-315.1999.

Kritzer MF Selective colocalization of immunoreactivity for intracellular gonadal hormone receptors and tyrosine hydroxylase in the ventral tegmental area, substantia nigra, and retrorubral fields in the rat. J Comp Neurol 379:247-260.1997.

Kritzer MF Perinatal gonadectomy exerts regionally selective, lateralized effects on the density of axons immunoreactive for tyrosine hydroxylase in the cerebral cortex of adult male rats. J Neurosci 18:10735-10748.1998.

Kuhar MJ, Couceyro PR, Lambert PD (1999) Catecholamines. In: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. (Siegel, G. J., Agranoff, B.W, Albers, R.W, Fisher, S.K, Uhler, M.D. Uhler eds., ed) Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.

Kuppers E, Ivanova T, Karolczak M, Beyer C Estrogen: a multifunctional messenger to nigrostriatal dopaminergic neurons. J Neurocytol 29:375-385.2000.

Larsen CM, Grattan DR Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. Brain Behav Immun 26:201-209.2012.

LeMay M Functional and anatomical asymmetries of the human brain. Eur J Neurol 6:79-85.1999.

Lewis-Jones D, Kerrigan D A modified Johnsen's count for evaluation of spermatogenesis in the rat. IRCS Med Sci 13:510-511.1985.

Libertun C (1980) Radioinmunoanálisis. Buenos Aires. Argentina: López Libreros.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Science 277:1659-1662.1997.

Louvart H, Maccari S, Darnaudery M Prenatal stress affects behavioral reactivity to an intense stress in adult female rats. Brain Res 1031:67-73.2005.

Lucas TF, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MF, Porto CS 17beta-estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. Spermatogenesis 1:318-324.2011.

Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. Neurosci Biobehav Rev 27:119-127.2003.

Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. J Neurosci 15:110-116.1995.

MacLusky NJ, Hajszan T, Prange-Kiel J, Leranth C Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. Neuroscience 138:957-965.2006.

Mahendroo M, Wilson JD, Richardson JA, Auchus RJ Steroid 5alpha-reductase 1 promotes 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol synthesis in immature mouse testes by two pathways. Mol Cell Endocrinol 222:113-120.2004.

Martinez-Tellez RI, Hernandez-Torres E, Gamboa C, Flores G Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. Synapse 63:794-804.2009.

Mastorci F, Vicentini M, Viltart O, Manghi M, Graiani G, Quaini F, Meerlo P, Nalivaiko E, Maccari S, Sgoifo A Long-term effects of prenatal stress: changes in adult cardiovascular regulation and sensitivity to stress. Neurosci Biobehav Rev 33:191-203.2009.

Matthews SG Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. Semin Neonatol 6:309-317.2001.

Matzkin ME, Gonzalez-Calvar SI, Mayerhofer A, Calandra RS, Frungieri MB Testosterone induction of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression and prostaglandin F(2alpha) production in hamster Leydig cells. Reproduction 138:163-175.2009.

McCarthy M (2011) Sex and the developing brain.

McCormick CM, Mahoney E Persistent effects of prenatal, neonatal, or adult treatment with flutamide on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response of adult male rats. Horm Behav 35:90-101.1999.

McEwen BS Stressed or stressed out: what is the difference? J Psychiatry Neurosci 30:315-318.2005.

McEwen BS, Alves SE Estrogen actions in the central nervous system. Endocr Rev 20:279-307.1999.

McEwen BS, Gianaros PJ Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. Ann N Y Acad Sci 1186:190-222.2010.

McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de K, Pratis K, Robertson DM Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. J Androl 23:149-162.2002.

Mendelson CR Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. Mol Endocrinol 23:947-954.2009.

Moguilevsky J (2005) Fisiología Endocrina de la Reproducción.

Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Rettori V Adrenal gland responses to lipopolysaccharide after stress and ethanol administration in male rats. Stress 14:216-226.2011.

Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. Eur J Neurosci 18:3367-3374.2003.

Naess O, Attramadal A, Aakvaag A Androgen binding proteins in the anterior pituitary, hypothalamus, preoptic area and brain cortex of the rat. Endocrinology 96:1-9.1975.

Niswender GD, Midgley AR, Jr., Monroe SE, Reichert LE, Jr. Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH-131-I. Proc Soc Exp Biol Med 128:807-811.1968.

Nussey S, Whitehead S (2001) Endocrinology, an Integrated Approach: Oxford Bios Scientific Pulishers.

O'Malley, Strott (2001) Hormonas esteroides: Metabolismo y Mecanismo de Acción. In: Endocrinología de la reproducción Fisiología, fisiopatología y manejo clínico, vol. 4a edición (Yen SSC, J. R., Barbieri RL, ed), pp 118-143 Buenos Aires: Panamericana.

O'Shaughnessy PJ, Fowler PA Endocrinology of the mammalian fetal testis. Reproduction 141:37-46.2011.

O'Shaughnessy PJ, Verhoeven G, De Gendt K, Monteiro A, Abel MH Direct action through the sertoli cells is essential for androgen stimulation of spermatogenesis. Endocrinology 151:2343-2348.2010.

Olivares A, Zúñiga O, Castro G, C S, Sánchez J Bases biológicas para el manejo de Octopus mimus: Reproducción y crecimiento. Estud Oceanol 15:61-74.1996.

Ordyan NE, Pivina SG Effects of prenatal stress on the activity of an enzyme involved in neurosteroid synthesis during the "critical period" of sexual differentiation of the brain in male rats. Neurosci Behav Physiol 35:931-935.2005.

Pallares ME, Scacchi Bernasconi PA, Feleder C, Cutrera RA Effects of prenatal stress on motor performance and anxiety behavior in Swiss mice. Physiol Behav 92:951-956.2007.

Paus T, Keshavan M, Giedd JN Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? Nat Rev Neurosci 9:947-957.2008.

Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto: Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.

Pedrana G, Sloboda DM, Perez W, Newnham JP, Bielli A, Martin GB Effects of pre-natal glucocorticoids on testicular development in sheep. Anat Histol Embryol 37:352-358.2008.

Pereira OC, Bernardi MM, Gerardin DC Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? Life Sci 78:2767-2771.2006.

Pettersson H, Lundqvist J, Oliw E, Norlin M CYP7B1-mediated metabolism of 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol (3alpha-Adiol): a novel pathway for potential regulation of the cellular levels of androgens and neurosteroids. Biochim Biophys Acta 1791:1206-1215.2009.

Pfaffl MW A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45.2001.

Phillips-Farfan BV, Fernandez-Guasti A Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. Neurosci Biobehav Rev 33:442-455,2009.

Podesta EJ, Rivarola MA Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development. Endocrinology 95:455-461.1974.

Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, Stanton PG, McLachlan RI, Robertson DM Differential regulation of rat testicular 5alpha-reductase type 1 and 2 isoforms by testosterone and FSH. J Endocrinol 176:393-403.2003.

Purves-Tyson TD, Handelsman DJ, Double KL, Owens SJ, Bustamante S, Weickert CS Testosterone regulation of sex steroid-related mRNAs and dopamine-related mRNAs in adolescent male rat substantia nigra. BMC Neurosci 13:95.2012.

Randall D, Eckert R, Burggren W, French K, Fernald R (1998) Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones: McGraw-Hill.

Resnick LM, Catanzaro D, Sealey JE, Laragh JH Acute vascular effects of the angiotensin II receptor antagonist olmesartan in normal subjects: relation to the renin-aldosterone system. Am J Hypertens 17:203-208.2004.

Rey F, Gonzalez M, Zayas MA, Stoker C, Durando M, Luque EH, Munoz-de-Toro M Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male Caiman latirostris. Gen Comp Endocrinol 162:286-292.2009. Rivier C, Rivier J, Vale W Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. Science 231:607-609.1986.

Rodriguez N, Mayer N, Gauna HF Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity. Biocell 31:67-74.2007.

Rosen GD, Finklestein S, Stoll AL, Yutzey DA, Denenberg VH Neurochemical asymmetries in the albino rat's cortex, striatum, and nucleus accumbens. Life Sci 34:1143-1148.1984.

Rulli SB, Gonzalez-Calvar SI, Campo S, Calandra RS Effects of two nonsteroidal antiandrogens on testicular function in prepubertal rats. J Androl 16:225-232.1995.

Russell LD, Kershaw M, Borg KE, El Shennawy A, Rulli SS, Gates RJ, Calandra RS Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. J Androl 19:308-319; discussion 341-302.1998.

Sandman CA, Davis EP, Buss C, Glynn LM Prenatal programming of human neurological function. Int J Pept 2011:837596.2011.

Sapolsky R (2004) Why zebras don't get ulcers-third edition.

Sapolsky RM Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. Exp Gerontol 34:721-732.1999.

Sato SM, Schulz KM, Sisk CL, Wood RI Adolescents and androgens, receptors and rewards. Horm Behav 53:647-658.2008.

Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP, Conneely OM Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 95:4013-4018.1998.

Scott HM, Mason JI, Sharpe RM Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. Endocr Rev 30:883-925.2009.

Scherer IJ, Holmes PV, Harris RB The importance of corticosterone in mediating restraint-induced weight loss in rats. Physiol Behav 102:225-233.2011.

Schopper H, Klaus T, Palme R, Ruf T, Huber S Sex-specific impact of prenatal stress on growth and reproductive parameters of guinea pigs. J Comp Physiol B 182:1117-1127.2012.

Seeman P, Bzowej NH, Guan HC, Bergeron C, Becker LE, Reynolds GP, Bird ED, Riederer P, Jellinger K, Watanabe S, et al. Human brain dopamine receptors in children and aging adults. Synapse 1:399-404.1987.

Segal M Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. Eur J Neurosci 31:2178-2184.2010.

Shono T, Suita S Disturbed pituitary-testicular axis inhibits testicular descent in the prenatal rat. BJU Int 92:641-643.2003.

Sikich L, Todd RD Are the neurodevelopmental effects of gonadal hormones related to sex differences in psychiatric illnesses? Psychiatr Dev 6:277-309.1988.

Silvagni A, Barros VG, Mura C, Antonelli MC, Carboni E Prenatal restraint stress differentially modifies basal and stimulated dopamine and noradrenaline release in the nucleus accumbens shell: an 'in vivo' microdialysis study in adolescent and young adult rats. Eur J Neurosci 28:744-758.2008.

Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD, O'Leary DD Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. J Neurosci 21:3126-3134.2001.

Slattery DA, Neumann ID No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. J Physiol 586:377-385.2008.

Smagin GN, Howell LA, Redmann S, Jr., Ryan DH, Harris RB Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. Am J Physiol 276:R1461-1468.1999.

Smidt MP, Burbach JP How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. Nat Rev Neurosci 8:21-32.2007.

Solum DT, Handa RJ Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. J Neurosci 22:2650-2659.2002.

Son GH, Geum D, Chung S, Kim EJ, Jo JH, Kim CM, Lee KH, Kim H, Choi S, Kim HT, Lee CJ, Kim K Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. J Neurosci 26:3309-3318.2006.

Spary EJ, Maqbool A, Batten TF Oestrogen receptors in the central nervous system and evidence for their role in the control of cardiovascular function. J Chem Neuroanat 38:185-196.2009.

Spear LP The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neurosci Biobehav Rev 24:417-463.2000.

Suescun MO, Gonzalez SI, Chiauzzi VA, Calandra RS Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. J Androl 6:77-82.1985.

Tang AC, Yang Z, Reeb-Sutherland BC, Romeo RD, McEwen BS Maternal modulation of novelty effects on physical development. Proc Natl Acad Sci U S A 109:2120-2125.2012.

Tapanainen J, Kuopio T, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. Biol Reprod 31:1027-1035.1984.

Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC, Jr. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. Brain Res Dev Brain Res 89:167-172.1995.

Torres JM, Ortega E Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. FASEB J 17:1428-1433.2003.

Trifaro JM, Vitale ML, Rodriguez Del Castillo A Cytoskeleton and molecular mechanisms in neurotransmitter release by neurosecretory cells. Eur J Pharmacol 225:83-104.1992.

Tsuruo Y Topography and function of androgen-metabolizing enzymes in the central nervous system. Anat Sci Int 80:1-11.2005.

Vallee M, Mayo W, Maccari S, Le Moal M, Simon H Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. Brain Res 712:287-292.1996.

Van den Heuvel DM, Pasterkamp RJ Getting connected in the dopamine system. Prog Neurobiol 85:75-93.2008.

Van den Hove DL, Blanco CE, Aendekerk B, Desbonnet L, Bruschettini M, Steinbusch HP, Prickaerts J, Steinbusch HW Prenatal restraint stress and long-term affective consequences. Dev Neurosci 27:313-320.2005.

Van den Hove DL, Steinbusch HW, Scheepens A, Van de Berg WD, Kooiman LA, Boosten BJ, Prickaerts J, Blanco CE Prenatal stress and neonatal rat brain development. Neuroscience 137:145-155.2006.

van der Schoot P Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide. J Reprod Fertil 96:483-496.1992.

Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 365:1537-1556.2010.

Viltart O, Vanbesien-Mailliot CC Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. ScientificWorldJournal 7:1493-1537.2007.

Vinggaard AM, Christiansen S, Laier P, Poulsen ME, Breinholt V, Jarfelt K, Jacobsen H, Dalgaard M, Nellemann C, Hass U Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. Toxicol Sci 85:886-897.2005.

Waeber C, Reymond O, Reymond M, Lemarchand-Beraud T Effects of hyperand hypoprolactinemia on gonadotropin secretion, rat testicular luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and testosterone production by isolated Leydig cells. Biol Reprod 28:167-177.1983.

Wakshlak A, Weinstock M Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. Physiol Behav 48:289-292.1990.

Walker CD, Deschamps S, Proulx K, Tu M, Salzman C, Woodside B, Lupien S, Gallo-Payet N, Richard D Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. J Psychiatry Neurosci 29:364-382.2004.

Ward HE, Johnson EA, Salm AK, Birkle DL Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. Physiol Behav 70:359-366.2000.

Ward IL, Ward OB, Affuso JD, Long WD, 3rd, French JA, Hendricks SE Fetal testosterone surge: specific modulations induced in male rats by maternal stress and/or alcohol consumption. Horm Behav 43:531-539.2003.

Ward IL, Weisz J Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. Endocrinology 114:1635-1644.1984.

Webster Marketon JI, Glaser R Stress hormones and immune function. Cell Immunol 252:16-26.2008.

Weinstock M Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. Prog Neurobiol 65:427-451.2001.

Weinstock M The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. Brain Behav Immun 19:296-308.2005.

Weinstock M The long-term behavioural consequences of prenatal stress. Neurosci Biobehav Rev 32:1073-1086.2008.

Weinstock M Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. Stress 14:604-613.2011.

Weltzien FA, Pasqualini C, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Dufour S Brain expression of tyrosine hydroxylase and its regulation by steroid hormones in the European eel quantified by real-time PCR. Ann N Y Acad Sci 1040:518-520.2005.

Wendler A, Baldi E, Harvey BJ, Nadal A, Norman A, Wehling M Position paper: Rapid responses to steroids: current status and future prospects. Eur J Endocrinol 162:825-830.2010.

Whirledge S, Cidlowski JA Glucocorticoids, stress, and fertility. Minerva Endocrinol 35:109-125.2010.

Wilson ME, Westberry JM, Trout AL Estrogen receptor-alpha gene expression in the cortex: sex differences during development and in adulthood. Horm Behav 59:353-357.2011.

Xiao L, Jordan CL Sex differences, laterality, and hormonal regulation of androgen receptor immunoreactivity in rat hippocampus. Horm Behav 42:327-336.2002.

Xu M, Zhang J Molecular genetic probing of dopamine receptors in drug addiction. Curr Opin Drug Discov Devel 7:703-708.2004.

Zhang JM, Tonelli L, Regenold WT, McCarthy MM Effects of neonatal flutamide treatment on hippocampal neurogenesis and synaptogenesis correlate with depression-like behaviors in preadolescent male rats. Neuroscience 169:544-554.2010.

Zuena AR, Mairesse J, Casolini P, Cinque C, Alema GS, Morley-Fletcher S, Chiodi V, Spagnoli LG, Gradini R, Catalani A, Nicoletti F, Maccari S Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. PLoS One 3:e2170.2008.