



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas
Laboratorio de Endocrinología y Tumores
Hormonodependientes

**Regulación endocrina y efectos de estrógenos
ambientales sobre el compartimiento vascular
en el tracto genital: su importancia
relacionada con la eficiencia reproductiva**

Autor: Bioq. Verónica Lis Bosquiazzo

Director: Prof. Dr. Enrique H. Luque
Co-director: Dr. Jorge G. Ramos

**Santa Fe
2007**

A mis amores...

Gabriel por apoyarme en este camino desde el primer día, por su paciencia y comprensión. Por enseñarme a amar

Mis papás, Jorge y Lucía, que nunca dejaron de incentivarme y amarme, y por ser mis ejemplos a seguir

Mis hermanos Leandro, Eliana y Maximiliano que fueron y serán incondicionales y por quienes estoy muy orgullosa y feliz de tenerlos a mi lado

¡Gracias por tanta felicidad!

Agradecimientos

Me gustaría expresar un profundo agradecimiento a quienes fueron partícipes de esta tesis y sin los cuales no la hubiera logrado:

A mi querido director Enrique Luque, por haberme aceptado en su laboratorio, brindándome sus conocimientos, confianza y cariño. A Mónica Muñoz de Toro por colaborar con mi trabajo y entregarme su tiempo.

A mi querido co-director Guillermo Ramos y a Jorgelina Varayoud, por enseñarme a descubrir lo apasionante de la investigación, por ofrecerme el consejo que necesité y simplemente por ser mucho más que dos compañeros de trabajo.

A mis compañeros del laboratorio con los que comparto la mayor parte de mis días y que aportaron su valioso esfuerzo y tiempo para ayudarme a lograr este objetivo: Florencia, Laura, Milena, Horacio, Lucas, Cora, Marcelo, Virginia, Marianela, Pablo, Guillermo, Sonia, Tania, Melina, Noelia, Maricel y Juan Carlos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas por haberme otorgado los medios para realizar este trabajo de tesis.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica por darme un lugar y apoyar mi crecimiento académico.

A Vanina, Teresita y Hugo que entraron en mi vida brindándome un inmenso cariño y acompañaron mis años de trabajo de tesis.

A Fernanda, Sebastián, Leonardo y Mercedes que me dieron su afecto y tiempo cuando los necesité.

A personitas que hoy ya no están a mi lado pero, que desde otro lugar, me guiaron en la vida y me enseñaron que vale la pena luchar.

Y a Dios por iluminarme el camino ante la oscuridad.

Listado de presentaciones a congresos y publicaciones

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

Presentaciones en congreso

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; **Bosquiazso, V.L.**; Durando, M.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2001). Distribución de eosinófilos y macrófagos en el cérvix uterino de la rata durante el ciclo estral, la preñez y el posparto. Medicina, Buenos Aires 61: 726.

Bosquiazso, V.L.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2003). La inhibición de la degranulación de mastocitos afecta la angiogénesis en el cérvix uterino de la rata durante la preñez. Medicina, Buenos Aires 63: 632.

Bosquiazso, V.L.; Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro M.M.; Luque, E.H. (2004). Los mastocitos regulan la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación modulando la expresión de VEGF. Medicina, Buenos Aires 64: 142.

Bosquiazso, V.L.; Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro, M.M.; Luque, E.H. (2005). La degranulación de mastocitos afecta la angiogénesis y la expresión del VEGF en el cérvix uterino de la rata durante la preñez. III Encuentro Bioquímico del Litoral VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.

Bosquiazso, V.L.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2005). La exposición neonatal a xenoestrógenos altera la angiogénesis en el útero de la rata adulta. Medicina, Buenos Aires 65: 176.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Bosquiazso, V.L.**; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2005). La exposición neonatal a estrógenos ambientales afecta la proliferación hormonodependiente del estroma uterino en la rata adulta. Medicina, Buenos Aires 65: 176.

Luque, E.H.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Bosquiazso, V.L.**; Muñoz-de-Toro, M. (2006). Efectos de la exposición perinatal a xenoestrógenos sobre el sistema reproductor. XXII Congreso Latinoamericano y 1er. Ibero-Americano de Ciencias Fisiológicas. Buenos Aires.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Bosquiazso, V.L.**; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2006). Exposición neonatal a estrógenos ambientales altera el desarrollo uterino en la rata y disminuye su fertilidad. *Medicina*, Buenos Aires 66: 170.

Bosquiazso, V.L.; Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2006). Cambios organizacionales inducidos por perturbadores endocrinos: alteración en la expresión del gen del VEGF por exposición neonatal a Bisfenol A (BPA) y Dietilstilbestrol (DES). *Medicina*, Buenos Aires 66: 170.

Luque, E.H.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Bosquiazso, V.L.**; Muñoz-de-Toro, M. (2006). Exposición perinatal a xenoestrógenos altera el desarrollo uterino y la fertilidad. Simposio V: Mecanismos de Acción Hormonal en el tracto reproductor femenino. LI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. *Medicina*, Buenos Aires 66: 43.

Bosquiazso, V.L.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Ramos, J.G.; Luque, E.H. (2007). Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la regulación hormonal de la angiogénesis en el útero de la rata adulta. *Medicina*, Buenos Aires 67: 207.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Bosquiazso, V.L.**; Lower, M.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2007). La exposición neonatal a xenoestrógenos modifica en el adulto la expresión uterina de genes asociados con la implantación. *Medicina*, Buenos Aires 67: 209.

Publicaciones

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Bosquiazso, V.L.**; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2004). Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. *Reproduction* 127: 379-387.

Bosquiazso, V.L.; Durando, M.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2005). Macrophage density in the pregnant rat uterine cervix is modulated by mast cells degranulation. *J Reprod Immunol* 65: 147-158.

Bosquiazso, V.L.; Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2007). Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. *Reproduction* 133: 1045-55.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; **Bosquiazso, V.L.;** Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol impairs the uterine response to ovarian steroid hormones. *Biol Reprod* (enviado)

INDICE GENERAL

	Pág.
Abreviaturas utilizadas	i
Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	v
I- Introducción	
1- Tracto reproductor femenino de la rata	1
1.1- Desarrollo perinatal	1
1.2- Organización durante la vida adulta	5
1.3- Adaptaciones fisiológicas	7
1.3.1- Ciclo estral	7
1.3.2- Gestación y parto	9
1.3.2.1- Implantación	9
1.3.2.1- Gestación y parto	11
2- Angiogénesis	13
2.1- Generalidades	13
2.2- Proceso de angiogénesis	15
2.3- Regulación de la angiogénesis por las células inmunes	17
2.3.1- Mastocitos	17
2.3.2- Macrófagos	19
2.4- Control endocrino de la angiogénesis	21
3- Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	23
3.1- Estructura y síntesis de VEGF	24
3.2- Receptores de VEGF	26
3.3- Regulación de la expresión de VEGF	29
4- Receptores de hormonas esteroideas	31
4.1- Receptores para Eg y Pg	32
4.2- Coreguladores	34
4.2.1- Coactivadores	34
4.2.1- Corepresores	37
5- Efectos de perturbadores endocrinos sobre la angiogénesis del útero	41
5.1- Dietilstilbestrol	42
5.2- Bisfenol-A	43
II- Objetivos	
Objetivos específicos	48

III- Materiales y métodos	
1- Animales	50
2- Obtención de las muestras	50
2.1- Momentos seleccionados	50
2.2- Cirugías	51
2.2.1- Disecciones de cuernos y cérvix uterinos	51
2.2.2- Ovariectomías bilaterales	52
3- Procesamiento de las muestras	52
4- <i>CAPITULO I. Angiogénesis en el cérvix uterino de la rata durante la gestación</i>	53
4.1- Evaluación de parámetros angiogénicos	53
4.1.1- Área ocupada por vasos	56
4.1.2- Proliferación de células endoteliales	57
4.1.3- Maduración vascular	58
4.1.4- Expresión de ARNm del VEGF	59
4.1.4.1- Extracción del ARN total	59
4.1.4.2- Transcripción reversa	60
4.1.4.3- Reacción en cadena de la polimerasa competitiva	61
4.2- Niveles séricos de E ₂ durante la preñez	67
4.3- Evaluar la participación de células del sistema inmune en el proceso de angiogénesis	69
4.3.1- Evaluación de Mastocitos	69
4.3.2- Inhibición de la degranulación de mastocitos. Diseño de grupos experimentales	70
4.3.2.1- Evaluación de MC	72
4.3.2.2- Proliferación de células endoteliales	73
4.3.2.3- Área ocupada por vasos	73
4.3.2.4- Maduración vascular	73
4.3.2.5- Expresión del VEGF	74
4.3.2.6- Determinación de los niveles séricos de E ₂	74
4.3.3- Evaluación de macrófagos	75
4.3.4- Asociación entre MC y macrófagos	76
5- <i>CAPITULO II. Efecto de la exposición neonatal a estrógenos ambientales sobre la angiogénesis uterina en la rata adulta</i>	76
5.1- Caracterización de un modelo que imita los efectos uterinos inducidos por las hormonas ováricas durante el periodo pre-	76

implantatorio.	
5.1.1- Área ocupada por nestina	77
5.1.2- Proliferación de células endoteliales	78
5.1.3- Expresión del VEGF	80
5.2- Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre el proceso de angiogénesis uterino	81
5.2.1- Área ocupada por nestina	82
5.2.2- Proliferación de células endoteliales	83
5.2.3- Expresión del VEGF	83
5.2.4- Expresión de receptores de hormonas esteroides (RE α y RP)	83
5.2.5- Expresión de coreguladores de la acción de los receptores de hormonas esteroides (SMRT y SRC-3).	85
5.2.5.1- Obtención de antígenos recombinantes en células procariotas	85
5.2.5.2- Obtención, caracterización y purificación de anticuerpos policlonales monoespecíficos de conejo	87
5.3- Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la fertilidad de la hembra	89
6. Análisis estadístico	91
IV- Resultados	
<i>CAPITULO I: Angiogénesis en el cérvix uterino de la rata durante la gestación</i>	93
1- Evaluación de parámetros angiogénicos	93
1.1- Proliferación endotelial	93
1.2- Área vascular	93
1.3- Maduración vascular	93
1.4- Expresión del VEGF	94
1.4.1- Asociación entre proliferación endotelial y expresión del ARNm del VEGF	97
2. Control de la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación	98
2.1- Evaluación de los niveles séricos de E ₂	98
2.2- Evaluación de células del sistema inmune	100
2.2.1- Densidad de MC	100
2.2.2- Participación de los MC en la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación	101

2.2.2.1- Densidad de MC	102
2.2.2.2- Porcentaje de MC degranulados	102
2.2.2.3- Determinación de los niveles séricos de E ₂	103
2.2.2.4- Evaluación de parámetros angiogénicos	103
2.2.3- Densidad de macrófagos	107
2.2.4- Asociación entre MC y macrófagos	109
<i>CAPITULO II: Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la angiogénesis uterina en la rata adulta</i>	113
3- Caracterización de un modelo que imita los efectos uterinos inducidos por las hormonas ováricas durante el periodo pre-implantatorio.	113
3.1- Área vascular ocupada por nestina	113
3.2- Proliferación de células endoteliales	114
3.3- Expresión del VEGF	115
4- Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre el proceso de angiogénesis uterino	116
4.1- Área vascular ocupada por nestina	116
4.2- Proliferación de células endoteliales	117
4.3- Expresión del VEGF	118
4.4- Expresión del receptor de estrógeno alfa (RE α)	121
4.5- Expresión del receptor de progesterona (RP)	122
4.6- Generación de anticuerpos contra coreguladores de receptores esteroides	124
4.6.1- Expresión de coreguladores de la acción de receptores esteroides	126
5- Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la fertilidad de la hembra.	128
V- Discusión	
1- La angiogénesis del cérvix uterino como adaptación fisiológica durante la preñez	134
2- La angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación es regulada, en parte, por la degranulación de MC	140
3- La exposición neonatal a xenoestrógenos modifica parámetros relacionados con la angiogénesis uterina	147
4- Los animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos son subfértiles	152

VI - Conclusiones	157
VII - Resumen	160
VIII - Abstract	171
IX- Bibliografía	181

ABREVIATURAS UTILIZADAS

E₂	17-β estradiol
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADN	Ácido desoxiribonucleico copia
ARNm	Ácido ribonucleico (mensajero)
H₂O₂	Agua oxigenada
α-SMA	Alfa actina de músculo liso
BPA	Bisfenol A
BrdU	Bromodeoxyuridina
PBS	Buffer fosfato
cm	Centímetros
SRC	Coactivador de receptores esteroides
col	Colaboradores
NCoR	Corepresor de receptores nucleares
CL	Cuerpos lúteos
Vv	Densidad de volumen
DOI	Densidad óptica integrada
dNTP	Desoxinucléotidos trifosfatos
D	Día
DPN	Día postnatal
DAB	Diaminobencidina
DES	Dietilstilbestrol
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
HRE	Elementos de respuesta hormonal
SEM	Error estándar medio
Eg	Estrógeno
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
FvW	Factor de von Willebrand
AF	Función de transactivación
GST	Glutación-S-transferasa
°C	Grados centígrados

g	Gramos
hs	Horas
HAM	Hormona anti-Mulleriana
FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
Ip	Intraperitoneal
KDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramo
MC	Mastocitos
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
mm	Milímetro
min	Minuto
MMLV	<u>M</u> oloney <u>M</u> urine <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus
ηmol	Nanomoles
NRP	Neurofilinas
OVX	Ovariectomizada
pb	Pares de base
PE	Perturbadores endocrinos
PP	Postparto
Pg	Progesterona
PRL	Prolactina
RIA	Radioinmunoensayos
RMCP I	Rat Mast Cell Proteinase I
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
REα	Receptor de estrógeno α
REβ	Receptor de estrógeno β
RP	Receptor de progesterona

VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
rpm	Revoluciones por minuto
SRY	Sex-determining Region on the Y chromosome
sc	Subcutánea
TA	Temperatura ambiente
TMB	Tetramethyl Benzidine
UV	Ultravioleta
U	Unidades internacionales

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Factores que regulan el proceso de angiogénesis 14
Tabla 2	Coactivadores de la actividad del RE 36
Tabla 3	Corepresores del RE 39
Tabla 4	Protocolo básico de inmunohistoquímica 55
Tabla 5	Secuencia de oligonucleótidos específicos utilizados 67
Tabla 6	Preparación de tubos de reacción para el RIA de E ₂ 68
Tabla 7	Protocolo básico de la segunda parte de una doble IHQ 79
Tabla 8	Secuencia de oligonucleótidos específicos 86
Tabla 9	Densidad de MC en el cérvix uterino 102
Tabla 10	Porcentaje de MC no degranulados 103
Tabla 11	Parámetros angiogénicos en D14 104
Tabla 12	Parámetros relacionados con la preñez en hembras expuestas neonatalmente a xenoestrógenos 129

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Representación esquemática del dominio espacial de los genes HOX en el desarrollo del conducto paramesonérfico humano. 3
Figura 2	Esquema comparativo de la anatomía del útero y cérvix. 5
Figura 3	Fotomicrografía de los cuernos uterinos y cérvix de la rata. 6
Figura 4	Niveles hormonales de Pg, PRL, E ₂ , LH y FSH durante el ciclo estral de la rata. 8
Figura 5	Resumen de los eventos que se llevan a cabo durante el proceso de angiogénesis. 17
Figura 6	Esquema representativo de los principales mecanismos por medio de los cuales los MC pueden estimular el proceso de angiogénesis. 19
Figura 7	Esquema representativo de los cambios de expresión uterina del ARNm del VEGF y su receptor (VEGFR-2) en respuesta a los esteroides (E ₂ y Pg) en función del tiempo. 22
Figura 8	Esquema comparativo de los miembros de la familia del VEGF. 25
Figura 9	Diagrama esquemático, ilustrando la especificidad de unión de los miembros de la familia del VEGF y el camino de señalización del VEGFR-2. 28
Figura 10	Estructura del promotor del VEGF. 29
Figura 11	Representación esquemática de la familia de receptores nucleares. 32
Figura 12	Modelo hipotético del mecanismo genómico de acción del RE. 33
Figura 13	Reclutamiento de coactivadores por el receptor nuclear. 37
Figura 14	Mecanismo de acción de corepresores de RE. 40
Figura 15	Fotografía representativa de las muestras disecadas: cérvix y cuernos uterino. 51
Figura 16	Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección del antígeno de células endoteliales (FvW). 56
Figura 17	Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de la BrdU incorporada a las células. 58
Figura 18	Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección del pericitios y células musculares lisas vasculares. 59

Figura 19	Esquema representativo de un gel que permite seleccionar un producto de amplificación con un peso molecular similar al del VEGF para generar un competidor.	62
Figura 20	Esquema del procedimiento básico de una PCR competitiva.	64
Figura 21	Esquema de localización de los oligonucleótidos para amplificación por RT-PCR del gen del VEGF.	66
Figura 22	Esquema de tratamiento empleado para estudiar la participación de los MC en el proceso de angiogénesis.	71
Figura 23	Características morfológicas e inmunohistoquímicas de los MC evidenciando su estado de degranulación.	73
Figura 24	Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de VEGF.	74
Figura 25	Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de macrófagos.	75
Figura 26	Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de nestina en el útero de la rata.	78
Figura 27	Fotomicrografía representativa de la doble IHQ para la determinación de las células endoteliales que expresan nestina y que además han incorporado BrdU.	79
Figura 28	Esquema del diseño experimental empleado para evaluar el efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos.	82
Figura 29	Fotomicrografía representativa de la doble IHQ para la detección de células endoteliales expresando el RE α y RP.	84
Figura 30	Fotografía del útero y ovarios de una rata preñada control en D18 de gestación.	90
Figura 31	Parámetros angiogénicos en el cérvix uterino de la rata durante la preñez.	94
Figura 32	Transcripción reversa seguida de PCR competitiva del ARNm del VEGF en el cérvix uterino de la rata durante la preñez.	95
Figura 33	Cuantificación del ARNm del VEGF determinado por RT-PCR competitiva.	96
Figura 34	Análisis de las variantes de empalme del ARNm del VEGF en el cérvix uterino durante la preñez.	97
Figura 35	Proliferación endotelial y expresión del ARNm del VEGF durante la segunda mitad de la preñez.	98

Figura 36	Determinación de los niveles séricos de E ₂ durante la gestación evaluados por radio-inmunoensayos.	99
Figura 37	Estudios de correlación entre las concentraciones séricas de E ₂ y la expresión del ARNm de VEGF y la proliferación endotelial.	99
Figura 38	Distribución de MC en el estroma del cérvix uterino de la rata durante la preñez.	101
Figura 39	Niveles séricos de E ₂ en el D18 de preñez de animales controles y tratados con cromoglicato de sodio.	103
Figura 40	Determinación de parámetros vasculares en ratas controles y tratadas con el estabilizador de MC sacrificadas el D18 y el D22 de gestación.	105
Figura 41	Niveles de expresión del VEGF en el cérvix uterino de animales controles y tratados con cromoglicato de sodio, sacrificado en el D18 de gestación.	106
Figura 42	Distribución de macrófagos en el cérvix uterino a lo largo de la preñez y el postparto.	108
Figura 43	Estudio de correlación entre la densidad de MC y de macrófagos presentes en el cérvix uterino a lo largo de la preñez.	109
Figura 44	Densidad de macrófagos en el cérvix uterino en D14, D18 y D22 de preñez de ratas controles y tratadas con el estabilizador de MC.	110
Figura 45	Fotomicrografía de secciones histológicas del cérvix uterino de rata en D18 de preñez.	112
Figura 46	Fotomicrografía representativa de la expresión de nestina en los vasos sanguíneos del compartimiento subepitelial del útero.	114
Figura 47	Fotomicrografías de dobles IHQ de células endoteliales proliferando en el estroma subepitelial del útero de animales OVX y OVX-P+E.	115
Figura 48	Expresión de la proteína del VEGF en el útero de rata adulta OVX y sometida a tratamiento hormonal.	116
Figura 49	Área de vasos sanguíneos que expresan nestina en el estroma subepitelial del útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos.	117

Figura 50	Proliferación de células endoteliales en el estroma subepitelial del útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos.	118
Figura 51	Cuantificación inmunohistoquímica del VEGF en la región subepitelial del útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos.	119
Figura 52	Expresión del ARNm del VEGF en el útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos.	120
Figura 53	Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión del RE α en las células del estroma subepitelial del útero de ratas OVX tratadas con Pg más Eg.	121
Figura 54	Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión del RE α en las células del compartimiento endotelial del estroma subepitelial del útero de ratas OVX tratadas con Pg más Eg.	122
Figura 55	Evaluación de la expresión del RP en el estroma subepitelial y endotelio del útero de animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos.	123
Figura 56	Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión GST-SMRT.	124
Figura 57	Caracterización por IHQ del anticuerpo anti-SMRT.	125
Figura 58	Caracterización por IHQ del anticuerpo anti-SRC-3.	126
Figura 59	Localización inmunohistoquímica de coreguladores de receptores esteroides en ratas expuestas neonatalmente a xenoestrógenos y luego sometidas al protocolo con Pg y Eg.	127
Figura 60	Cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de SMRT y SRC-3 en el compartimiento subepitelial del útero de ratas OVX tratadas con Pg más Eg y expuestas neonatalmente a xenoestrógenos.	128
Figura 61	Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre parámetros relacionados con la fertilidad de la rata.	130
Figura 62	Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos con relación al número de sitios de implantación y al desarrollo embrionario.	131

I - INTRODUCCIÓN

1- Tracto reproductor femenino de la rata

1.1- Desarrollo perinatal

La diferenciación sexual ha sido motivo de asombro por siglos. En el año 335 antes de Cristo, Aristóteles postulaba que el dimorfismo sexual se debía a diferencias en la temperatura del semen al momento de la copulación (Haqq y Donahoe 1998). Muchos siglos después, Painter (1923) descubrió la primera pista genética: todos los machos de mamíferos poseían un par de cromosomas XY y todas las hembras XX. En 1947, Jost y colaboradores demostraron que los embriones (de cualquier sexo cromosómico) de conejos castrados se desarrollaban como hembra, sugiriendo que no era necesaria la presencia de una gónada para la diferenciación de la hembra. Más tarde, en la década del '90, el descubrimiento del gen SRY (del inglés: *Sex-determining Region on the Y chromosome*) terminaría con la larga búsqueda del responsable de la diferenciación de machos y hembras en mamíferos (Haqq y Donahoe 1998).

En la actualidad, luego de tantos años de investigaciones, se sabe que la diferenciación sexual en los mamíferos es un proceso controlado genéticamente y por hormonas. Comienza con el establecimiento del sexo genético o cromosómico (XY o XX) al momento de la concepción. Durante el desarrollo embrionario temprano, los dos sexos son indistinguibles. Los embriones XX o XY tienen inicialmente dos pares de conductos genitales: a) los conductos *mesonéfricos* o de *Wolff* y b) los conductos *paramesonéfricos* o de *Müller*, situados dentro de las crestas genitales. Aproximadamente a la sexta o séptima semana de gestación en los humanos o día 11,5 postcoito en el ratón, la expresión del gen SRY inicia la diferenciación gonadal en machos (Haqq y Donahoe 1998). La diferenciación del sexo masculino en los conductos de Wolff (desarrollo de órganos reproductivos internos y externos, y la adquisición de caracteres sexuales secundarios masculinos) es controlado por las hormonas producidas por los testículos: hormona anti-Mulleriana (HAM) y testosterona. En ausencia de genes codificados en el cromosoma Y y de las hormonas producidas por el testículo (testosterona y HAM) en el conducto de Müller ocurre la diferenciación sexual femenina (Vigier y col. 1989).

Respecto al estadio de gónada indiferenciada o bipotencial, diversos experimentos sugieren que las células que son precursoras para las células de Sértoli, son las mismas que pueden dar origen a células foliculares en el ovario; por lo tanto, se las ha denominado "linaje de células de sostén" basado en su rol para sostener el desarrollo de células germinales en ambos sexos (Albrecht y Eicher 2001, Wilhelm y col. 2005). En la gónada XY, la presencia del gen SRY expresado en estas células estimula la diferenciación del linaje de células de sostén hacia células de Sertoli. El gen SRY pertenece a una familia de genes denominados SOX (del inglés: *SRY-related high-mobility-group {HMG} box*). Ellos comparten un dominio de unión al ADN altamente conservado (HMG), de alta movilidad electroforética en geles de poliacrilamida y que originalmente fue identificado en el SRY (Lefebvre y col. 2007). Además del SRY, otros genes SOX (SOX3, SOX8, SOX9) han sido demostrados por participar en la diferenciación sexual (Lefebvre y col. 2007). Se cree que una de las funciones del gen SRY es activar la transcripción del gen SOX9, debido a que se observó un aumento de su expresión en células pre-Sertoli luego de la activación del gen SRY (Schepers y col. 2003).

El conducto paramesonérfico del ratón, antes del nacimiento, es histológicamente indiferenciado y de apariencia homogénea, consistiendo de un epitelio simple sostenido por un mesénquima indiferenciado. Las dos primeras semanas postnatal se corresponden con el tiempo de máxima diferenciación del tracto reproductor femenino. Durante este tiempo se dan diversos eventos histológicos controlados por la expresión de determinados genes (Daftary y Taylor 2006). Eventos comunes al desarrollo del útero en todos los mamíferos incluyen: 1) organización y estratificación del estroma endometrial, 2) diferenciación y crecimiento del miometrio, y 3) desarrollo coordinado de glándulas endometriales. Por el contrario, el cérvix y la vagina no desarrollan glándulas y el epitelio sufre una transición morfológica de cilíndrico simple a escamoso o estratificado (Gray y col. 2001).

Experimentos de recombinación de tejido han demostrado que las interacciones epitelio-mesénquima son críticas para una diferenciación

apropiada de los órganos derivados del conducto Mülleriano. Si se combina un mesénquima de vagina de un animal recién nacido con un epitelio uterino, las células epiteliales presentarán diferenciación vaginal adquiriendo características de epitelio estratificado (Kurita y Cunha, 2001). También se ha demostrado que el receptor de estrógeno alfa (RE α) es necesario en el mesénquima pero no en el epitelio para mediar una respuesta estrogénica sobre el epitelio (Cooke y col. 1997, Kurita y col. 2000). Estos estudios demuestran que el mesénquima envía señales parácrinas al epitelio que inducen su diferenciación. Los procesos de maduración y diferenciación de los diferentes tipos de epitelios se manifiestan por la expresión de moléculas específicas tales como las citoqueratinas (CK) que componen el citoesqueleto.

A nivel genético, la diferenciación del tracto genital femenino está regulada por una familia de genes llamados *Hox* (del inglés: Homeobox, que es una secuencia altamente conservada que codifica un motivo proteico conocido como "homeodominio"). En el ratón y en el humano, los genes HOX se distribuyen en 4 grupos separados: A, B, C y D, conteniendo cada uno entre 9 y 13 genes. Estos genes codifican proteínas que actúan como factores de transcripción activando una cascada de genes reguladores (Duboule y Dolle, 1989, Daftary y Taylor 2006). Se ha demostrado que el gen *Hoxa9* se expresa preferentemente en los oviductos, el *Hoxa10* en el útero, *Hoxa11* en el útero y cérvix y *Hoxa13* en la vagina (Figura 1). En ratones modificados genéticamente se ha observado que la alteración de este patrón de expresión produce cambios anatómicos significativos en la organización espacial del tracto reproductor (Taylor y col. 1997). Así, la interrupción en la expresión del gen *Hoxa10* provoca que el 25% de la porción anterior del útero se transforme en oviducto, impidiendo la correcta implantación del embrión (Block y col. 2000).

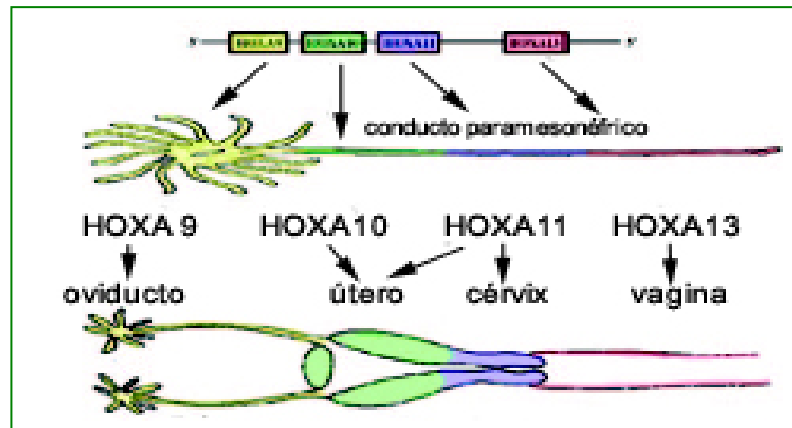


Figura 1: Representación esquemática del dominio espacial de los genes HOX en el desarrollo del conducto paramesoneférico humano. Modificado de *Daftary y Taylor 2006*.

Otro grupo importante de genes que regulan el crecimiento y la diferenciación tisular y celular del tracto reproductor de la hembra son los *Wnt* (del inglés: *Wingless-like morphogenic*). Estos genes codifican una gran familia de proteínas secretadas, ricas en cisteínas, que actúan como moléculas de señalización intercelular durante el desarrollo embrionario (Katayama y col. 2006). Tres miembros de la familia de los genes *Wnt* (*Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt7a*) son principalmente expresados en el tracto reproductor femenino (Miller y col. 1998). La expresión de *Wnt4* es crucial para la determinación del sexo hembra y la formación del conducto Mülleriano. *Wnt5a* es necesario para establecer el desarrollo de la región posterior del tracto reproductor femenino; además, el útero de animales deficientes en *Wnt5* falla en la formación de glándulas que son esenciales para la función adulta. *Wnt7a* es expresado en las células epiteliales luminales del tracto Mülleriano fetal y se mantiene en altos niveles en el epitelio luminal del útero adulto (Katamaya y col. 2006). Una deficiencia en la expresión de *Wnt7* produce esterilidad debido a un desarrollo anormal del oviducto y útero, imitando las anomalías observadas en hembras expuestas prenatalmente al xenoestrógeno dietilstilbestrol (DES) (Miller y col. 1998).

La expresión de estos genes reguladores del desarrollo es controlada por las hormonas esteroideas sexuales (Akbas y col. 2004, Katamaya y col. 2006). Los genes *Wnt* y *HOX* son factores necesarios para la morfogénesis

normal y son también reguladores cruciales de la función uterina en el adulto (Miller y col. 1998; Pavlova y col. 1994). Una falla en la regulación de estos procesos puede provocar problemas durante la implantación y defectos en la preparación uterina responsables de pérdidas recurrentes de preñez e infertilidad (Dey y col. 2004).

1.2- Organización durante la vida adulta

El aparato reproductor de la hembra está formado por los ovarios y el sistema conductor. Este último no solo recibe el óvulo expulsado por el ovario, y lo conduce al lugar de implantación, el útero, sino que recibe a los espermatozoides y los transporta hasta el oviducto, donde se realiza la fecundación. En sentido craneo-caudal el sistema conductor de la hembra consta de las siguientes partes: los oviductos, el útero, el cérvix, la vagina y los genitales externos.

El **útero** de la rata, a diferencia del de la mujer, posee un par de cuernos uterinos que se encuentran completamente separados (Figura 2).

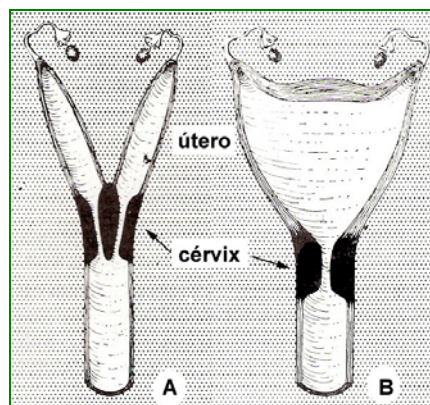


Figura 2: Esquema comparativo de la anatomía del útero y cérvix. A. Rata, B. Mujer. Modificado de Nalbandov, AV. *La estructura de los sistemas reproductores*. En: *Fisiología de la Reproducción*. Ed. Nalbandov, AV; Acribia, Zaragoza, España, 1969.

En los roedores, la pared uterina puede dividirse histológica y funcionalmente en 3 capas (Figura 3): 1- *el endometrio*, constituido por un epitelio cilíndrico simple que reviste el lumen del útero. Por debajo de este epitelio y separado por una membrana basal, se localiza una capa de tejido conectivo laxo, muy vascularizada, donde es muy frecuente encontrar infiltración leucocitaria. También pueden observarse glándulas uterinas que son invaginaciones tubulares del epitelio luminal; 2- *el miometrio*, consiste

de dos capas de músculo liso, una interna orientada circularmente y una más externa orientada longitudinalmente; y 3- *el perimetrio*, constituido de tejido conjuntivo laxo, recubierto por la serosa peritoneal. Presenta muchos vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas (Perez Martinez y Romano Pardo, 1996; Geneser, 2000).

El **cérvix** (s. cuello uterino) es un anillo fibroso, situado entre el útero y la vagina. En la rata se encuentra dividido completamente por un septum cervical, que divide al órgano en dos compartimientos que se comunican en sentido craneal con el cuerno uterino correspondiente, mientras que en sentido caudal ambos canales cervicales desembocan en la vagina (Nalbandov 1969) (Figura 2). Desde el punto de vista histológico se puede distinguir el epitelio luminal que sufre cambios graduales en su longitud. En la región próxima a los cuernos uterinos (denominada endocérvix en la mujer) el epitelio del cérvix se presenta cilíndrico simple mientras que en la región próxima a la vagina (exocérvix) su epitelio se vuelve estratificado. Estas modificaciones son más notorias de acuerdo al estadio del ciclo estral, haciéndose más visibles durante el estro. El epitelio se encuentra separado por una membrana basal del estroma cervical compuesto fundamentalmente por tejido conectivo laxo a denso. Por debajo de esta túnica se encuentra, al igual que en el útero, una capa de músculo liso circular y otra dispuesta longitudinalmente. Por último, el cérvix está recubierto por la serosa (Figura 3) (El-Banna y Hafez 1972, Perez Martinez y Romano Pardo, 1996).

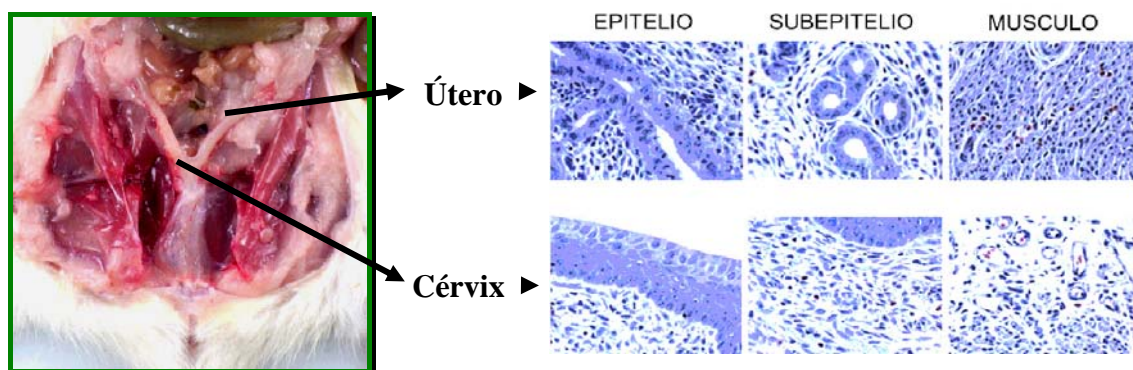


Figura 3: Fotomicrografía de los cuernos uterinos y cérvix de la rata. En la foto de la izquierda se observa la cavidad peritoneal en la que han quedado expuestos los

cuernos uterinos y cérvix de la rata. Sobre la derecha se observa un panel de fotomicrografías correspondientes a cortes histológicos de biopsias de los órganos mencionados, en los que se pueden apreciar las características tisulares de cada compartimiento. Coloración: hematoxilina-eosina. Magnificación: 1980 X. Tomado de *Varayoud 2004*.

1.3- Adaptaciones fisiológicas

1.3.1- Ciclo estral

El ciclo estral es una cascada de eventos hormonales y de comportamientos, altamente sincronizados y que se repiten en el tiempo. Los ciclos reproductivos son precisos en su naturaleza pero demuestran gran diversidad entre especies. El ciclo estral de la rata, a diferencia del ciclo menstrual de la mujer, se caracteriza por la conducta de apareamiento en forma coincidente con la ovulación, asegurando así la oportunidad para la fertilización y la preñez. Tiene una duración de 4 o 5 días y se da durante todo el año, sin influencias estacionales en las colonias de laboratorio (siempre que los animales se mantengan en un estricto esquema de luz-oscuridad y con control de temperatura). Los ciclos estrales ocurren desde el comienzo de la pubertad hasta la senescencia (Lohmiller y Swing 2006) y consiste de 4 etapas: **proestro**, **estro**, **metaestro** y **diestro** (Figura 4). La duración del proestro es aproximadamente de 12 horas, mientras que el estro presenta un rango de 9 a 15 horas, el metaestro entre 14 y 18 horas, y el diestro tiene una duración de 60 a 70 horas (Lawson 2001).

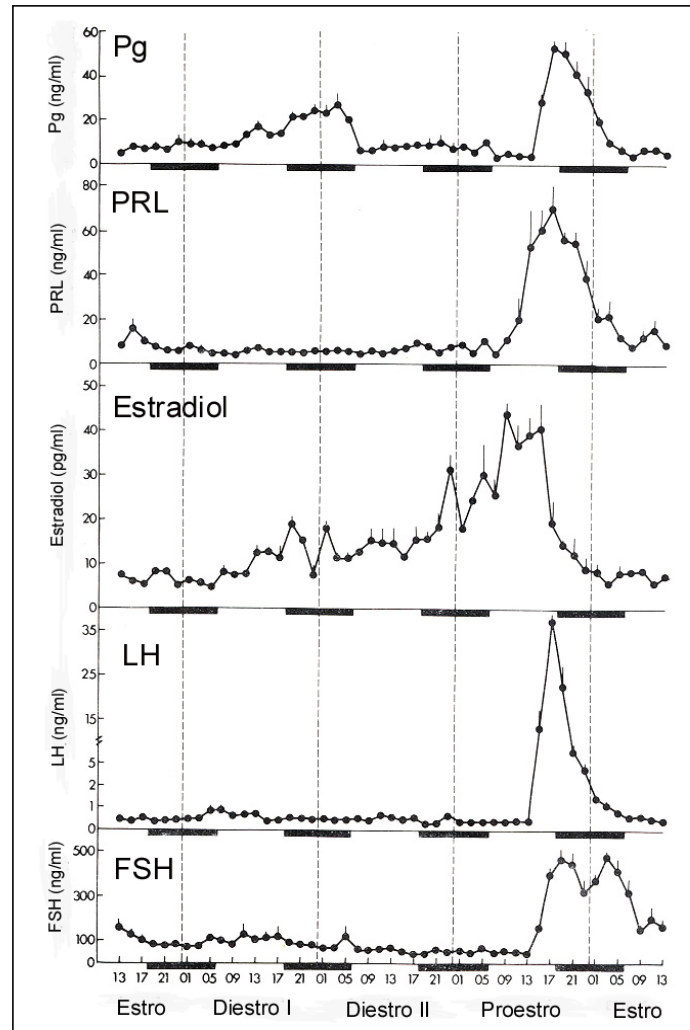


Figura 4: Niveles hormonales de progesterona (Pg), prolactina (PRL), estradiol (E_2), hormona leutinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH) durante el ciclo estral de la rata. Los números sobre el eje x representan distintos momentos del día considerando 24 horas de reloj. Las barras en negro representan el período de oscuridad. Las líneas de punto vertical señalan la medianoche. Cada punto representa el promedio de la concentración hormonal con su desviación estándar. Modificado de *Smith y col. Endocrinology 96: 219-226, 1975*

El ciclo estral es caracterizado por cambios cíclicos en el útero, ovarios, mucosa vaginal, comportamiento y niveles hormonales (Maeda y col. 2000). Fluctuaciones en las hormonas esteroides ováricas estrógeno y progesterona, reguladas por las gonadotropinas (LH, del inglés: Luteinizing Hormone y FSH, del inglés Follicle Stimulating Hormone) secretadas por la hipófisis anterior, resultan en cambios en la citología vaginal que permiten identificar fácilmente las diferentes etapas del ciclo estral (Montes y Luque

1988). Los perfiles de secreción de LH muestran una secreción pulsátil, con frecuencias más altas durante el proestro y más bajas durante el estro/diestro. El pico de LH durante el proestro estimula al folículo preovulatorio a ovular y a formar el cuerpo lúteo. Dos picos de FSH periovulatorios estimulan el crecimiento de folículos más pequeños. El primer pico se correlaciona con el de LH y el segundo pulso está asociado con una disminución de la inhibina después de la ovulación. Durante el metaestro el cuerpo lúteo secreta progesterona (Pg) que decae durante el segundo día del diestro cuando comienzan a aumentar los niveles de Eg. El ciclo se completa durante el proestro cuando ocurre el pico de estrógenos (Eg) que estimula la liberación de gonadotrofinas que llevan a la ovulación (Lohmiller y Swing 2006).

1.3.2- Gestación y parto

La gestación en la rata tiene una duración de 22 - 24 días. El establecimiento y mantenimiento de la preñez en la rata involucra dos eventos endocrinos. El primero es desencadenado por el apareamiento, en el que la estimulación cervicovaginal y de los flancos desencadenan un reflejo neuroendocrino que modifica la liberación de factores hipotalámicos, los que permiten la descarga bifásica (una diurna y otra nocturna) de prolactina (PRL) hipofisaria. El aumento de PRL induce la expresión de receptores para LH en las células lúteas que estimula la producción de Pg necesaria para el mantenimiento de la preñez (Lohmiller y Swing 2006). El segundo evento endocrino necesario para mantener la preñez es dependiente de la implantación y del desarrollo de un feto normal. En los roedores preñados, la placenta y las células deciduales del endometrio producen hormonas similares a la PRL, que ejercen el efecto luteotrófico necesario para mantener la función del cuerpo lúteo hasta el final de la preñez (Bazer, 1999).

1.3.2.1- Implantación

Una etapa crítica en la preñez es la *implantación* del embrión en la pared del útero, una característica de la reproducción de los mamíferos que es el resultado de una compleja serie de pasos interactivos, comenzando con la fijación del blastocisto en el útero y terminando con la formación de

una placenta definitiva. El útero responde a un estímulo apropiado, con cambios tanto en el epitelio como en el estroma conduciendo a la formación de una decidua. Esta reacción *decidual* es una respuesta inflamatoria que involucra una variedad de citoquinas que promueven la proliferación y diferenciación celular del compartimiento subepitelial, como así también, al incremento localizado de la permeabilidad vascular (Weitlauf, 1994). Estos eventos están primariamente bajo el control de los esteroides ováricos, Eg y Pg, permitiendo así que el útero sea receptivo y acepte la implantación del blastocisto (Wang y Dey, 2006).

El endometrio uterino es un tejido altamente vascularizado compuesto de elementos estromales y glandulares que en su mayoría funcionan independientemente de los elementos musculares del cuerpo del útero. La naturaleza sensible a esteroides del endometrio crea un ambiente tisular específico para las complejas necesidades fisiológicas de los fetos. Además, en humanos y otras especies, el sustento provisto por los esteroides en la preñez temprana controla los eventos altamente invasivos necesarios para la implantación y placentación. Una compleja, precisa e interactiva selección de caminos de comunicación biológica, involucrando la acción de los esteroides en conjunto con factores de crecimiento y citoquinas locales, es necesaria para organizar el crecimiento y diferenciación controlada del endometrio uterino (Bridges y Byrnes 2006).

Dos eventos vasculares caracterizan la etapa temprana de la implantación del embrión en la rata. El primero de estos es un *aumento localizado en la permeabilidad vascular* endometrial, siendo uno de los indicadores anatómicos más tempranos del sitio de implantación. El segundo evento vascular asociado con la implantación del embrión es un *incremento en la proliferación de las células endoteliales* (Rabbani y Rogers 2001). Gooder y Rogers (1993) mostraron que en la rata la proliferación endotelial aumenta desde el día 3 hasta el día 5 de la gestación en todo el compartimiento endometrial, mientras que en el día 6 permanece elevada solo en los sitios de implantación. Diversos estudios otorgan evidencias que el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A, referido generalmente y en esta tesis como VEGF) mediaría estos eventos

vasculares. La administración de un anticuerpo anti-VEGF en el día 3 de preñez redujo significativamente la permeabilidad vascular endometrial en respuesta a la implantación, indicando que este factor es clave para regular este acontecimiento (Rabbani y Rogers 2001).

1.3.2.1- Gestación y parto

Durante la preñez, la función contráctil uterina es suprimida, mientras que el cérvix uterino, en orden a retener el feto dentro del útero, debe ser resistente a la tensión y permanecer rígido durante la mayor parte de la gestación. La quiescencia uterina durante la preñez, es esencial para el desarrollo del feto. La Pg ejercería un control sobre la quiescencia uterina: disminuyendo la expresión de genes esenciales para la contractilidad miometrial (ej. conexina 43), estimulando los mecanismos de relajación incluyendo el sistema del óxido nítrico y suprimiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias. Luego, al momento del parto, debe suceder lo contrario. El miometrio experimenta cambios en los mecanismos de traducción de señal y la síntesis de nuevas proteínas, incluyendo conexina, canales iónicos y receptores de uterotoninas, favoreciendo así la contractilidad del útero. Al mismo tiempo hay una regulación hacia abajo del sistema del óxido nítrico, disminuyendo la relajación uterina y colaborando con la expulsión del feto al momento del parto (Garfield y col. 1998).

Si bien la actividad uterina es el signo de parto más común, los cambios que ocurren en el cérvix son la característica determinante de un parto pre-término y a término. Un punto significativo en la evaluación del parto pre-término se relaciona con los cambios cervicales, y está claro que el cérvix juega un papel importante tanto en el mantenimiento de la preñez como en la iniciación del parto (Clark y col. 2006). El cérvix uterino, que durante la gestación permanece cerrado actuando como una barrera físico-biológica que protege al feto en desarrollo, en el momento del parto debe dilatarse siendo esto un requisito necesario para un parto normal y así evitar traumatismos del neonato. Esta significativa función dual del cuello uterino está asociada con importantes cambios histofisiológicos (Muñoz-de-Toro y col. 2003).

Se ha sugerido que los cambios morfológicos y bioquímicos observados en el cérvix uterino durante la preñez y el parto presentan características semejantes a los procesos inflamatorios clásicos (Liggins, 1981), sin embargo, el control del ablandamiento del cérvix uterino es un proceso muy complejo del cual se conoce poco. En varias especies se demostró que la dilatación del cérvix uterino está asociada con una extensa remodelación del colágeno temporalmente asociada a una infiltración de leucocitos polimorfonucleares. Estudios de nuestro laboratorio, y de otros grupos, evaluaron el control hormonal de ambos procesos en la rata y se demostró que el $17\text{-}\beta$ estradiol (E_2) es responsable de promover la infiltración de eosinófilos, mientras que la Pg inhibe el efecto del E_2 (Duchesne y Badia 1992, Luque y col. 1996, Ramos y col. 2000). También se observó que la remodelación del colágeno del cérvix la induce la relaxina y que esto ocurre de manera independiente de la infiltración de los polimorfonucleares (Luque y col. 1998; Ramos y col. 2000). En el tracto genital de ratas y ratones durante la preñez, se ha descrito además, la aparición de edema, producción de prostaglandinas y leucotrienos, neovascularización e infiltración y activación celular (Luque y Montes 1989, Luque y col. 1996).

La Pg es una hormona clave para el mantenimiento de la preñez. La disminución de su acción, ya sea por una menor síntesis hormonal o por cambios en la expresión de sus receptores, cumple un rol significativo en la iniciación del parto (Clark y col. 2006). Lee y Sherwood (2005) demostraron que Eg, Pg y relaxina promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis en el cérvix, siendo estos efectos hormonales más pronunciados hacia el final de la preñez cuando es significativo el crecimiento del cérvix. El aumento en el contenido de células epiteliales es necesario para alcanzar el incremento en la circunferencia del lumen cervical que se da durante la segunda mitad de la preñez; mientras que la acumulación de células estromales contribuyen al ablandamiento del cérvix, haciéndolo más extensible al momento del parto. Ambos aspectos de la remodelación cervical son necesarios para un parto seguro.

Los eventos moleculares responsables del ablandamiento cervical son pobremente conocidos. La literatura ha implicado a las metaloproteasas de la matriz (MMP) como enzimas responsables de la disminución de la fuerza de tensión del cérvix (Chien y col. 2005). Se demostró que las MMP-2, -3, -7, -9, y -13 están presentes en la rata durante la gestación. Un incremento en la expresión del ARNm de la MMP8 en humanos ha sido correlacionado con la dilatación cervical durante el parto (Chien y col. 2005). MMP-3 puede también jugar un papel importante en este proceso de remodelación tisular. MMP-7 y -13 alcanzan un pico de expresión en el periodo postparto y se los ha asociado con la involución uterina (Clark y col. 2006). Lee y Sherwood (2005) han sugerido que estos eventos de remodelación son también controlados por el microambiente hormonal de la preñez.

La vascularización del tracto reproductivo posee una función clave permitiendo la adecuada fuente de nutrientes para el normal mantenimiento de la preñez. Los procesos celulares antes mencionados son demandantes de energía, y para ello es necesario un adecuado desarrollo vascular. Así mismo, los cambios en la permeabilidad vascular y la infiltración de leucocitos observados a término, fuertemente sugieren un rol activo del compartimiento vascular durante la gestación y el parto (Hyder y Stancel 2000).

2- Angiogénesis

2.1- Generalidades

En el adulto, las células endoteliales se encuentran quiescentes o en reposo y rara vez se dividen, sin embargo bajo estímulos adecuados pueden entrar en el ciclo de división celular y desarrollar nuevos vasos sanguíneos. Este evento ha sido denominado *angiogénesis*, refiriéndose así, al crecimiento de nuevos vasos a partir de una microvasculatura pre-existente. Este es un evento de gran importancia en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos. En el adulto, la angiogénesis está asociada con remodelación/reparación tisular (e.g.: como durante la menstruación), cicatrización, inflamación, generación y metástasis de tumores (Dvorak 2000; Griffioen y Molema 2000). Los eventos que ocurren durante el desarrollo de la angiogénesis son complejos, involucrando factores de

crecimiento pro-angiogénicos e inhibidores de angiogénesis. Normalmente, el organismo mantiene un perfecto balance entre estos moduladores. Sin embargo, cuando los factores de crecimiento angiogénicos son producidos en exceso en relación a los inhibidores, la balanza se inclina en favor del crecimiento de nuevos vasos. A la inversa, cuando los inhibidores se encuentran en exceso respecto a los estimuladores, la angiogénesis es frenada (Turner y col. 2003).

Un listado de factores pro- y anti-angiogénicos son presentados en la Tabla 1 (<http://www.angio.org/understanding>):

Tabla 1: Factores que regulan el proceso de angiogénesis

Factores angiogénicos	Inhibidores de la angiogénesis
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Angiogenina ▪ Angiopietina-1 ▪ Factores de crecimiento fibroblástico: ácido (aFGF) y básico (bFGF) ▪ Follistatina ▪ Factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) ▪ Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) ▪ Interleuquina -8 (IL-8) ▪ Leptina ▪ Factor de crecimiento placentar ▪ Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF) ▪ Factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) ▪ Pleiotrophina (PTN) ▪ Progranulina ▪ Proliferina ▪ Factor de crecimiento transformante - alfa (TGF-α) ▪ Factor de crecimiento transformante - beta (TGF-β) ▪ Factor de necrosis tumoral -alpha (TNF-α) ▪ Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)/factor de permeabilidad vascular (VPF) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Angioarrestina ▪ Angiostatina (fragmento del plasminógeno) ▪ Antitrombina III antiangiogénica ▪ Inhibidor derivado del cartílago (CDI) ▪ Fragmento de complemento CD59 ▪ Endostatina (fragmento del colágeno XVIII) ▪ Fragmento de fibronectina ▪ Heparinasas ▪ Fragmento hexasacárido de heparina ▪ Gonadotrofina coriónica humana (hCG) ▪ Interferón $\alpha/\beta/\gamma$ ▪ Proteína inducible por interferón (IP-10) ▪ Interleuquina-12 ▪ Inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) ▪ 2-Methoxiestradiol ▪ Inhibidor de activador del plasminógeno ▪ Factor de plaqueta-4 (PF4) ▪ Prolactina (fragmento de 16kD) ▪ Retinoides ▪ Tetrahydrocortisol-S ▪ Trombospondina-1 (TSP-1) ▪ Factor de crecimiento transformante - beta (TGF-β) ▪ Vasculostatina

Como previamente se comentó el aporte vascular es un requerimiento fundamental para las funciones reproductivas (Ferrara y Davis-Smyth 1997, Goth y col. 2003). La angiogénesis ocurre regularmente en asociación con los cambios cíclicos en el endometrio de la hembra adulta y durante la implantación y subsiguiente placentación (Heryanto y Rogers, 2002). Durante la preñez y el parto, el cérvix uterino sufre procesos de adaptación, tal como infiltración de polimorfonucleares y remodelación del colágeno. (Luque y col. 1996, 1998). Todos estos procesos son demandantes de energía, y es esencial un sistema vascular que provea suficientes nutrientes.

2.2- Proceso de angiogénesis

La angiogénesis, básicamente involucra los siguientes pasos (Figura 5):

1- La presencia de un estímulo apropiado (e.g. injuria, hipoxia tisular, isquemia, cambios morfológicos de las células endoteliales que las hace susceptibles a mitógenos) desencadena el proceso, produciendo y liberando factores angiogénicos que difunden dentro del tejido cercano.

2- Los factores angiogénicos se unen a sus receptores específicos localizados sobre las células endoteliales de vasos sanguíneos pre-existentes ubicados en su cercanía.

3- La unión del factor de crecimiento a su receptor activa a la célula endotelial. Se traduce la señal dentro de la célula y esta comienza a producir nuevas moléculas, incluyendo enzimas.

4- Las enzimas degradan la membrana basal que rodea a los vasos sanguíneos.

5- La célula endotelial comienza a proliferar y migra hacia el estímulo inicial, pasando a través de la membrana basal degradada. Este paso es conducido principalmente por mediadores angiogénicos. Estos mediadores se pueden encontrar solubles, unidos a la matriz extracelular o a la membrana celular o bien pueden ser componentes de la misma matriz extracelular. La plasmina es una proteasa importante en este paso debido a que degrada fibronectina, laminina y activa algunas metaloproteinasas de la matriz (MMP), lo cual facilita la migración de las células endoteliales. Además, moviliza diversos factores de crecimiento unidos a la matriz extracelular.

6- Moléculas especializadas, moléculas de adhesión o integrinas, ayudan a la formación del nuevo vaso.

7- Varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales, fibroblastos, células inflamatorias y células endoteliales producen enzimas adicionales tales como MMP para degradar el tejido que rodea al vaso en crecimiento facilitando la disposición del mismo. A medida que el vaso se extiende, el tejido circundante se re-acomoda.

8- Las células endoteliales se constituyen en una estructura tubular, característica de los vasos sanguíneos.

9- Los vasos sanguíneos individuales se conectan para formar, eventualmente, una red anastomosada por la que puede circular la sangre.

10- Finalmente, la interacción de las células endoteliales con la matriz extracelular y las células mesenquimales es un requisito para formar una vasculatura estable. El reclutamiento de células de la pared está mediado generalmente por las células endoteliales a través de la síntesis y secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas, que es mitógeno y quimioatractivo de una variedad de células mesenquimales. La subsiguiente diferenciación de la célula precursora mural a pericito y a célula muscular lisa se cree que es dependiente del contacto célula-célula. Por lo tanto, los nuevos vasos sanguíneos formados son estabilizados por células musculares especializadas (células musculares lisas, pericitos) que proveen un soporte estructural. Además, la coincidente envoltura del vaso creciendo por los pericitos con la deposición de la membrana basal y el cese del crecimiento del vaso indican una importante regulación del crecimiento de los vasos por parte de los pericitos (Turner y col. 2003, Griffioen y Molema 2000, Albrecht y Pepe 2003).



Figura 5: Resumen de los eventos que se llevan a cabo durante el proceso de angiogénesis. Modificada de <http://www.angio.org>, 2000.

Como puede deducirse en base a lo anteriormente expuesto y a diversos trabajos publicados (<http://www.angio.org>, Tonini y col. 2003), la angiogénesis involucra varios factores de crecimiento pro-angiogénicos, sin embargo muchas evidencias muestran que el VEGF juega un rol clave en la angiogénesis fisiológica y patológica (Turner y col. 2003, Ferrara y col 2003, Griffioen y Molema, 2000)

2.3- Regulación de la angiogénesis por las células inmunes

Aunque la angiogénesis es sustancialmente un evento de células endoteliales, hay otros tipos de células y muchas clases de mediadores involucrados en este proceso (Griffioen y Molema 2000, Hiromatsu y Toda 2003). Las células del sistema inmune tales como macrófagos/monocitos, linfocitos y mastocitos (MC) pueden afectar de manera significativa el balance de factores pro y anti-angiogénicos, ejerciendo un efecto importante sobre el proceso de angiogénesis.

2.3.1- Mastocitos

Los MC han sido reconocidos como células efectoras versátiles que sirven como un vínculo clave para las interacciones entre el sistema

nervioso, inmune y endocrino (Rudolph y col. 2004). Los MC tienen importantes funciones en una variedad de respuestas biológicas. Hace más de 20 años, diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han vinculado a la degranulación y activación de MCs con la neovascularización (Folkman 1982, Levi Schaffer y Pe'er 2001, Norrby 2002). Esta consideración es parcialmente sostenida por las observaciones que establecen una estrecha asociación anatómica entre los MCs y los vasos sanguíneos, ya que estas células inmunes se localizan frecuentemente en áreas próximas a los vasos; y por el reclutamiento de estas células durante el crecimiento de un tumor, la cicatrización de tejidos y la inflamación (Benítez-Bribiesca y col. 2001, Fukushima y col. 2001, Norrby 2002).

Los MCs son células grandes, a menudo ovales, cuyo citoplasma está ocupado completamente por gránulos. Estos gránulos contienen varias sustancias que son importantes mediadores relacionados con la inflamación y las reacciones inmunes (Geneser, 2000). Todas estas sustancias son liberadas de los MCs por exocitosis, en un proceso denominado *degranulación*.

Específicamente, en relación a la angiogénesis, la degranulación de MCs puede ejercer su efecto a través de múltiples intermediarios y vías (Figura 6):

- a- Factores pro-angiogénicos potentes tales como VEGF, bFGF, TGF- β , TNF- α e IL-8,
- b- Proteinasas y heparinasas, que liberan factores pro-angiogénicos unidos a la heparina sobre la superficie celular y la matriz extracelular,
- c- Histamina, y algunos mediadores derivados de lípidos que inducen permeabilidad vascular teniendo efectos pro-angiogénicos,
- d- Reclutamiento quimiotáctico de monocitos/macrófagos y linfocitos que pueden contribuir con moléculas moduladoras de angiogénesis,
- f- Liberación de mediadores tales como TNF α , TGF β , IL-6 que estimulan la síntesis de VEGF por otras células (Ribatti y col. 2001, Norrby 2002, Puxeddu y col. 2005).

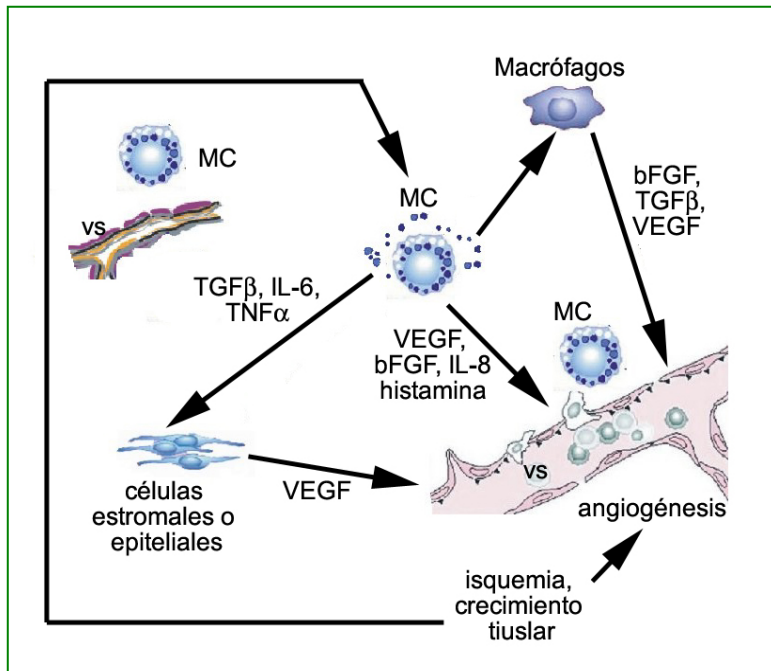


Figura 6: Esquema representativo de los principales mecanismos por medio de los cuales los MC pueden estimular el proceso de angiogénesis

La activación de los MCs resulta en la síntesis de varios mediadores, los cuales pueden tener efectos biológicos diversos y a veces opuestos. Asimismo, otros tipos celulares también producen los mismos mediadores, complicándose aún más el análisis de las funciones de los MCs *in vivo* y la predicción de su efecto biológico neto (Norrby, 2002). Actualmente existen numerosas herramientas para estudiar, de manera más específica, la participación de los MCs en diferentes procesos. Por ejemplo, la aplicación *in vivo* de agentes que afectan la secreción/degranulación de estas células es una metodología muy utilizada; ya sea estimulando la liberación del contenido de sus gránulos [con agentes polibásicos como el componente 48/80 (secretagogo), citoquinas o anafilotoxinas] o actuando como agentes estabilizadores de la membrana de los gránulos que impiden la degranulación (como por ejemplo, el cromoglicato de sodio) (Gunin y Sharov, 1998; Norrby, 2002).

2.3.2- Macrófagos

Varios trabajos han demostrado que los macrófagos también juegan un rol clave en la angiogénesis de tumores y de procesos inflamatorios. Su importancia deriva de: a) su presencia en tejidos normales y varios tejidos tumorales, b) su potencial para activarse en respuesta a un estímulo

apropiado, y c) su gran repertorio de productos secretorios tales como proteasas, interleuquinas y factores de crecimientos (bFGF, TGF y VEGF) (Sunderkötter y col. 1994).

En los tejidos, los macrófagos no son angiogénicos *per se*, necesitan ser estimulados para ejercer un rol angiogénico cambiando o modificando el patrón de expresión de sus productos secretorios (Polverini y col. 1977; Sunderkötter y col. 1994). La función primaria de la angiogénesis es proveer suficiente aporte sanguíneo para revertir una isquemia tisular (por una pobre perfusión) y la hipoxia resultante (baja tensión de oxígeno), la escasez de nutrientes y la acumulación de productos metabólicos de desechos. Los macrófagos tienen la habilidad para adaptarse a estas condiciones desfavorables tales como hipoxia o alta concentración de lactato, alterando su perfil de expresión génica y su actividad metabólica (Crowther y col. 2001, Sunderkötter y col. 1994). La hipoxia induce la liberación de factores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos. Además, estudios *in vitro* mostraron que la hipoxia induce la activación de macrófagos estimulando la liberación de citoquinas y factores de crecimiento angiogénicos (e.g.: VEGF), junto con enzimas proteolíticas que podrían jugar un rol en la promoción de la formación de nuevos vasos (Crowther y col. 2001). Cabe señalar, que los macrófagos son capaces de promover varias etapas del proceso de angiogénesis en virtud de sus productos secretorios. Los macrófagos pueden aumentar la permeabilidad vascular liberando sustancias vasoactivas como VEGF, sustancia P o prostaglandinas. En el mismo sentido producen varias citoquinas además de proteasas que facilitan la migración, mitosis y diferenciación de las células endoteliales (Sunderkötter y col. 1994).

Por otra parte, recordando que Liggins y col. (1981) sugirieron que los cambios histomorfológicos y vasculares característicos del útero y del cérvix a término, imitan una reacción inflamatoria, los macrófagos podrían intervenir en estos procesos. Un estudio realizado por Mackler y col. (1999) demostró que el número de macrófagos en el cérvix uterino de ratón varía con respecto a las etapas de la preñez, encontrándose una mayor densidad al final de la misma, permaneciendo alta hasta 12 horas después del parto.

Además, concentraciones aumentadas de citoquinas producidas por los macrófagos en el cérvix uterino a término ha sido asociado con su ablandamiento y dilatación (Sennstron y col. 1997, Young y col. 2002).

2.4- Control endocrino de la angiogénesis

Si bien las acciones de los E_g sobre las células estromales y epiteliales están bien estudiadas, hasta la fecha han sido conflictivos los resultados obtenidos en lo concerniente al efecto estrogénico sobre el endotelio endometrial. El E₂ rápidamente estimula la permeabilidad vascular uterina y la expresión del VEGF y debido a que el aumento de permeabilidad vascular es considerada como un prerrequisito para la angiogénesis, se sugiere al E₂ como un potente estimulador de la angiogénesis uterina durante los procesos reproductivos normales *in vivo*. Sin embargo, no hay evidencias experimentales que demuestren esta conclusión (Ma y col 2001).

Ma y col. (2001) observaron que el E₂ regula transitoriamente la expresión uterina del ARNm del VEGF durante las primeras 6 horas después del tratamiento hormonal, mientras que la Pg tiene un efecto más tardío y sostenido sobre la expresión de este gen (Figura 7). La inducción del ARNm del VEGF en las células estromales y del ARNm de su receptor (VEGFR-2) en el endotelio estromal, junto con un incremento de la densidad de vasos después de tratamiento con Pg, sugieren que este esteroide estimula la angiogénesis uterina. Además observaron que el E₂ sería un regulador negativo, debido a que la expresión de estos dos genes (VEGF y VEGFR-2) disminuye después de 6 horas de administración de la hormona y asimismo el endometrio mostró una reducción en el número de vasos. También, observaron que los cambios inducidos por la administración de Pg sola eran atenuados cuando ésta se administraba junto con E₂. En concordancia con estos resultados, Hastings y col. (2003) reportaron que mientras que el E₂ es mitogénico para las células epiteliales uterinas y aumenta la permeabilidad vascular no tiene efecto sobre la proliferación de las células endoteliales.

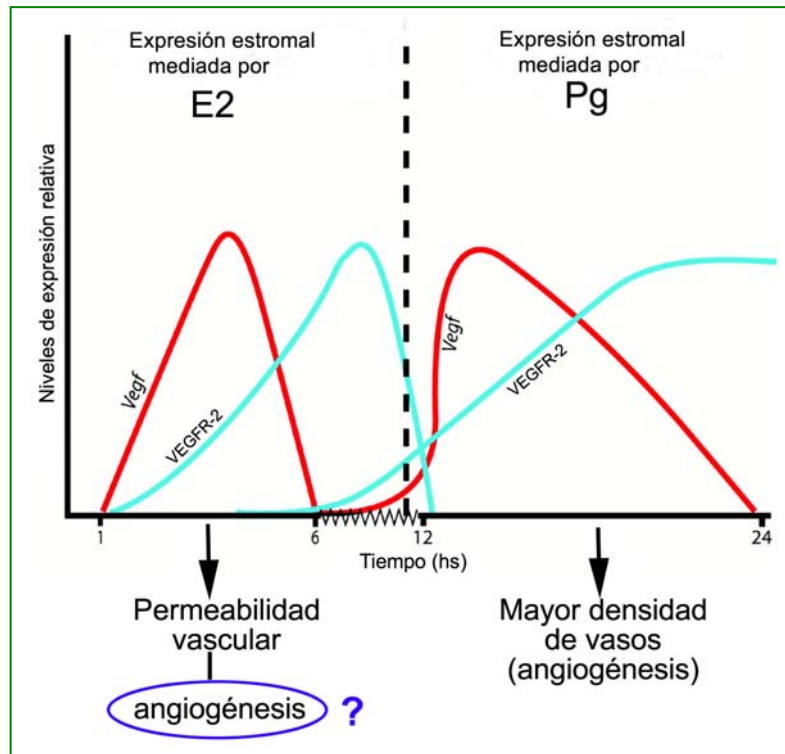


Figura 7: Esquema representativo de los cambios de expresión uterina del ARNm del VEGF y su receptor (VEGFR-2) en respuesta a los esteroides (E_2 y Pg) en función del tiempo. Modificado de *Ma y col. 2001*.

Por el contrario, Heryanto y Rogers (2002), observaron que la administración de E_2 provocó un aumento significativo de la proliferación de las células endoteliales conjuntamente con un aumento de la densidad vascular relativa al compartimiento estromal dentro de las 24 horas de administrada la hormona. Esta rápida respuesta proliferativa de las células endoteliales endometriales al E_2 sería mediada por VEGF. La administración de un anticuerpo anti-VEGF o de un inhibidor del receptor de VEGF significativamente inhibió la proliferación de las células endoteliales endometriales mediada por E_2 en ratones ovariectomizados (Heryanto y col. 2003).

A diferencia del control de la angiogénesis por los Eg, el efecto ejercido por la Pg sobre dicho proceso no es discordante entre los diferentes experimentos. Walter y col. (2005) han demostrado que la Pg estimula la proliferación de las células endoteliales endometriales y que esta proliferación es mediada en parte por el VEGF. Además, en concordancia

con los resultados de Ma y col. (2001), observaron que no es necesario un cebo de E₂ para que la Pg ejerza su acción, al contrario, el E₂ inhibe la angiogénesis mediada por Pg. Estudios en rata preñadas han mostrado que la proliferación de las células endoteliales endometriales aumentó significativamente durante los primeros días de gestación cuando las concentraciones de Pg están aumentando (Goodger y Rogers, 1993). Este evento es de gran importancia fisiológica, porque la Pg es una hormona esencial para la iniciación y mantenimiento de la preñez en todos los mamíferos, y la angiogénesis es un componente esencial durante la implantación y gestación.

En base a lo expuesto podemos concluir que la angiogénesis endometrial está bajo el control de los esteroides ováricos, principalmente Eg y Pg, los cuales actúan a través de sus receptores, funcionando como factores de transcripción y moduladores de la expresión de genes en células blanco. La vía corriente abajo por medio de la cual los Eg y la Pg regulan la angiogénesis permanece oscura.

3- Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

En 1983 Senger y col. observaron que el fluido ascítico de tumores de cobayos hembra, hámsteres y ratones, como así también los medios de cultivos de células tumorales, presentaban cierta actividad que se caracterizaba por el aumento rápido de la permeabilidad vascular. Fue entonces, que a partir de estos medios, aislaron y purificaron, una proteína de 34 a 42 KDa que era distinta a los factores conocidos que inducían aumento de permeabilidad y la denominaron factor de permeabilidad vascular (VPF). Seis años después, Ferrara y Henzel (1989) aislaron y purificaron del medio de cultivo de células foliculares estrelladas de la hipófisis bovina, un factor de crecimiento específico y mitogénico para las células endoteliales que llamaron VEGF. Posteriormente, Connolly y col. (1989) demostraron que el VPF era mitógeno específico para las células endoteliales. Su caracterización estructural por secuenciación de proteína y clonado de ADN complementario mostró que éste factor era idéntico al VEGF (Connolly y col. 1989b, Keck y col. 1989), considerándose entonces

como un único factor. Es así como el VEGF exhibe dos actividades biológicas principales: el aumento de la permeabilidad vascular y la capacidad para estimular la proliferación de las células endoteliales. Además promueve la supervivencia y migración de las células endoteliales.

3.1- Estructura y síntesis de VEGF

El VEGF pertenece a una familia de genes que incluyen al factor de crecimiento placentar, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E. Si bien estas proteínas son productos de distintos genes muestran una alta homología estructural, conservando ocho residuos de cisteína en las mismas posiciones (Halder y col. 2000, Roy y col. 2006). Estos productos funcionan como dímeros dado que dos residuos de cisteína fuera de los ocho generan enlaces disulfuros intermoleculares (Muller y col. 1997). El VEGF está principalmente involucrado en angiogénesis, mientras que el VEGF-C y el VEGF-D participan en la generación de vasos linfáticos (Byrne y col. 2005).

En este trabajo de tesis nos abocamos exclusivamente al estudio del VEGF. El gen humano de este factor está organizado en ocho exones, separados por siete intrones (Houck y col. 1991; Tischer y col. 1991) y su localización cromosómica es 6p21.3 (Vincenti y col. 1996). Presenta al menos nueve variantes debido al empalme (*splicing*) alternativo de su ARNm: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ (Figura 8) (Takahashi y Shibuya, 2005). Los productos son nombrados en función del número de aminoácidos que constituyen el monómero. El VEGF_{165b} es una forma inhibitoria endógena de VEGF, la cual puede unirse a su receptor con la misma afinidad que el VEGF₁₆₅ pero no activa ni estimula el camino de señalización corriente abajo (Woolard y col. 2004).

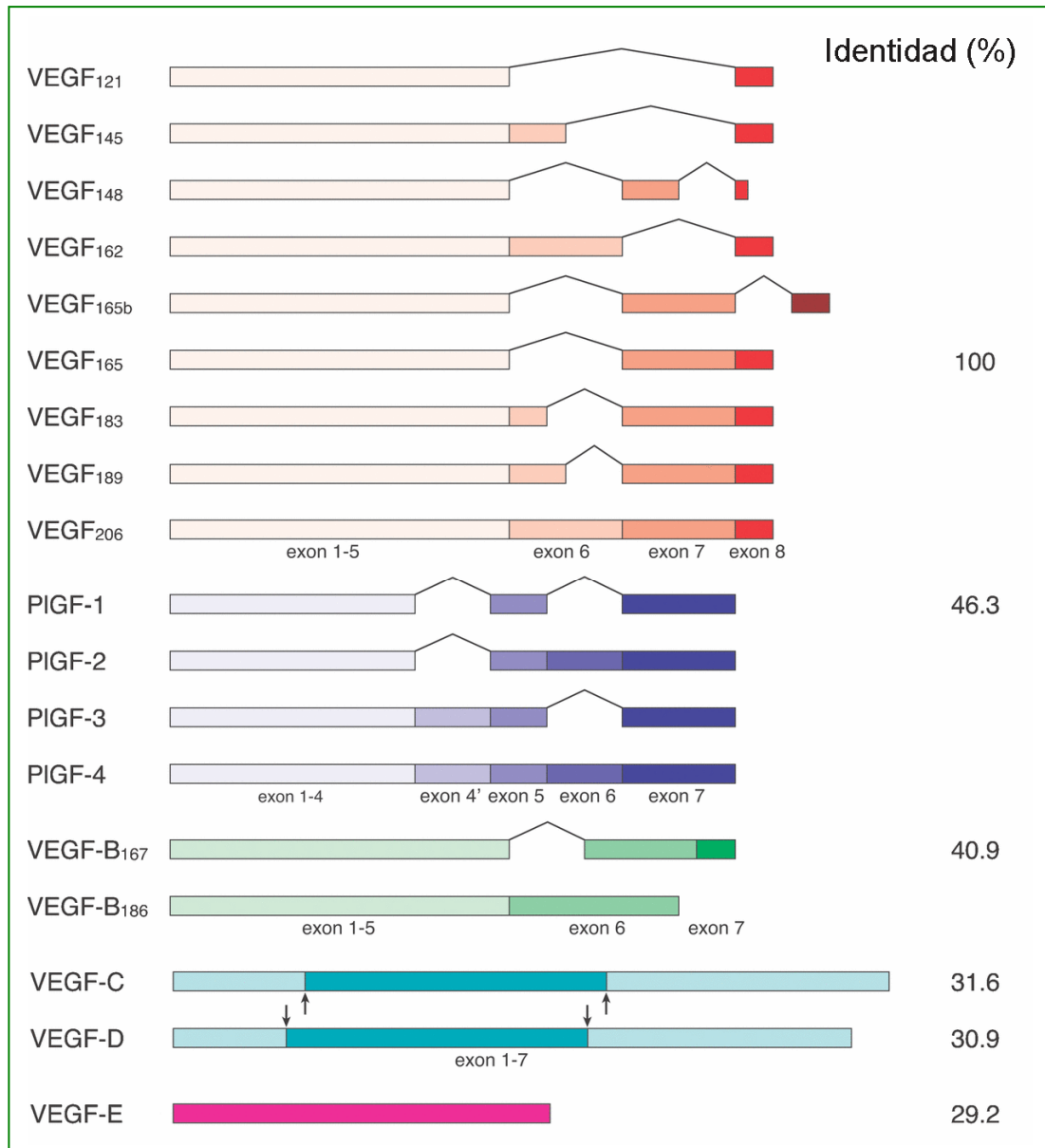


Figura 8: Esquema comparativo de los miembros de la familia del VEGF. El *splicing* alternativo genera diversas variantes para el VEGF, PlGF y VEGF-B. Los números sobre la derecha indican el porcentaje de identidad aminoacídica comparada con VEGF₁₆₅. Las flechas indican el lugar de corte proteolítico que da origen al VEGF-C y VEGF-D maduros. Modificado de *Takahashi y Shibuya, 2005*.

El VEGF es producido por las células endoteliales, macrófagos, linfocitos y una variedad de otros tipos celulares (Ferrara y Davis-Smyth 1997). Si bien, no se conoce como es regulada la expresión de las diferentes variantes, la mayoría de las células productoras de VEGF expresan preferencialmente VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉. El VEGF₁₆₅, es la

variante predominante, es secretada como un homodímero de 46 KDa, constituyendo una proteína básica y con moderada afinidad por la heparina debido a la presencia de 15 aminoácidos básicos dentro de los 44 residuos codificados por el exón 7 (Leung y col. 1989, Keck y col. 1989). En contraste, VEGF₁₂₁ que no contiene los residuos codificados por los exones 6 y 7, no se une a la heparina y puede difundir relativamente libre en el tejido. VEGF₁₈₉, contiene una secuencia adicional codificada por el exón 6 que se une fuertemente a la heparina y es completamente secuestrado en la matriz extracelular y en una menor extensión a la superficie celular. Las variantes unidas a la matriz extracelular pueden ser lentamente liberadas por exposición a heparinasas o más rápidamente como fragmentos bioactivos a través de la ruptura proteolítica inducida por plasmina o uroquinasas en el extremo C- terminal (Plouet y col. 1997, Ferrara y col. 2003, Puxeddu y col. 2005). Esto sugiere que las diferentes variantes del VEGF podrían estar biodisponibles mediante difusión libre o tras la acción de proteasas sobre las variantes más grandes (Ferrara 1999, Dvorak 2002). Estas diferencias en las propiedades bioquímicas de las variantes de empalme podrían promover roles fisiológicos diferentes y formar un entramado complejo que regule la angiogénesis en el tracto reproductor femenino.

En la rata han sido identificadas tres variantes principales: VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈ (Cullinan-Bove y Koos 1993; Hyder y col. 1996), presentando cada una de ellas un aminoácido menos que la correspondiente variante humana. Al igual que en el humano la variante VEGF₁₆₄ es la predominante (Cullinan-Bove y Koos 1993). También, han sido reportadas en roedores otras isoformas de empalme alternativo, tales como VEGF₁₄₄ y VEGF₁₁₅ (Ding y col. 2006, Sugihara y col. 1998).

3.2- Receptores de VEGF

Inicialmente, los sitios de unión del VEGF fueron identificados *in vitro* e *in vivo* sobre la superficie de las células endoteliales. Se han reconocido diferentes receptores a los que pueden unirse los miembros de su familia. Tres de ellos son receptores del tipo tirosina quinasa, **VEGFR-1** (Ems-like-tirosine kinase-1, *Flt-1*), **VEGFR-2** (Kinase insert Domain containing

Receptor, *KDR* o Fetal liver kinase, *Flk-1*) y **VEGFR-3** (Flt-4). VEGFR-1 y VEGFR-2 se localizan primariamente sobre el endotelio vascular mientras que VEGFR-3 se encuentra mayormente en el endotelio linfático. Una variante de empalme alternativo del VEGFR-1 (sVEGFR-1) se encuentra en forma soluble y actúa como un inhibidor de la actividad del VEGF (Ferrara y col. 2003). Otros receptores identificados son las **neurofilinas** (NRP-1 y NRP-2) que son proteínas transmembrana sin actividad tirosina quinasa, originalmente identificadas como receptores de los miembros de la familia de polipéptidos semaforina/colapsina. Originalmente estos receptores fueron implicados en la inhibición del crecimiento de los conos nerviosos (Luo y col. 1993) y posteriormente identificados en células endoteliales. Debido a que carecen de un dominio intracelular tirosina quinasa deben actuar en conjunto con otro receptor (Soker y col. 1998).

La afinidad de VEGFR-1 por VEGF es diez veces mayor que el VEGFR-2, pero su actividad tirosina quinasa es diez veces menor que la del VEGFR-2. El VEGFR-1 puede actuar como "secuestrador" capaz de regular en forma negativa la actividad del VEGF sobre el endotelio vascular, evitando la unión de éste al VEGFR-2 que es el receptor con mayor capacidad mitogénica. La interacción del VEGF con el VEGFR-2, es un requerimiento crítico para inducir el amplio espectro de respuestas biológicas mediadas por este factor (Figura 9). La vía de traducción de señales intracelular en las células endoteliales a través de la dimerización del VEGFR-2 conduce a un aumento de la permeabilidad vascular, proliferación y migración celular (Ferrara y col. 2003). La función de las proteínas NRP sería la de actuar como co-receptores de VEGF₁₆₅, formando un complejo con los receptores tirosina quinasa del VEGF y potenciando así la actividad de estos (Neufeld y col. 2002). Posiblemente, la unión de la isoforma VEGF₁₆₅ a NRP explica en parte la gran potencia mitogénica de esta variante respecto a la VEGF₁₂₁. NRP-1 también pueden unirse a otros miembros de la familia del VEGF (Neufeld y col. 1999, Neufeld y col. 2002), y NRP-2 a la variante VEGF₁₄₅ (Gluzman-Poltorak y col. 2000). La figura 9 resume la afinidad de unión de cada uno de estos receptores por los integrantes de la familia del VEGF.

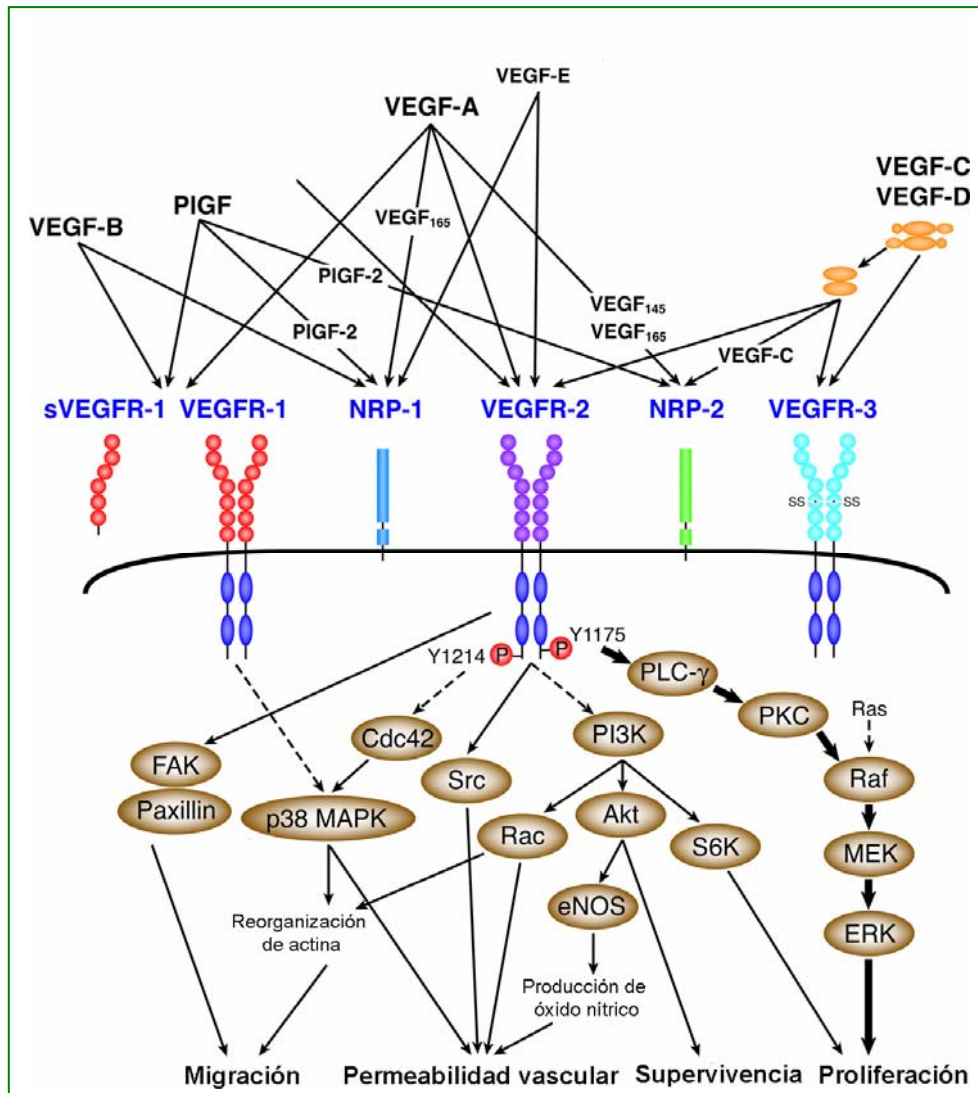


Figura 9: Diagrama esquemático, ilustrando la especificidad de unión de los miembros de la familia del VEGF y el camino de señalización del VEGFR-2. La tirosina 1175 (Y1175) y 1214 (Y1214) son los dos principales sitios de autofosforilación en VEGFR-2. La fosfolipasa C-γ (PLC-γ) se une a Y1175, conduciendo a la fosforilación y activación de esta proteína. Y1214 sería necesaria para la activación secuencial de Cdc42 y p38 MAPK. Muchas proteínas son activadas por el VEGFR-2 a través de un mecanismo desconocido, incluyendo FAK, PI3K y Src. La activación de estas moléculas de señalización promueve varias funciones de las células endoteliales, tales como migración, permeabilidad vascular, supervivencia y proliferación. Modificado de *Takahashi y Shibuya, 2005*.

Estudios realizados con ratones a los cuales se les ha silenciado el gen del VEGFR-1 o del VEGFR-2 han demostrado que ambos receptores son imprescindibles para la formación vascular del embrión (Fong y col. 1995;

Shalaby y col. 1995). En el organismo adulto, la unión del VEGF a uno u otro receptor da lugar a respuestas diferentes; mientras que la mayoría de las respuestas funcionales del VEGF, especialmente en células endoteliales, son mediadas por el VEGFR-2. Al igual que para los receptores, VEGFR-1 y VEGFR-2, estudios en ratones modificados genéticamente en los cuales se ha silenciado el gen de NRP-1 han demostrado que el mismo es un regulador esencial en la formación de la estructura vascular embrionaria (Kitsukawa y col. 1997).

3.3- Regulación de la expresión de VEGF

Un análisis bioinformático de la región 5' promotora del gen de VEGF humano reveló un gran número de potenciales elementos reguladores. Se identificaron sitios de unión para la proteína específica 1 (Sp1), factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), traductor de señal y activador de transcripción 3 (Stat-3), proteína activadora 1 (AP-1), AP-2, y otros, revelando la complejidad de la regulación transcripcional del VEGF (Figura 10) (Xie y col. 2004).

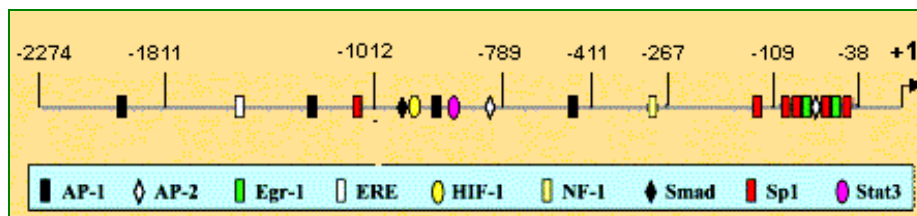


Figura 10: Estructura del promotor del VEGF. Principales factores de transcripción reconociendo elementos dentro del promotor del gen de VEGF humano. El sitio de inicio de la transcripción está indicado como +1. **AP:** proteína activadora; **Egr-1:** factor de respuesta de crecimiento temprana-1, **ERE:** elemento respuesta a estrógeno; **HIF-1:** factor inducible por hipoxia 1, **NF-1:** factor nuclear-1, **Smad:** homólogo al MAD en la *Drosophila* (del inglés: mothers against decapentaplegic), **SP1:** proteína específica 1, **Stat3:** traductor de señal y activador de transcripción 3. Modificado de Xie y col. 2004.

Sp1 es un factor de transcripción que presenta conformación de dedos de zinc y ha sido implicado en la regulación de la expresión de varios genes involucrados en la diferenciación celular. La región dedos de zinc se

une a regiones regulatorias GC (Guanina-Citosina) o GT (Guanina-Timina) presentes en los promotores de un gran número de genes blanco (Thomas y col. 2007). En el gen VEGF se han identificado posibles sitios de unión a SP1 en cercanías del inicio de la transcripción. Muchos estudios *in vitro* han demostrado que esta región rica en GC juega un importante rol tanto en el control de la expresión basal del VEGF como en la inducción mediada por numerosos factores (Finkenzeller y col. 1997, Gille y col. 1997, Salimath y col. 2000). La mutación de alguno de estos sitios puede resultar en una disminución o eliminación de la actividad promotora del gen. La hipoxia es también un importante regulador de la expresión del VEGF tanto *in vitro* como *in vivo* (Ferrara 1999, Marti y Risau, 1998). En condiciones de baja tensión de oxígeno, HIF-1 activa la transcripción del gen del VEGF uniéndose a un elemento de respuesta a hipoxia localizado en la región 5' promotora del gen. Stat3 es otro factor que se puede unir directamente al promotor del VEGF *in vivo* e inducir la transcripción (Xie y col. 2004). Es así como modificaciones genéticas que afecten la expresión de cualquiera de estas proteínas reguladoras (HIF-1, SP1, etc) modulan indirectamente la expresión del VEGF. Por ejemplo, el silenciamiento de la expresión de HIF-1 disminuiría la transcripción del VEGF.

La regulación de la transcripción del VEGF se ha estudiado utilizando en gran medida la región promotora del gen humano. En este sentido la mayoría de los estudios realizados *in vitro* utilizando líneas celulares de rata usan construcciones obtenidas a partir de secuencias derivadas del gen humano del VEGF (Chau y col. 2002). En los últimos años se han comenzado a realizar algunos experimentos que permiten conocer como es la regulación transcripcional del gen del VEGF en la rata. Es ampliamente conocido que el E₂ rápidamente induce la expresión del VEGF en el útero de la rata y este efecto se da a nivel transcripcional (Cullinan Bove y Koos 1993, Rockwell y col. 2002). Recientemente, Kazi y col. (2005) utilizando una técnica de inmunoprecipitación de cromatina, identificaron algunos factores de transcripción que interactúan con el promotor del VEGF en el útero de la rata en respuesta al E₂. El tratamiento con E₂ promovió el reclutamiento de factores reguladores de la transcripción tales como SP-1, RE y p300, a una región proximal del promotor rica en GC. También

identificaron que el E₂ indujo el reclutamiento de HIF-1 a la región promotora del VEGF que contiene un elemento de respuesta a hipoxia, indicando que el HIF-1 es además un importante mediador de la respuesta del VEGF al E₂.

A pesar de que se han reconocido múltiples factores capaces de modificar la expresión del VEGF (leucocitos, citoquinas, hormonas, etc.) muy poco es lo que se sabe acerca del mecanismo molecular que controla su expresión en roedores.

4- Receptores de hormonas esteroides

Los esteroides ováricos son reguladores claves del crecimiento, diferenciación y funciones fisiológicas de muchos tejidos, incluyendo el tracto reproductor. Los esteroides ejercen sus efectos biológicos por unión a sus receptores específicos. Estos forman parte de la superfamilia de receptores nucleares, los cuales son factores de transcripción activados por ligando que actúan normalmente por unión a secuencias específicas del ADN llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE) (Beato y Sánchez-Pacheco, 1996) regulando así la expresión de numerosos y biológicamente importantes genes blancos.

Estructuralmente los receptores nucleares han sido divididos en varios dominios (Figura 11). Todos los receptores nucleares tienen una región amino terminal de longitud variable (100 – 500 aminoácidos) que usualmente contiene una función de activación (AF-1) que contribuye a la actividad transcripcional del receptor y es independiente del ligando. Adyacente, se encuentra el dominio de unión al ADN que es la zona más conservada entre los distintos receptores. Este dominio posee un motivo de dos dedos de zinc coordinados por ocho residuos de cisteína estrictamente conservados. A continuación se localiza el dominio de unión a hormona cerca del extremo carboxilo terminal y contiene una función de transactivación 2 (AF-2), dependiente de la presencia del ligando. En algunos casos los dominios de unión a hormona funcionan como dominio de represión en ausencia de ligando (Lodish y col. 2000).

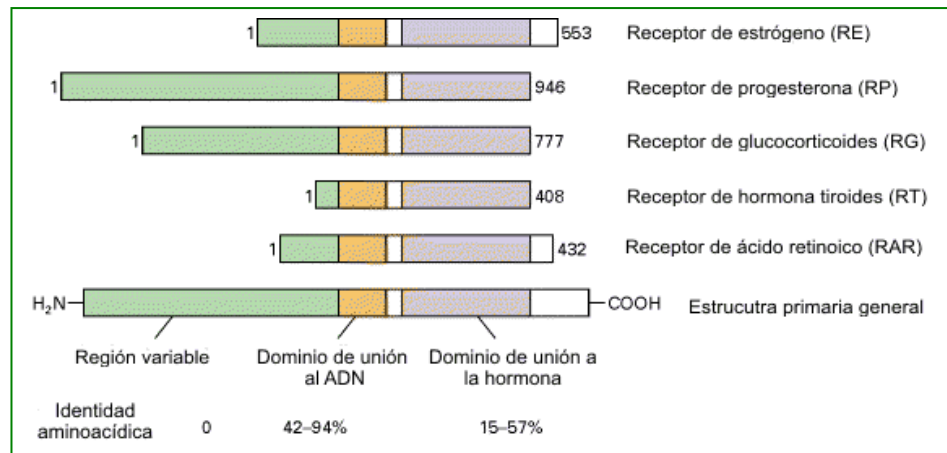


Figura 11: Representación esquemática de la familia de receptores nucleares. Se destacan los dominios que componen las proteínas. Modificado de Lodish y col. *Nuclear Receptor Response Elements* en *Molecular Cell Biology*. Ed. Freeman y Co. New York, 2000.

4.1- Receptores para Eg y Pg

La presencia de receptores de unión para Eg en el útero fue descrita en la década del 60 por trabajos de Jensen y Gorski y sus colaboradores (Jensen y Jacobsen 1962, Toft y Gorski 1966). Durante años se creyó que sólo existía un tipo de receptor en el núcleo de la célula blanco, sin embargo en 1996, se descubre un segundo mediador de los efectos fisiológicos del E_2 que fue llamado receptor de estrógeno beta ($RE\beta$), y se definió al clásico receptor como RE alfa ($RE\alpha$) (Kuiper y col. 1996). Estos receptores son proteínas diferentes codificadas por genes que están localizados en distintos cromosomas (Kuiper y col. 1996). Ambos subtipos poseen los dominios ya definidos y tienen una alta afinidad a la hormona, pero su expresión es diferencialmente regulada (Kuiper y col. 1997). El análisis molecular de ambos receptores reveló que presentan un 95% y un 55% de homología en el dominio de unión a ADN y en el dominio de unión a ligando, respectivamente (Kuiper y col. 1997).

En general el mecanismo de acción de ambos RE se cree que es similar. En ausencia de hormona, el receptor es secuestrado en un complejo multiproteico en el citoplasma de las células. La unión del ligando induce un cambio conformacional dentro del receptor, promoviendo la dimerización del

mismo, su migración al núcleo y la unión de alta afinidad a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en la región promotora de los genes sensibles (Figura 12). Además, el RE α puede formar heterodímeros con RE β en las células que co-expresan ambos receptores. Por lo tanto, los RE tienen la habilidad de interactuar con los genes blancos formando tres complejos diferentes: homodímeros de RE α , homodímeros de RE β y heterodímeros RE α /RE β (Couse y Korach, 1999; Pavao y Traish, 2001).

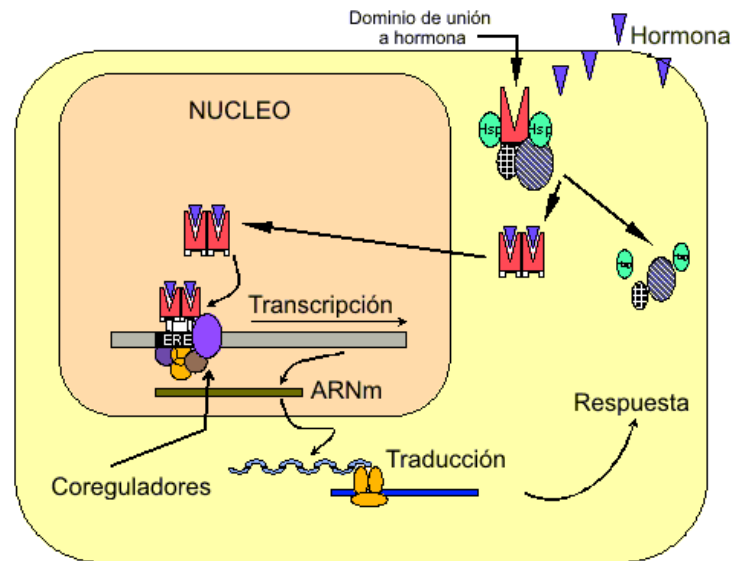


Figura 12: Modelo hipotético del mecanismo genómico de acción del RE. El RE se encuentra unido a un complejo de proteínas de shock térmico (Hsp) en ausencia de ligando. Cuando está presente la hormona, ésta se une al RE y se disocia de las Hsp, permitiendo que el RE actúe como factor de transcripción mediando sus respuestas.

Los receptores que específicamente unen Pg fueron inicialmente caracterizados en el útero de mamíferos en 1970 (Milgrom y Baulieu, 1970). En este caso un único gen codifica para RP y puede producir 9 diferentes transcritos mediante mecanismos de empalme diferenciales de su ARNm. Sin embargo, se han reportado 4 isoformas proteicas en varias especies, siendo 2 de ellas las más encontradas: RP-A (81-83 kDa) y RP-B (116-120 kDa) (Funk y DeMayo, 1999). Estas isoformas se originan como consecuencia de la activación de diferentes promotores que presentan diferentes sitios de inicio de la transcripción. RP-A es una isoforma naturalmente truncada de RP-B y funciona como un transactivador en

algunas células en las que actúa como homodímero, y como represor de RP-B cuando ambas isoformas están presentes (Graham y Clarke 1997).

4.2- Coreguladores

Funcionalmente, la actividad de los receptores nucleares depende de una gran variedad de factores celulares que no se unen al ADN directamente pero son reclutados por ellos a las regiones promotoras de los genes blancos modulando las actividades transcripcionales o biológicas mediadas por los receptores. Estas proteínas son denominadas colectivamente **coreguladores**. Dependiendo del efecto de los coreguladores sobre el resultado de la expresión génica, ellos pueden ser divididos en **coactivadores** que promueven la activación de la transcripción mediada por receptores nucleares y **corepresores** que disminuyen la expresión de genes dependientes de receptores nucleares (Wu y col. 2005).

De acuerdo al modelo clásico de acción de los receptores nucleares, descrito en la figura 12, estos se unen a secuencias específicas del ADN (HRE) e interaccionan con el aparato de transcripción general para regular positiva o negativamente la transcripción de genes (Hall y McDonnell 2005). Además, de la unión del complejo hormona-receptor a los HRE se ha reportado la inducción de genes mediadas por la asociación de dicho complejo a otras regiones regulatorias (no HRE, por ejemplo regiones ricas en CG) dentro de los genes blanco. Específicamente, la expresión mediada por el RE α del gen del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y de colagenasa es mediada a través de la interacción del receptor con otros factores de transcripción, c-Jun y c-Fos, en sitios de unión AP-1 (Kushner y col. 2000), mientras que varios genes conteniendo secuencias promotoras ricas en GC, tales como el VEGF, pueden ser activadas a través de los complejos ER α -Sp1 (Kazi y col. 2005). Estas interacciones proteína-proteína entre los coreguladores y los receptores nucleares resultan en un modo complejo y combinable de regulación de la transcripción (Privalsky 2004).

4.2.1- Coactivadores

Los coactivadores son moléculas reclutadas por los receptores nucleares activados por la unión del ligando y que llevan a un aumento en

la expresión de genes sensibles. Experimentos iniciales realizados en levaduras por Ptashne y Gann (1990) presentaron a los coactivadores como "adaptadores transcripcionales". Estos adaptadores fueron predichos para proveer un puente entre los factores de transcripción unidos al ADN y la maquinaria de transcripción general. Actualmente, este simple escenario de la acción de los coactivadores ha cambiado notoriamente (Lonard y O'Malley 2006). Se prevé que los coactivadores tienen otras actividades sumadas a la de control del inicio de la transcripción, tales como transporte del ARNm desde el núcleo, traducción del ARNm y modificaciones post-traduccionales de la proteína sintetizada, lo cual refleja el hecho que ellos no actúan solos sino como parte de un complejo multiproteico (Lonard y O'Malley 2006). Esta entidad de múltiples subunidades, conteniendo actividades enzimáticas individuales, representa una máquina compleja que es capaz de concentrar y unir diversas enzimas y procesos, que ellos regulan, juntos en un lugar. En este sentido, el complejo coactivador ejecuta el programa final que es "un gen particular expresado como una proteína funcional madura" (Lonard y O'Malley 2006).

EL primer coactivador fue clonado en 1995 por Oñate y col., al que denominaron *coactivador de receptores esteroideos* (SRC, del inglés: *Steroid Receptor Coactivator -1*). Ellos observaron que su interacción con el RP o el RE era promovida por agonistas e inhibida por antagonistas. La capacidad de los diferentes ligando del RE (y, en general, de los receptores nucleares) para actuar como agonista o antagonista, depende en gran medida de su habilidad para inducir cambios conformacionales en el dominio de unión a ligando y modular adecuadamente el reclutamiento de coreguladores. La presencia de agonistas, determinan que la α -hélice 12 (anfipática), que forma parte del dominio de unión a ligando y del AF-2 de los receptores, se pliegue de manera tal que origina una superficie hidrofóbica, que favorece el acoplamiento de diversos coactivadores transcripcionales (Kressler y col. 2007). La posición de la hélice 12 es diferente cuando el receptor se encuentra unido a un antagonista o cuando no hay interacción con ningún ligando, adquiriendo el receptor, una conformación que impide la interacción con los coactivadores y en su lugar se sugiere que esta diferente conformación favorecería el reclutamiento de corepresores. Por lo tanto se

propone que la hélice 12 es un importante regulador en el reclutamiento de coactivadores (Hall y McDonnell 2005).

Las regiones dentro de los coactivadores, interactuando con los receptores nucleares han sido caracterizadas. Heery y col. (1997) identificaron un motivo dentro de los miembros de la familia de SRC llamado *box NR* (del inglés: Nuclear Receptor) representado por el siguiente motivo: LLxxL (donde L es leucina y x es cualquier aminoácido), el cual es suficiente y necesario para la unión del coactivador al receptor activado. Además de los miembros de la familia SRC que aumentan la actividad de los receptores por interacción con el dominio de unión a ligando, se han descubierto coactivadores que interactúan con el dominio AF-1 de los receptores o con factores que aumentan indirectamente la actividad de los receptores a través de su habilidad para interactuar con los coactivadores de la familia de SRC (Tabla 2) (Hall y McDonnell, 2005).

Tabla 2: Coactivadores de la actividad del RE

Cofactor (variants)	Nombre	Sitio de interacción con el RE	Función
SRC-1 (NCoA-1)	Coactivador de receptor esteroide -1	AF-2, a través de motivos LXXLL	Acetil-transferasa de histonas
SRC-2 (GRIP1, TIF-2, NCoA-2)	Coactivador de receptor esteroide -2	AF-2, a través de motivos LXXLL	Acetil-transferasa de histonas
SRC-3 (AIB1, ACTR, p/CIP, RAC3, TRAM-1, NCoA-3)	Coactivador de receptor esteroide -3	AF-2, a través de motivos LXXLL	Acetil-transferasa de histonas
CBP/p300	Proteína de unión al CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico)	AF-2, a través de motivos LXXLL	Acetil-transferasa de histonas
TRAP220, TRAP/DRIP (PBP)	Proteína (de 220kDa) activadora del receptor de hormona tiroides	AF-2, a través de motivos LXXLL	
SRA	Activador de receptores esteroideos	AF-1	<i>Splicing</i>
p68	Helicasa de ARN p68	AF-1	Helicasa de ARN
CARM 1	Proteína metiltransferasa	AF-2, indirectamente a través de la asociación con SRC	Metiltransferasa de histonas (arginina)

Tomado de Hall y McDonnell, 2005

Como puede deducirse de la tabla anterior, los principales mecanismos de acción de los coactivadores son:

a) modificadores covalentes de histonas: varios coactivadores poseen actividad acetil o metiltransferasa. La acetilación o metilación de las histonas modifican las interacciones entre los nucleosomas y el ADN, permitiendo que la maquinaria de transcripción acceda en forma eficiente a la región promotora de los genes, facilitando su transcripción.

b) complejos de remodelación de la cromatina dependiente de ATP: tales como Swi/Snf, que alteran la estructura de mayor orden y la posición de los nucleosomas.

c) componentes del complejo mediador: TRAP/DRIP que interactúan con la maquinaria de transcripción general para ayudar en el ensamblaje de la maquinaria de preiniciación.

Un modelo general de interacción de coreguladores con el ER α es presentado en la siguiente figura:

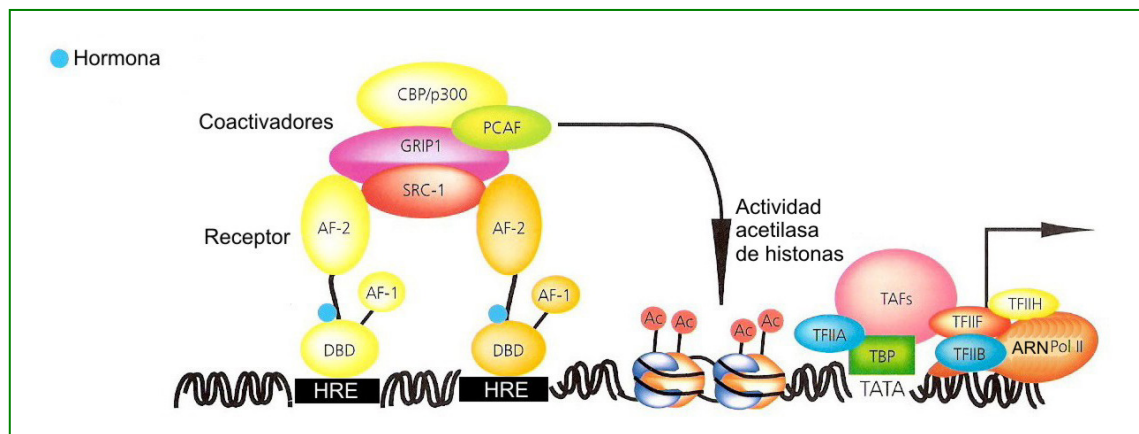


Figura 13: Reclutamiento de coactivadores por el receptor nuclear. Cuando está presente la hormona el receptor recluta coactivadores. El complejo receptor-coactivador activa acetiltransferasas de histonas. Las histonas acetiladas se disocian de la cromatina y permiten que el complejo de la maquinaria de transcripción basal se una al ADN y active la transcripción de genes. Modificado de *Gene Regulation and chromatin modification*. www.sigma-aldrich.com/cellsignaling

4.2.1- Corepresores

Aunque existen menos corepresores de receptores nucleares, estas moléculas cumplen un rol importante en la expresión de genes dependiente

de receptores regulados negativamente. El receptor de ácido retinoico (RAR) y el de hormonas tiroideas (RT) reprimen la transcripción basal en ausencia de sus ligandos, y esta función es mediada por al menos dos proteínas nucleares: el corepresor de receptores nucleares (NCoR) y el mediador del silenciamiento para los receptores de hormonas retinoicas y tiroideas (SMRT) (Tabla 3) (Smith y O'Malley, 2004). Los corepresores se unen a los receptores a través de cajas CoRNR, los cuáles consisten en motivos LxxxI/HIxxxI/L (Perissi y col. 1999). En general, los receptores de esteroides tales como RE, RP, receptor de andrógeno y receptor de glucocorticoides interactúan con los corepresores en presencia de sus antagonistas respectivos. Por ejemplo, 4 hidroxitamoxifeno y raloxifeno han sido usados para reclutar NCoR y SMRT sobre ciertos promotores de genes blanco del RE (Smith y O'Malley, 2004). La existencia de corepresores que moderen la actividad agonista provee un mecanismo adicional en el ajuste de la expresión de genes blancos, atenuando el producto fisiológico en situaciones donde hay niveles crónicamente elevados de hormona (Hall y McDonnelly, 2005)

Tabla 3: Corepresores del RE

Cofactor	Nombre	Sitio de interacción con el RE	Función
NCoR	Corepresor de receptores nucleares	AF-2, a través de motivos CoRNR	Desacetilasa de histonas
SMRT	Mediador del silenciamiento para los receptores de ácido retinoico y tiroides	AF-2, a través de motivos CoRNR	Desacetilasa de histonas
RIP140	Proteína (de 140 kDa) de interacción con receptores	AF-2, a través de motivos LXXLL	Compite con coactivadores, asociado con desacetilasas de histonas
REA	Represor de la actividad del RE	Indirecta	Interfiere con el acceso de SRC-1 al RE
RTA	Represor de la actividad transcripcional del tamoxifeno	AF-1	Interfiere con el acceso de SRC-1 al RE, se une al ARN
MTA1s	Proteína asociada a metástasis 1 (forma corta)	AF-1, dominio de unión a ADN, AF-2	Secuestro del RE en el citoplasma
BRCA1	Proteína supresora de tumores asociada al cáncer de mama -1	AF-2	Interacción con proteína de interacción con CtBP (proteína de unión c-terminal). Presente en el complejo de la ARN polimerasa II
SAFB1	Factor de unión a la matriz B1	Dominio de unión a ADN	Se une al dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa II
SHP	Receptor nuclear huérfano	AF-2	Interferencia con la unión al ADN, competencia con coactivadores
TR2	Receptor nuclear huérfano	Dominio de unión a ADN, AF-2	Inhibe la dimerización del RE

Tomado de *Dobrzycka y col. 2003, y Hall y McDonnell 2005*

En su mayoría, los corepresores descritos actúan sobre casi todos los receptores nucleares, sin embargo recientemente se ha descrito un corepresor específico del RE, denominado represor de la actividad de RE (REA) el cual actúa interfiriendo con el acceso del coactivador SRC-1 al receptor (Martini y col. 2000).

Los corepresores regulan la actividad del receptor a través de una variedad de mecanismos que incluyen (Figura 14):

- a) remodelación de la cromatina: reclutando diferentes complejos de proteínas con actividad desacetilasa de histonas (HDAC)
- b) interacción con la maquinaria de transcripción basal
- c) competición con los coactivadores por la unión a los receptores
- d) interferencia con la dimerización del receptor y con la unión al ADN
- e) secuestro del receptor en el citoplasma
- f) modificación del procesamiento del ARN.

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

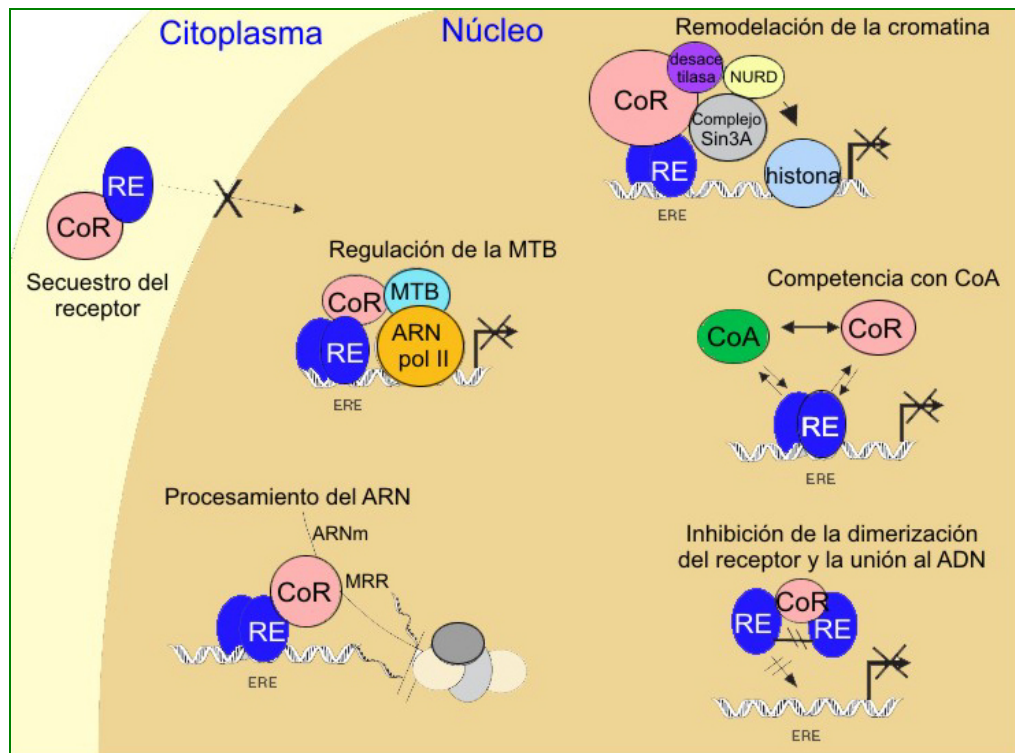


Figura 14: Mecanismo de acción de corepresores de RE. Un corepresor pueden utilizar más de un mecanismo y otros nuevos mecanismos pueden ser descubiertos. **CoR:** corepresor, **CoA:** coactivador, **MRR:** motivo de reconocimiento del ARN, **MTB:** maquinaria de transcripción basal, **ARN pol II:** ARN polimerasa II, **NURD:** desacetilación de histonas y remodelación de nucleosomas.

Está claro que la actividad transcripcional de los RE y RP es regulada por una variedad de proteínas celulares. Inclusive, muchos coreguladores parecen ser expresados en una manera dependiente de tejido y ser

regulados por hormonas (Molenda y col. 2003). Esta compleja red de coactivadores y corepresores provee un control sensible y equilibrado de la expresión de genes blanco.

5- Efectos de perturbadores endocrinos sobre la angiogénesis del útero

La diferenciación perinatal del tracto genital de los mamíferos ocurre siguiendo una compleja serie de interacciones entre los receptores hormonales clásicos y las moléculas de señalización que en última instancia programan a las células blanco para responder apropiadamente al medio hormonal más tarde en la vida. El organismo en desarrollo es sensible a las perturbaciones por químicos con actividad endócrina, los cuales pueden resultar en una respuesta hormonal anormal afectándose varios procesos fisiológicos.

En los últimos años se ha alcanzado un consentimiento global en relación a los efectos adversos que resultan de la exposición a químicos que poseen actividad hormonal y pueden interferir con el sistema endocrino. Se ha sugerido como hipótesis que determinados efectos adversos sobre la salud humana y de poblaciones animales, como el incremento de algunas neoplasias, malformaciones y disfunciones reproductivas, algunas formas de neurotoxicidad o el fracaso de la respuesta inmune, podrían deberse a la exposición a este tipo de sustancias llamadas ***perturbadores endocrinos*** (PE). Los PE son sustancias químicas, exógenas al organismo animal o humano que tienen actividad hormonal o antihormonal y que, actuando como agonistas o antagonistas, pueden alterar la homeostasis del sistema endocrino (Colborn y col. 1992, Olea y col. 2002). Estos compuestos no poseen una estructura química similar a las hormonas esteroideas naturales, pero sin embargo han demostrado tener una potente actividad estrogénica (***xenoestrógenos***) y antiandrogénica en ensayos *in vitro* (National Research Council 1999).

La capacidad de estos compuestos de interactuar con los receptores para hormonas esteroideas *in vivo*, ha alertado sobre la posibilidad de que estas sustancias interfieran negativamente en la homeostasis endocrina del

organismo (National Research Council 1999). Los xenoestrógenos se unen débilmente a los RE alterando su capacidad de activar la transcripción de genes dependientes de Eg (Sonnenschein y Soto 1998, Burow y col. 1999). Básicamente, estos químicos pueden ejercer sus efectos a través de diferentes mecanismos (<http://e.hormone.tulane.edu/learning>):

- Pueden imitar la actividad biológica de la hormona uniéndose a los receptores celulares, conduciendo a una respuesta innecesaria, en un tiempo quizás erróneo o en una medida excesiva
- Pueden unirse a los receptores pero no activarlo, lo cual evitaría la unión de la hormona natural
- Se pueden unir a proteínas transportadoras en la sangre, alterando la cantidad de hormona natural presente en la circulación
- Pueden interferir con los procesos metabólicos en el cuerpo, afectando la síntesis o la degradación de la hormona natural

5.1- Dietilstilbestrol

El dietilstilbestrol (DES) es un potente Eg sintético y representativo de esta clase de químicos con actividad estrogénica. El DES fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas durante los años 1950 y 1960 administrándose para evitar abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. Los *Centros para el control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos* calculan que, durante este tiempo, hasta 10 millones de mujeres estadounidenses tomaron DES durante el embarazo. En 1971, se pidió a los médicos que dejaran de recetar DES porque se relacionaba con una forma inusual de cáncer vaginal y de cuello uterino, el adenocarcinoma de células claras, en las hijas de las mujeres que habían tomado DES durante el embarazo (<http://www.cdc.gov/des>, Herbst y col. 1971). Además del aumento en el riesgo de adenocarcinoma de células claras, también aumenta su riesgo de defectos del tracto reproductor, como útero en forma de T, infertilidad y complicaciones del embarazo, como embarazo ectópico y parto prematuro. También se ha sugerido que las mujeres expuestas prenatalmente a DES tienen mayor riesgo de cáncer de mama, que sus madres, después de los 40 años (Palmer y col. 2006). Aunque en la

actualidad el DES no se prescribe durante el embarazo, es usado experimentalmente como control positivo de la acción xenoestrogénica para investigar el efecto de Eg ambientales, especialmente cuando la exposición se realiza durante etapas críticas del desarrollo.

En crías hembras de ratones tratadas con DES durante los primeros 5 días de vida, más del 90% desarrolló adenocarcinoma uterino a los 18 meses de edad. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la exposición neonatal a DES causa anormalidades permanentes en el tracto reproductivo involucra vías tanto epigenéticas como dependientes de Eg. La exposición a DES alteró la expresión de genes relacionados con el crecimiento y diferenciación del tracto reproductivo, tales como genes homeóticos (*Hox*), morfogenes (*Wnt*) (Ma y col. 1998, Sassoon 1999) y genes involucrados en el control del ciclo celular (ciclina D1) (Newbold y col. 2007). Estas alteraciones persistieron en animales adultos, mucho tiempo después de finalizada la exposición a DES (Block y col. 2000).

Otros estudios en animales han sugerido que el DES influencia adversamente el proceso de angiogénesis en el útero como así también en el ovario, perturbando el desarrollo folicular y la vascularización durante la implantación y formación de la placenta (Dubey y col. 2000). La administración exógena de DES estimuló la expresión de la proteína de VEGF en el ovario de la rata en una manera tiempo-dependiente, siendo significativamente aumentada a las 24 y 48 horas después del tratamiento (Danforth y col. 2003). Estudios *in vitro* han demostrado que el DES indujo significativamente la transcripción del VEGF tanto en células GI-101A y HL-60 (Ramakrishnan y col. 2000). Esta gran susceptibilidad a la exposición a Eg alerta sobre los posibles efectos de sustancias con actividad hormonal en determinados períodos del desarrollo fetal y postnatal.

5.2- Bisfenol-A

Bisfenol-A (BPA, di-(p-hidroxifenil) dimetilmetano) es otro perturbador endocrino que está recibiendo marcada atención debido a su alto potencial para causar efectos adversos sobre la salud humana. Es un compuesto sintetizado por primera vez en 1891 cuya actividad estrogénica

fue descrita 45 años más tarde en ratas ovariectomizadas, por Dodds y Lawson (1936). Sin embargo, su uso no fue muy difundido hasta descubrirse su capacidad de polimerización para generar policarbonatos plásticos. Lamentablemente, el enlace éster que une a los monómeros de BPA entre sí para formar el polímero no es estable y en consecuencia, el polímero se debilita con el tiempo, liberando BPA al material con el que se encuentra en contacto. El calentamiento y el contacto con compuestos ácidos o alcalinos, acelera la hidrólisis del enlace éster. En la actualidad el BPA se encuentra ampliamente utilizado en la producción de productos de policarbonato, resinas epoxi y otros plásticos que incluyen polisulfonas, alquilfenoles, poliéster-estirenos y ciertas resinas de estireno. Además de la industria del plástico, el BPA se ha utilizado en la formulación de pesticidas (fungicidas), antioxidantes, gomas y estabilizantes (cloruros de polivinilos) (Takahashi y Oishi 2000, vom Saal y Hughes 2005). Su amplio uso crea una fuente de exposición incalculable debido a que se encuentra presente en selladores dentales, recubriendo el interior de latas de conserva, recipientes plásticos para alimentos y bebidas, mamaderas, utensilios para usos en horno microondas. Otras exposiciones resultan del uso de BPA en láminas *films*, tuberías reforzadas, filtros de agua, esmaltes y barnices, adhesivos, dentaduras artificiales, discos compactos, aislantes eléctricos, repuestos de automóviles, electrodomésticos (Takahashi y Oishi 2000).

Una evidencia consistente de la exposición a BPA se mostró en un estudio realizado por Calafat y col. (2005), en el cual el 95% de las muestras de orina de 394 personas de Estados Unidos analizadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, EE.UU.), poseían niveles detectables de BPA (entre 0,4 y 8 ppb). Estos valores concuerdan con los observados en otros países. Si se tiene en cuenta que la tasa de metabolización de BPA es rápida (Völkel y col. 2002), estos datos sugieren que la exposición humana a cantidades significativas de BPA debe ser continua y proveniente de múltiples vías. Se estima que la dosis ingerida de BPA vía oral en humanos es de: a) 6,3 $\mu\text{g}/\text{día}$ a través del consumo de alimentos provenientes de latas de conserva (Howe y Borodinsky, 1998), b) aproximadamente 0,75 $\mu\text{g}/\text{día}$ por ingerir bebidas contenidas en envases plásticos (Brotons y col. 1995), y c) 90-931 $\mu\text{g}/\text{día}$ sería la exposición

estimada dentro de la primer hora de colocado un sellador dental (Olea y col. 1996).

En roedores preñados expuestos a BPA se observó que la absorción y distribución del xenoestrógeno en órganos de la madre es muy rápida y, además, la presencia de BPA en los fetos demuestra que la placenta no actúa como una barrera para éste compuesto (Takahashi y Oishi 2000). También se ha encontrado BPA en fluido folicular y amniótico, y en suero fetal durante la preñez (Zalko y col. 2003). El BPA indujo alteraciones en los ciclos estrales, niveles plasmáticos de hormona luteinizante, e incremento del peso corporal en ratas expuestas perinatalmente a este compuesto (Rubin y col. 2001). En ratones se observó adelantamiento de la pubertad (Howdeshell y col. 1999, Honma y col. 2002). Se ha demostrado que el BPA rápidamente estimularía la expresión del ARNm de las variantes de empalme del VEGF en tejidos de rata de respuesta clásica de Eg, siendo la respuesta primaria del útero, la vagina y la hipófisis a BPA una rápida inducción de la expresión del VEGF (Long y col. 2001).

Otros estudios *in vivo* han establecido que el BPA puede inducir alteraciones en las funciones reproductivas (vom Saal y Hughes 2005, vom Saal y Welshons 2006, Maffini y col. 2006). En nuestro laboratorio, usando diferentes modelos animales, hemos evaluado los efectos reproductivos de la exposición perinatal a BPA mostrando desarrollo anormal de la glándula prostática, mama y útero en roedores (Ramos y col. 2001, Ramos y col. 2003, Muñoz-de-Toro y col. 2005, Durando y col. 2007, Varayoud y col. *enviado*) y efectos de reversión sexual en el cocodrilo silvestre *Caiman latirostris* (Stoker y col. 2003). Otros estudios, utilizando modelos de exposición prenatal a BPA, demostraron que roedores hembras presentaban (durante el estro) cambios morfológicos y en la expresión de receptores hormonales (RE α y RE β) en los compartimientos epitelial y/o estromal del útero (Schonfelder y col. 2004, Markey y col. 2005). Recientemente, hemos demostrado que ratas expuestas a BPA durante los primeros días de vida tienen alterada la expresión de RE α y RP en el útero y presentan una significativa disminución en la expresión de genes *Hox* (*Hoxa10* y *Hoxa11*). En la etapa adulta, estos mismos animales mostraron alteraciones en la

respuesta uterina frente a un tratamiento hormonal exógeno con esteroides ováricos (Varayoud y col. *enviado*).

Teniendo en cuenta los antecedentes descriptos en esta introducción al trabajo de tesis, deducimos que el compartimiento vascular y uno de sus principales moduladores, el VEGF, poseen una significativa participación en la fisiología del tracto reproductivo. Por lo tanto, creemos que conocer diversos aspectos de la generación de vasos nuevos en el cérvix uterino durante la gestación ayudaría a mejorar el conocimiento de las adaptaciones maternas durante la preñez y al desarrollo de terapias que permitan un parto normal y una descendencia saludable.

Además, debido a que el avance científico y biotecnológico a llevado a la utilización (y por lo tanto exposición) cada vez mayor de sustancias con actividad de perturbador endocrino con preocupantes consecuencias sobre la capacidad reproductiva, creemos que también es de real importancia el estudio de la exposición neonatal a xenoestrógenos durante periodos críticos de la organogénesis y diferenciación uterina que pueden modificar el microambiente tisular alterando la respuesta a hormonas del compartimiento vascular y más específicamente, la expresión del VEGF, en momentos claves, como ser en el periodo preimplantatorio en el útero. Los resultados a obtener aportarían evidencias necesarias para el desarrollo e implementación de políticas de prevención que eviten los efectos adversos sobre la salud.

II - OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar en el cérvix y útero de la rata durante la gestación el proceso de angiogénesis y los posibles mecanismos involucrados en su regulación. Investigar la repercusión de la exposición neonatal a sustancias xenoestrogénicas sobre el desarrollo del compartimiento vascular uterino y su potencial influencia en la eficiencia reproductiva.

Objetivos Particulares:

1. En el cérvix uterino de ratas preñadas intactas evaluar cualitativa y cuantitativamente parámetros que caracterizan la angiogénesis (proliferación endotelial, densidad y maduración vascular y expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular).

2. Evaluar la participación de células inmunes en el proceso de angiogénesis:
 - a) determinando la densidad de mastocitos y macrófagos en el cérvix uterino durante el ciclo estral, gestación y postparto.
 - b) investigando la función de los mastocitos en el proceso de angiogénesis cervical durante la gestación.

3. Evaluar si la exposición neonatal a estrógenos ambientales, tales como bisfenol A y dietilstilbestrol:
 - a) modifican los parámetros relacionados con la angiogénesis uterina en la vida adulta.
 - b) afectan algunos parámetros relacionados con la eficiencia reproductiva: número de cuerpos lúteos, sitios de implantación, pérdidas pre- y post-implantatorias.

III - MATERIALES Y METODOS

1- Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar pertenecientes al bioterio del Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los animales se mantuvieron bajo condiciones reguladas de temperatura (22 ± 2 °C) y con fotoperíodo de 14 hs de luz (6:00 - 20:00 hs) y 10 hs de oscuridad. Se les permitió libre acceso al agua y al alimento balanceado en forma de pellets (Alimentos Cooperación, Rafaela, Santa Fe). Todos los animales utilizados fueron manipulados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias (USA).

2- Obtención de las muestras

2.1- Momentos seleccionados

a) *Durante el ciclo estral*

La identificación de las distintas fases del ciclo estral se realizó mediante la obtención diaria de extendidos vaginales (Montes y Luque, 1988); seleccionando para el trabajo experimental los animales que presentaron 3 o más ciclos estrales consecutivos regulares de 4 o 5 días. Los momentos del ciclo estral estudiados fueron las fases del *estro* y *diestro II*, considerados como dos situaciones fisiológicas sometidas a diferente estímulo hormonal (Smith y col. 1975).

b) *Durante la preñez*

Para la obtención de animales preñados se alojó a la hembra en la jaula del macho y se observó su comportamiento. Si la hembra presentaba conducta receptiva, evidenciada por el reflejo de lordosis, se la dejaba toda la noche con el macho. A la mañana siguiente se procedía a hacer extendidos vaginales y la presencia de espermatozoides confirmaba la preñez del animal. Este día se consideró como el día 1 (D1) de la gestación. En nuestra colonia la gestación tiene una duración de 23 días y el horario aproximado de parto es entre las 12 y 14 hs. Los animales se sacrificaron a las 10 hs en diferentes días de la preñez a partir de D5 hasta el día del parto (D23) inclusive.

c) *Durante el postparto*

Con el objetivo de obtener muestras durante el postparto (PP), a un grupo de animales preñados se los dejó completar la gestación y realizar el parto. Las madres fueron mantenidas con sus crías hasta el sacrificio que se realizó 24 o 48 hs posteriores al momento del parto (entre las 12-14 hs del D24 y D25, respectivamente). Se utilizaron ratas que tuvieron 8 o más crías nacidas vivas y que no presentaron partos distócicos.

2.2- Cirugías

2.2.1- Disecciones de cuernos y cérvix uterinos

Los animales se sacrificaron por decapitación para evitar situaciones de estrés y se recogió la sangre para la posterior obtención de suero. Luego, se colocaron en la tabla de disección sujetándolos de sus extremidades, con el abdomen hacia arriba. Se procedió a levantar la piel con pinza de punta "diente de ratón" a unos 1,5 cm del orificio vaginal y con la tijera de punta roma se practicó una incisión en ángulo de 45 grados hacia los laterales hasta la altura de las últimas costillas, quedando expuestos los músculos abdominales en los que se practicó la misma maniobra quirúrgica. De esta manera quedó expuesta la cavidad abdominal. Con pinza anatómica de punta roma se separaron las asas intestinales y la grasa mesentérica hacia un lado, visualizando el tracto genital (en el caso de animales preñados también se observaron los fetos dentro del útero). Con tijera de punta fina se procede a disecar los órganos que se desean estudiar (Figura 15)

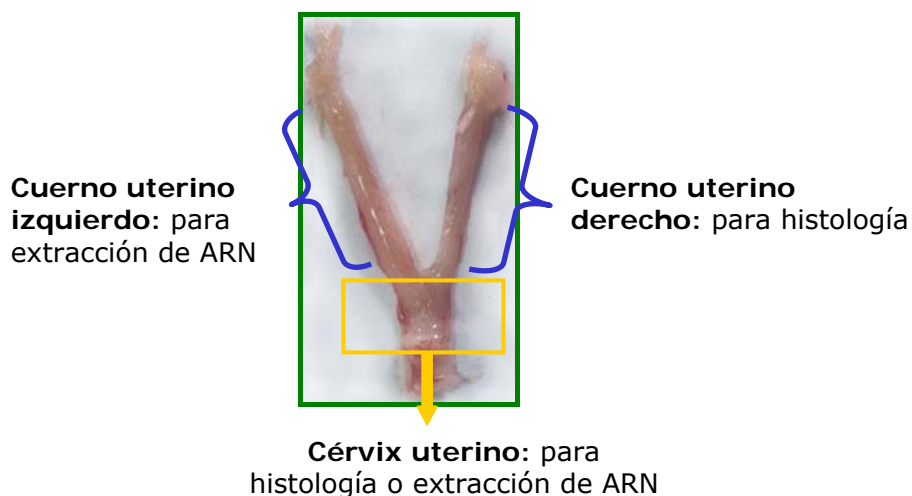


Figura 15: Fotografía representativa de las muestras disecadas: cérvix y cuernos uterino.

a) cérvix uterino: la muestra de cérvix se disecó en su totalidad, desde la vagina hasta el comienzo de la bifurcación de los cuernos uterinos (Figura 15)

b) cuernos uterinos: se disecaron ambos cuernos uterinos desde su bifurcación hasta la cercanía con los ovarios. Uno de los cuernos uterinos se lo destinó para su procesamiento histológico mientras que el otro rápidamente se congeló en nitrógeno líquido para posterior extracción de ARN (Figura 15).

2.2.2- Ovariectomías bilaterales

Antes de comenzar la cirugía se sumerge el instrumental en alcohol al 70% y se prepara el hilo de sutura. Se anestesia el animal en cámara de éter y se lo coloca en la tabla de cirugía con el abdomen hacia abajo, sujetándolo por sus extremidades. Durante el tiempo que dura la cirugía, la anestesia es mantenida por un algodón embebido en éter, colocado sobre el hocico del animal. Se desinfecta con alcohol al 70% el campo de cirugía y se procede a practicar una incisión de 1,5 cm en la línea media de la piel dorsal. Se divulsiona el tejido subcutáneo para separar la piel del tejido muscular subyacente. Para ingresar a la cavidad abdominal se debe atravesar la pared muscular y el peritoneo, para ello se realizan dos incisiones, una a la izquierda y otra a la derecha, a 0,5 cm de la columna vertebral y a 0,5 cm de la última costilla. Se buscan con pinza anatómica de punta roma cada uno de los ovarios y una vez localizado se lo expone tomándolo por la grasa circundante, para evitar cualquier tipo de presión. Se liga a nivel de la unión útero-tubárica y se secciona por arriba de la ligadura, extrayéndose así la bursa ovárica (con ovario y oviducto incluidos). Se introduce el resto del material expuesto en la cavidad abdominal y se procede a suturar el peritoneo junto con el tejido muscular, con sutura continua. Por último, se sutura la piel con puntos discontinuos. La hembra operada se deja en jaula individual hasta su recuperación de la anestesia y recuperación parcial de la herida.

3- Procesamiento de las muestras

De acuerdo a las técnicas aplicadas sobre el material obtenido las muestras se procesaron de maneras diferentes:

a) Para determinación de niveles séricos de hormonas esteroides las muestras de sangre obtenidas al momento del sacrificio fueron recolectadas en tubos de vidrio, los cuales luego de retraído el coágulo, fueron centrifugados, separándose el suero que se conserva a -80°C hasta su uso.

b) Para estudios por microscopía óptica, los cérvix y cuernos uterinos se fijaron por inmersión en una solución de formol al 4% tamponada a pH: 7,5 con una solución reguladora de fosfato 0,05 M (PBS, del inglés: *Phosphate Buffer Solution*) durante 6 hs a 4°C , respetando la proporción recomendada de fijador/muestra (20:1) para permitir una adecuada conservación morfológica del tejido. Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH: 7,5) de 10 min cada uno y se mantuvieron los tejidos en una solución de alcohol 70° a 4°C . El procedimiento hasta su inclusión en tacos de parafina que se aplicó fue el descrito por Junqueira (1983), en el que las muestras son deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, clarificadas en sucesivos pasajes por xilol e incluidas en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos seriados de $5\ \mu\text{m}$ de espesor que se montaron en portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs.

c) Para la extracción del ARN total, las muestras de cérvix y úteros fueron disecadas en condiciones de esterilidad, congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su posterior procesamiento.

4- CAPITULO I. Angiogénesis en el cérvix uterino de la rata durante la gestación

4.1- Evaluación de parámetros angiogénicos

Con el objetivo de determinar eventos que caracterizan el proceso de angiogénesis en el cérvix uterino durante la gestación se sacrificaron animales desde el día 12 (D12) hasta el D23 de preñez. Las ratas preñadas fueron obtenidas como se describió previamente en la sección 2.1. Al

momento del sacrificio se obtuvo sangre para la separación de suero y se disecaron las muestras de cérvix uterino siguiendo la descripción realizada en la sección 2.2.1. El cérvix uterino fue procesado para su análisis por microscopía óptica o se congeló en nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN (Sección 3).

Sobre las muestras de cérvix uterino procesadas para microscopía óptica se determinaron los siguientes parámetros angiogénicos:

- área ocupada por vasos
- proliferación de células endoteliales
- maduración vascular

A partir de las muestras congeladas de cérvix uterino se evaluó:

- expresión de ARNm del VEGF

La determinación de los parámetros angiogénicos mencionados se realizó por inmunohistoquímica (IHQ) acoplada a análisis digital de imágenes. Para la inmunomarcación se siguió un protocolo previamente publicado que utiliza el calentamiento de la muestra en horno microondas como método de recuperación antigénica y extravidina-biotina peroxidasa como sistema de revelado (Muñoz-de-Toro y col. 1998). El protocolo básico empleado se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo básico de inmunohistoquímica

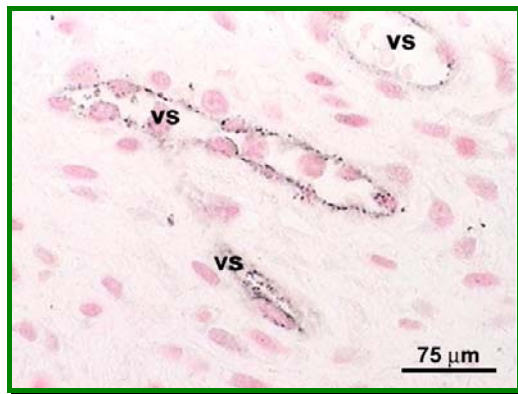
<i>Desparafinar e hidratar:</i>	
Xilol	3 pasajes de 3 min c/u
Alcohol 100°	3 min
PBS	5 min
<i>Recuperación Antigénica</i>	
Calentamiento en Horno microondas. Buffer Citrato 0.01 M, pH: 6	Calentar el buffer 3 min a 100% de potencia, agregar las muestras y calentar 1 min a 100%, 14 min a 40% y 20 min apagado.
PBS	5 min
<i>Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena</i>	
Agua oxigenada 3% en metanol	15 min
PBS	15 min
<i>Bloqueo de uniones no específicas</i>	
Suero normal de cabra 1:20 disuelto en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada	30 min (en cámara húmeda)
<i>Anticuerpo Primario</i>	
Incubación con el anticuerpo específico	14 - 16 hs (en cámara húmeda) a 4°C
PBS	15 min
<i>Sistema de Revelado</i>	
Anticuerpo secundario biotinilado	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Extravidina-peroxidasa	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Sustrato enzimático (5 µl de H ₂ O ₂ 30 vol) + cromógeno (2,3mg de diaminobencidina: DAB) disueltos en 3,3 ml de 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5)	10 min
Agua destilada	5 min
<i>Contracoloración (opcional). Deshidratar y montar</i>	

En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario con un suero no inmune o preabsorbiendo el anticuerpo con el péptido específico contra el cual fue generado.

Oportunamente se describirán los reactivos específicos empleados en cada determinación.

4.1.1- Área ocupada por vasos

El área del cérvix uterino que se encuentra ocupada por vasos sanguíneos representa un importante parámetro que nos permitió determinar la existencia de un proceso de angiogénesis. La evaluación se realizó mediante la detección por IHQ de un antígeno específico de las células endoteliales: *el factor de von Willebrand (FvW)*. Para ello se siguió el protocolo descrito en la tabla 4. La figura 16 detalla los reactivos utilizados en esta IHQ.



Anticuerpo primario	Anti-FvW*
Dilución utilizada	1:100
Anticuerpo secundario biotinilado	Anticonejo 1:200
Extravidina peroxidasa	1:150
Cromógeno empleado	DAB+ NiCl ₂

*proveedor: Dako, Glostrup, Denmark.

Figura 16: Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección del antígeno de células endoteliales (FvW). vs: vasos sanguíneos. Contracoloración con Nuclear Fast Red. En la tabla localizada a la derecha de la figura se mencionan los reactivos utilizados.

Quantificación: Se cuantificó el área vascular absoluta y relativa utilizando los cortes histológicos sometidos a ensayos de IHQ para la detección del FvW combinado con una técnica de análisis de imágenes.

Para la obtención de las imágenes se utilizó una cámara de video color Spot Insight V3.5 acoplada a un microscopio Olympus BH2 (iluminación: lámpara halógena de 12 voltios, 100 W, equipado con una fuente de luz estable; Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japón) con objetivas Dplan de distintos aumentos. El microscopio fue apropiadamente acondicionado para la iluminación Koehler. Correcciones de iluminación desigual (corrección de sombras) y la calibración espacial del sistema fue

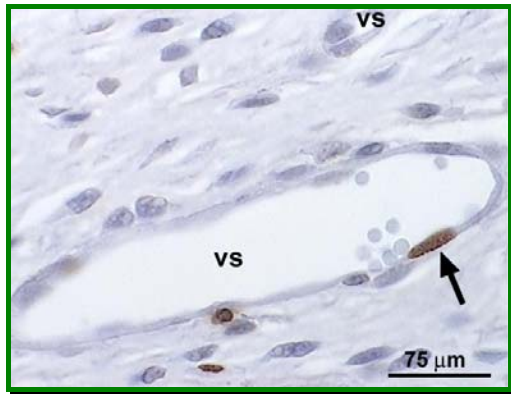
realizada con imágenes de las celdillas de una cámara de Neubauer utilizando el software Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Se obtuvieron imágenes del estroma cervical (15 imágenes por sección y 2 secciones de tejido por animal) usando una objetiva de 40X. Luego, usando el lenguaje de programación Auto-Pro, se crearon rutinas automatizadas para medir las áreas vasculares. En este proceso de análisis automatizado, las imágenes de los cortes histológicos inmunoteñidos fueron convertidos a escala de grises. Por segmentación de color se identificó el perímetro de cada vaso y luego se calculó su correspondiente sección transversal. La suma de todas las secciones transversales se consideró como el *área vascular absoluta*. El *área vascular relativa* se determinó dividiendo el área vascular absoluta por el área total ocupada por el estroma cervical (Varayoud y col. 2001, Ramos y col. 2002).

4.1.2- Proliferación de células endoteliales

La incorporación de nucleótidos modificados al ADN durante la división celular es una metodología muy utilizada para la determinación de células proliferando (Woosley 1991). La Bromodeoxiuridina (BrdU) cumple con este requisito, es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo de división celular. Con el objetivo de determinar el grado de proliferación de las células endoteliales, todos los animales estudiados recibieron 2 horas antes del sacrificio una inyección intraperitoneal (i.p.) de BrdU (Sigma). La dosis empleada fue de 6 mg/100 g de peso corporal y se disolvió en PBS (pH: 7,5).

Sobre cortes histológicos se aplicó la técnica de IHQ optimizada en nuestro laboratorio (Kass y col. 2000). Este protocolo incorpora al procedimiento descrito en la tabla 4 un paso fundamental de hidrólisis ácida (utilizando HCl 2 N durante 30 min a 37°C) en el que se desnaturalizan las hebras de doble cadena del ADN del tejido, previo al bloqueo de uniones inespecíficas. Posteriormente, los cortes de tejido deben ser neutralizados por incubación durante 10 min en una solución 0.1 M de bórax (pH: 8). La figura 17 muestra una imagen representativa de esta IHQ junto con las condiciones de los reactivos utilizados. Para esta determinación, además de los controles habituales de la técnica, se debe

realizar un control negativo adicional que consiste en efectuar la reacción en un corte histológico de un animal que no haya sido inyectado con BrdU antes del sacrificio.



Anticuerpo primario Clon	Anti-BrdU* 85-2C8
Dilución utilizada	1:100
Anticuerpo secundario biotinilado	Antiratón 1:80
Extravidina peroxidasa	1:100
Cromógeno empleado	DAB

*proveedor: Novocastra Laboratories

Figura 17: Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de la BrdU incorporada a las células. La flecha indica una célula endotelial proliferando, vs: vasos sanguíneos. Contracoloración con hematoxilina. En la tabla localizada a la derecha de la figura se mencionan los reactivos utilizados.

Cuantificación: La cuantificación de la proliferación de las células endoteliales en el cérvix uterino se realizó teniendo en cuenta la regionalización histológica del estroma tisular previamente descrita (sección 1.2 de la introducción de esta tesis, Varayoud y col. 2001):

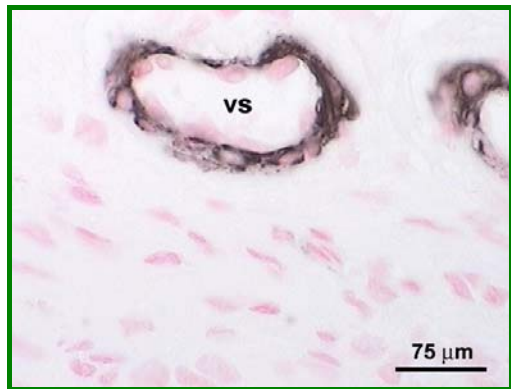
- a) el subepitelio o lámina propia (considerando una región de 110 μm desde la membrana basal hacia la serosa)
- b) el estroma muscular (abarcando tanto la capa longitudinal como la transversal de músculo liso).

La cuantificación se realizó usando un microscopio Olympus BH2 con una objetiva Dplan de 100X. Se evaluaron un total de 100 vasos sanguíneos en cada una de las regiones tisulares y se calculó el porcentaje de proliferación endotelial dividiendo el número de células endoteliales que incorporaron BrdU por el número de células endoteliales totales.

4.1.3- Maduración vascular

El recubrimiento de las células endoteliales con pericitos o células musculares lisas vasculares refleja el grado de maduración vascular. La identificación de estas células se realizó utilizando como marcador la expresión de *alfa actina de músculo liso* (α -SMA). La detección se realizó

por IHQ siguiendo el protocolo descrito en tabla 4 y las condiciones de los reactivos mostrados en la figura 18.



Anticuerpo primario	Anti-α-SMA *
Clon	α sm-1
Dilución utilizada	1:50
Anticuerpo secundario biotinilado	Antiratón 1:130
Extravidina peroxidasa	1:150
Cromógeno empleado	DAB + NiCl ₂

*proveedor: Dako, Glostrup, Denmark

Figura 18: Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección del pericitios y células musculares lisas vasculares. vs: vasos sanguíneos. Contracoloración con Nuclear Fast Red. En la tabla localizada a la derecha de la figura se mencionan los reactivos utilizados.

Cuantificación: Para calcular el índice de maduración vascular se utilizaron cortes histológicos consecutivos inmunoteñidos con FvW y con α -SMA. La cuantificación se realizó usando un sistema de análisis de imágenes similar al descrito previamente para la determinación del área vascular (sección 4.1.1). Se calculó el índice de maduración vascular expresado como el área ocupada por vasos sanguíneos que fueron positivos para α -SMA dividido el área vascular relativa.

4.1.4- *Expresión de ARNm del VEGF*

Como se comentó en la introducción de esta tesis (sección 3) la angiogénesis se encuentra regulada por una amplia variedad de factores. En este apartado se investigó la expresión de ARNm total del VEGF y sus variantes de empalme alternativo. Se utilizaron las muestras de cérvix uterino extraídas en los diferentes días de gestación y que habían sido guardadas a -80 °C. A partir de las mismas se realizó la extracción del ARN total como se describe a continuación.

4.1.4.1- Extracción del ARN total: Se realizó utilizando el reactivo comercial "TRIZol Reagent" (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) que se

fundamenta en el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi 1987). Básicamente, en el contenedor del homogeneizador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA®- Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Germany) se agregaron 1000 µl del reactivo TRIzol por cada 50-100 mg de tejido congelado, y se homogeneizó suavemente. Durante la homogeneización de la muestra el reactivo preserva la integridad del ARN. El agregado de cloroformo y posterior centrifugación, separa la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de donde es recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, lavado con etanol al 80% y re-disuelto en agua libre de ribonucleasas. La cantidad de ARN total fue determinada mediante la lectura en espectrofotómetro Beckman DU Serie 500 (Beckman Instruments, INC., Fullerton, CA, USA) a una longitud de onda de 260 nm. La integridad del ARN fue evaluada en geles de agarosa conteniendo formaldehído.

A partir de los ARN totales se realizaron transcripciones reversas (RT) obteniéndose los correspondientes ADN copia. Seguidamente se describe el protocolo de RT empleado.

4.1.4.2- Transcripción reversa: Cantidades iguales (4 µg) del ARN total se sometieron a retrotranscripción (RT) utilizando la enzima *Moloney Murine Leukemia Virus* transcriptasa reversa (M-MLV, 300U, Promega, Madison, WI, USA) utilizando oligonucleótidos hexaméricos (0,5 µg, Promega) como cebadores. Al tubo de reacción se le adicionaron 20 U de inhibidor de ARNasa (RNAout, Invitrogen) y 10 nmol de una mezcla de dNTP's (deoxinucleótidos trifosfatos) hasta alcanzar un volumen final de 30 µl con la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima. La reacción de RT se realizó a 22°C por 8 min, luego a 30°C por 15 min y 37°C por 60 min. La reacción finalizó calentando a 80°C por 5 min y a 94°C por 30 segundos para posteriormente efectuar un enfriamiento a 4°C. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en un termociclador Bio-Rad iCycler®. Seguidamente se diluyó el ADN copia (ADNc) generado llevándolo a un volumen final de 60 µl con agua libre de ARNasa. Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

Usando el ADNc generado en la reacción de RT se procedió a evaluar cuantitativamente la expresión del ARNm total del VEGF mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva. Las variantes de empalme alternativo se cuantificaron a través de PCR múltiple en un solo tubo. El protocolo de PCR competitiva se describe a continuación.

4.1.4.3- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva: Esta metodología se basa en la co-amplificación (en la misma reacción y con el mismo par de oligonucleótidos) del ADN blanco en estudio (*VEGF*) y de un estándar interno (*competidor*) de concentración conocida.

En este trabajo de tesis se utilizó un competidor de tipo heterólogo el cual posee una secuencia de nucleótidos diferente a la secuencia del ADN blanco excepto en la región de hibridación de los oligonucleótidos cebadores. (http://bio.takara.co.jp/BIO_EN). Para la obtención de fragmentos de ADN que actúen como competidores heterólogos se utilizó una técnica que desarrollamos en nuestro laboratorio y que se describe a continuación:

a) Se realiza una PCR con los oligonucleótidos específicos para VEGF (Tabla 5) pero utilizando como molde ADN que provenga de un genoma que no contenga el gen del VEGF. En nuestro caso utilizamos ADN purificado de fago lambda (ADN λ) y de *Arabidopsis thaliana*. El tubo de reacción contenía 1 μ l de ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (Promega), 1 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, y 20 pmol de cada primer específico (todos de Invitrogen) en un volumen final de 25 μ l en solución reguladora de PCR 1X (Promega). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Bio-Rad iCycler[®]. El protocolo de ciclado es el siguiente:

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización a 96°C	1 min	1
- Desnaturalización a 95 °C	30 seg	30
- Hibridización a 42 °C	1 min	
- Extensión a 72 °C	1 min	
Extensión final 72°C	2 min	1

Se realiza la amplificación usando bajas temperaturas de hibridación (42 °C) forzando de esta manera la obtención de fragmentos de amplificación inespecíficos, de distintos pesos moleculares, cuyos extremos 5' y 3' poseen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores. Los productos de la PCR se detectaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Sharp y col. 1973). El peso molecular de las bandas obtenidas se determinó por comparación con un estándar de ADN (Biodynamics) (Figura 19).

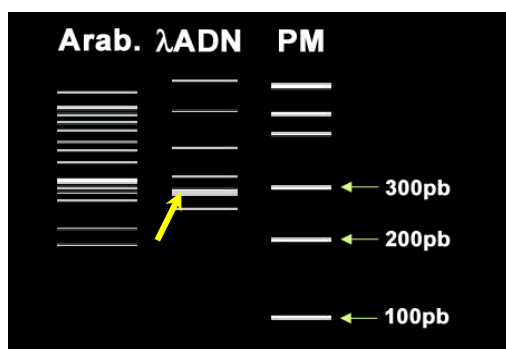


Figura 19: Esquema representativo de un gel que permite seleccionar un producto de amplificación con un peso molecular (PM) similar al de nuestra secuencia blanco (VEGF) y que se utilizará como competidor. La flecha amarilla indica la banda seleccionada.

b) Se selecciona una banda cuyo peso molecular sea cercano al producto de amplificación específico de nuestra secuencia blanco (VEGF, de 320pb) (Figura 19). Luego se recorta la porción del gel que contiene la banda con un bisturí estéril y se purifica usando el kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Al terminar la purificación se obtienen 10-20 μ l de producto de PCR disueltos en agua libre de ADNasas.

c) Posteriormente, se procede a la inserción del fragmento de ADN seleccionado como competidor en un plásmido pBluescript pSK- (Stratagene, La Jolla, CA, USA) como sigue:

- preparación de ADN plasmídico (plásmido pBluescript pSK-) empleando el sistema comercial *Wizard® Plus Minipreps System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- digestión del ADN plasmídico con enzima *EcoRV* en las condiciones de reacción recomendadas por el fabricante. Se utilizaron 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir

- ligación de fragmentos de ADN (ADN plasmídico e inserto: fragmento competidor purificado) utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 10 μ l y empleando el tampón de reacción provisto por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 4 a 1. La incubación se realizó durante 16 hs a 4 °C.

d) El plásmido recombinante (que se utilizará como competidor en las reacciones de PCR competitiva) se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α con el fin de generar un stock del competidor. Para la transformación de las células de *E. coli* se siguió el protocolo descrito en Sambrook y col. (2001) que utiliza cationes divalentes (cloruro de calcio) y bajas temperaturas para alterar la estructura de la membrana y así favorecer la incorporación del ADN plasmídico. Las colonias recombinantes se identificaron mediante α -complementación, para lo cual el medio de cultivo se suplementó con IPTG 0,3 mM y X-gal 0,006% p/v. Posteriormente se tomó con ansa aguja o escarbadiantes estéril una colonia recombinante de la placa correspondiente. Se la dispersó en un tubo conteniendo 2 ml de medio Luria Bertani (LB) y ampicilina como antibiótico de selección y se incubó entre 14-16hs a 37°C en agitación. Luego se generó el stock de bacterias transformadas mezclando en un tubo estéril 750 μ l de medio de cultivo con las bacterias + 750 μ l de glicerol calidad biología molecular (Sigma) y se conservó a -80°C. A partir de los mismos se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico recombinante conteniendo el fragmento competidor para el VEGF. La concentración del ADN competidor se determinó midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro (Beckman Instruments) a una longitud de onda de 260 nm y aplicando las siguientes fórmulas:

- *Concentración de ácidos nucleicos [μ g/ml]* = Lectura a 260 nm x 50 μ g/ml
(1 unidad de absorbancia a 260 nm = 50 μ g/ml de ADN)

Moléculas/ml =
$$\frac{\text{Conc. ácidos nucleicos } [\mu\text{g/ml}] \times 1.10^{-6} \text{ g}/\mu\text{g} \times 6,023.10^{23} \text{ moléculas/mol}}{\text{Peso del (plásmido + inserto) [g/mol]}}$$

Ensayo de PCR competitiva para la determinación de la expresión del ARNm del VEGF

Una vez generado el competidor heterólogo para cuantificar la expresión del ARNm del VEGF se procedió al desarrollo de la PCR competitiva. La figura 20 presentada a continuación muestra esquemáticamente como se realiza y se cuantifica un ensayo de PCR competitiva.

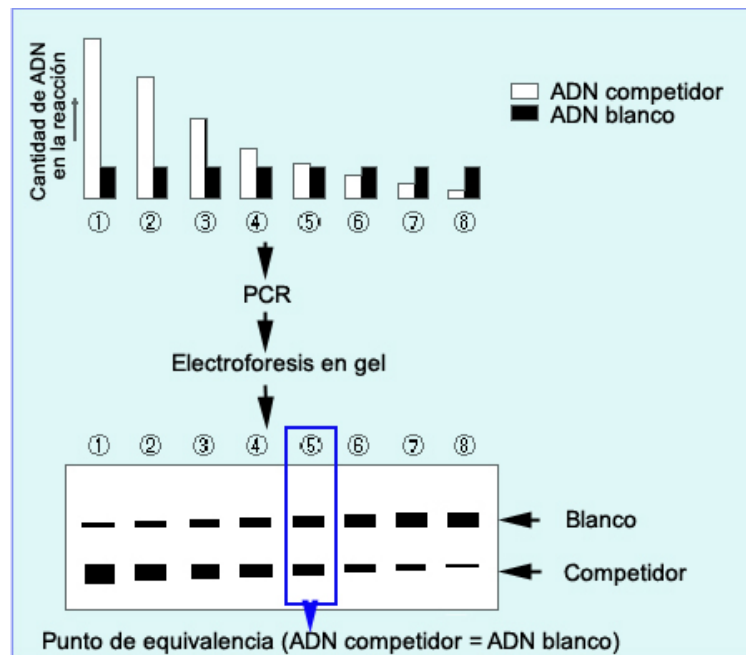


Figura 20: Esquema del procedimiento básico de una PCR competitiva. En primer lugar se confeccionan los tubos de reacción manteniendo constante la cantidad de ADN total incógnita o blanco y adicionando cantidades decrecientes de ADN competidor. Luego los productos de la amplificación se corren en un gel de agarosa obteniéndose un patrón de bandas característico. El punto de equivalencia se corresponde con el punto en el cual las bandas de los dos productos (competidor y blanco) son iguales, lo cual indica que la concentración inicial de ambos es la misma.

En nuestro experimento se realizaron *pools* del ADNc obtenido por RT del cérvix uterino de hembras preñadas (2 animales/*pool* y 3 *pools*/día de gestación) y se realizó la PCR competitiva con cada mezcla de ADNc. Para ello, cantidades constantes de ADNc blanco se adicionaron a todos los tubos de reacción junto con cantidades decrecientes de ADN competidor (10,7 - 0,88 attomoles). Cada tubo de reacción contenía 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, y 20

pmol de cada oligonucleótidos específico (todos de Invitrogen, tabla 5) en un volumen final de 25 μ l en solución reguladora de PCR 1X. Las reacciones de PCR competitivas se realizaron por triplicado siguiendo el protocolo de ciclado que se detalla:

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización a 97°C	5 min	1
- Desnaturalización a 96 °C - Hibridización a 60 °C - Extensión a 72 °C	45 seg 1 min 1 min	30
Extensión final 72°C	2 min	1

La secuencia de los oligonucleótidos específicos para esta PCR se seleccionó en base a la secuencia de ADNc publicada del ARNm del VEGF de la rata (Kashida y col. 2001, tabla 5). Los fragmentos de amplificación generados (ADNc del VEGF y ADN competidor) fueron resueltos en geles de agarosa al 3% conteniendo bromuro de etidio (Sigma) y sus pesos moleculares se determinaron por comparación con un estándar de ADN (Biodynamics).

Cuantificación: Las imágenes de los geles de agarosa se digitalizaron usando una cámara de video color Sony ExwaveHAM (Sony Electronics, Inc., Park Ridge, NJ, USA). La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó mediante el uso del software Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Por densitometría se evaluó la densidad óptica integrada (DOI) de cada producto de PCR. Se calculó la relación (R) DOI competidor/DOI VEGF para cada tubo de reacción y se graficó el log de relación (log R) en función del log de la concentración del competidor adicionada a cada tubo. Cuando la señal de amplificación generada a partir de la muestra y a partir del competidor es igual ($R = 1$) se asume que ambos procesos partieron del mismo número de copias iniciales (Figura 20). A partir de este punto de equivalencia se calculó el número de attomoles de ARNm del VEGF/ μ g de ARN total para cada día de la gestación estudiado.

Determinación de las variantes de empalme alternativo del VEGF

Para detectar las principales variantes de empalme alternativo del ARNm del VEGF (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈) se realizaron PCR múltiples de un solo tubo utilizando el ADNc obtenido del cérvix uterino en distintos días de preñez. De la misma manera que se procedió para evaluar la expresión total del ARNm del VEGF, a partir de los ADNc de 6 ratas se realizaron *pools* (2 animales por *pool*) y se realizaron ensayos de PCR como se describió previamente, usando 61 °C como temperatura de hibridación. Para co-amplificar las distintas variantes de empalme del ARNm del VEGF se diseñaron oligonucleótidos específicos de manera tal que hibriden en exones contiguos a los sitios de empalme alternativo correspondiente a los exones 6 y 7 de la secuencia del ADNc del VEGF (Número de acceso a GenBank NM_031836, Tabla 5, Figura 21). Para el diseño de los mismos se utilizaron las herramientas disponibles online en la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se utilizó un software adecuado, *Vector NTI*. La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Rattus norvegicus* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

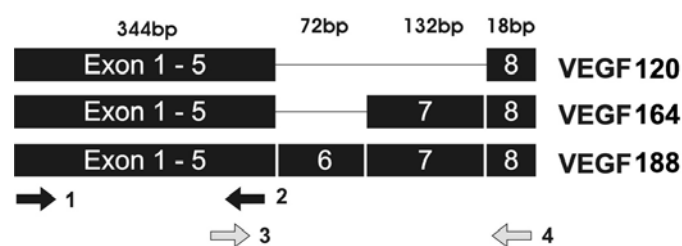


Figura 21: Esquema de localización de los oligonucleótidos para amplificación por RT-PCR del gen del VEGF. Los oligonucleótidos 1 y 2 fueron usados para cuantificar el ARNm del VEGF, mientras que los oligonucleótidos 3 y 4 se emplearon para detectar las principales variantes de empalme del VEGF. El tamaño esperado de los productos de amplificación es mostrado en la tabla 5.

Se realizaron curvas de fusión para descartar la formación de heteroduplex y de amplificaciones inespecíficas (Eckhart y col. 1999). Los

productos de la PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y sus pesos moleculares se determinaron por comparación con un estándar de ADN (Biodynamics).

Cuantificación: Se cuantificó la expresión relativa de cada una de las variantes de emplame alternativo a través de la determinación de la DOI de cada una de las bandas de amplificación (en relación a la suma de todas las variantes expresadas).

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos específicos utilizados

Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplicón
VEGF (s) VEGF (as)	5'-CTGCTCTCTTGGGTGCACTGG-3' 5'-GGTTTGATCCGCATGATCTGCAT-3	320 pares de base (pb)
Variantes de empalme del VEGF (s) Variantes de emplame del VEGF (as)	5'-CATGCGGATCAAACCTCACC-3' 5'-CACCGCCTTGGCTTGTCACA-3'	VEGF120:126 pb VEGF164:258 pb VEGF188:330 pb
L19 (s) L19 (as)	5'-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3' 5'-ACCTTCAGGTACAGGCGTTG-3'	290 pb

(s) oligonucleótido sentido

(as) oligonucleótido antisentido

Para confirmar que los cambios en la expresión del ARNm del VEGF y de sus variantes de emplame fueron independientes de la cantidad inicial de ADNc, se midieron los niveles de expresión de un ARNm celular expresado constitutivamente como es la proteína ribosomal L19, mediante un ensayo de PCR realizado paralelamente. Los tubos de PCR se conformaron como se describió previamente para las otras PCR utilizándose oligonucleótidos específicos (Chan y col. 1987; Tabla 5). La temperatura de hibridación empleada fue de 57 °C y se realizaron 30 ciclos de amplificación. Además, en todos los ensayos se realizaron controles negativos sin ADNc con el objetivo de minimizar la introducción de potenciales artefactos.

4.2- Niveles séricos de E₂ durante la preñez

Para evaluar los niveles séricos de E₂ los animales se sacrificaron por decapitación. Se recolectó la sangre para obtener el suero y se evaluó mediante un radioinmunoensayo optimizado en nuestro laboratorio. Se utilizó E₂ radioisotópicamente marcado con tritio, obtenido comercialmente ([2,4,6,7,16,17-H³]-E₂, PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Boston, MA, USA). El anticuerpo específico fue provisto por el Dr. G.D. Niswender.

El primer paso en la determinación de la concentración sérica de E₂ fue la extracción de los esteroides del suero. La extracción se realizó a partir de 600 µl de suero y usando éter etílico como solvente (Merck, Buenos Aires, Argentina). El protocolo de extracción utilizado consistió de 3 extracciones sucesivas, separando la fase orgánica en cada una (Lacau-Mengido y col. 2000, Kass y col. 2004). Las fracciones orgánicas de cada muestra se juntaron y evaporaron a sequedad. El extracto seco se resuspendió en PBS con el agregado de azida sódica y gelatina (Sigma) durante 1:30 h en baño térmico.

Paralelamente se generó una curva estándar como sigue:

Tabla 6: Preparación de tubos de reacción para el RIA de E₂

	Buffer	Curva est.	Muestra	Anticuerpo ⁽¹⁾	[H ³]-E ₂ ⁽²⁾
Cuentas totales	400 ul	--	--	--	100µl
Inespecífico	400 µl	--	--	--	100µl
Máximo	300 µl	--	--	100µl	100µl
400 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
200 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
100 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
50 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
25 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
12.5 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
6.25 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
3.125 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
1.5625 pg/ml	--	300 µl	--	100µl	100µl
Muestras	--	--	300 µl	100µl	100µl
Blanco	--	--	300 µl	100µl	100µl

- (1) Anticuerpo anti-E₂: diluido 30000 veces
- (2) 8000-10000cpm por cada 100µl de hormona

Los tubos de reacción se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se adicionó carbón-dextrán (0,5%-0,05%) (Sigma) y se incubó 10 min con agitación periódica. Se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 min con el objeto de separar el carbón-dextrán. El sobrenadante se homogeneizó con líquido de centelleo (PerkinElmer) en una relación de volumen 10 veces superior. La radioactividad se leyó en un contador de centelleo (WinSpectral, PerkinElmer). En todos los ensayos se evaluaron sueros controles valorados.

Además se hicieron pruebas para determinar la eficiencia de la extracción. Para ello se adicionó una cantidad conocida de hormona marcada con tritio a 600 µl de suero, se sometió al proceso de extracción y luego el extracto seco se resuspendió en PBS. Esta solución se mezcla luego con el líquido de centello y se mide la cantidad de cuentas recuperadas. Los resultados de los diferentes ensayos fueron corregidos según la recuperación calculada. La sensibilidad del análisis fue de 1,6 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 10,16 % y 7,9 %, respectivamente.

4.3- Evaluar la participación de células del sistema inmune en el proceso de angiogénesis

Uno de los objetivos que nos planteamos en este trabajo de tesis fue evaluar la participación de los MC en el proceso de angiogénesis en el cérvix uterino. Comenzamos evaluando la densidad de esta célula en el tejido durante diferentes situaciones fisiológicas: ciclo estral, gestación y postparto.

4.3.1- Evaluación de Mastocitos

Muestras de cérvix uterino durante el ciclo estral (estro y diestro II), la preñez (D9-D23) y el postparto (PP1-PP3) fueron obtenidas y procesados de acuerdo a lo descrito en las secciones 2 y 3. En cortes histológicos de 5 µm de espesor se realizó la determinación de MC. Se aplicó una técnica de

IHQ utilizando un anticuerpo policlonal (1:200) que detecta el componente principal de sus gránulos: la enzima proteinasa I (RMCP I, *rat mast cell proteinase I*, Gibson y Miller 1986). Esta técnica a diferencia del protocolo de IHQ descrito en la tabla 4, no requiere tratamiento de recuperación antigénica en horno microondas, pero incorpora un sistema de bloqueo de actividad endógena de peroxidasa con ácido peryódico 0.1 M y borohidrato de sodio al 0.02%. El sistema de revelado consistió en IgG de cabra anti-IgG de conejo biotinilada 1:200 seguido de estravidina-peroxidasa 1:150 y como cromógeno se usó DAB.

Cuantificación: Se utilizó una grilla cuadrículada de 0.8 x 0.8 mm colocada en el ocular del microscopio (Gundersen y col. 1988) con la que se determinó la fracción de volumen aplicando la fórmula de Weibel (1969): $Vv = Pi/P$, donde **Vv** es la fracción de volumen estimada del objeto en estudio (ej. MC), **Pi** es el número de puntos incidentes sobre las células positivas (ej. MC inmunomarcados con RMCP1), **P** es el número de puntos incidentes sobre el estroma cervical. Utilizando esta fórmula se determinó la densidad de volumen ($Vv \times 100$) de MC en el compartimiento estromal del cérvix uterino de los distintos grupos experimentales.

4.3.2- Inhibición de la degranulación de mastocitos. Diseño de grupos experimentales

Para estudiar si la degranulación de los MC interviene en el proceso de angiogénesis en el cérvix uterino durante la preñez, sometimos a los animales a un tratamiento con *cromoglicato de sodio*, un inhibidor de la degranulación de MC. Se utilizaron ratas preñadas obtenidas como se describió previamente en la sección 2 de materiales y métodos. El estabilizador de MC (*cromoglicato de sodio*, Sigma) fue inyectado en forma intraperitoneal (i.p.) en una dosis diaria de 87 mg/kg de peso corporal. La dosis empleada fue equivalente a la dosis usada en un trabajo previo que utiliza otro estabilizador de MC, FPL55618 (Spanggaard y col. 1997). En base a los resultados de la cuantificación de la densidad de MC en el cérvix uterino durante la preñez se determinó el momento más adecuado para comenzar el tratamiento con *cromoglicato de sodio*. Se decidió empezar el tratamiento el D12 de gestación debido a que este día coincide con un alto

nivel de infiltración de MC y, además, para evitar posibles interferencias con el proceso de implantación o con las etapas tempranas del desarrollo fetal.

A continuación se detalla el protocolo de tratamiento empleado:

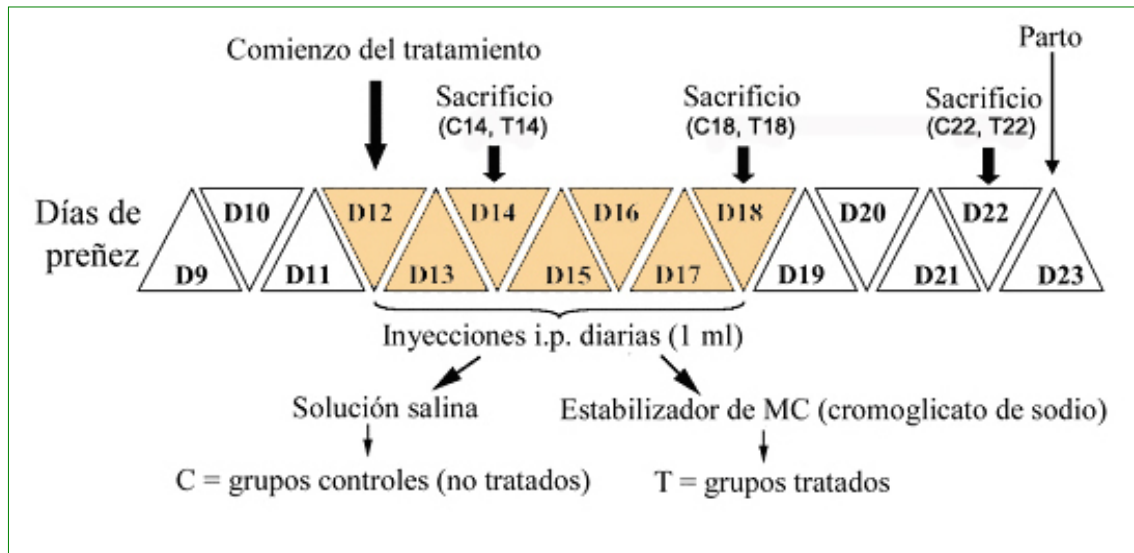


Figura 22: Esquema de tratamiento empleado para estudiar la participación de los MC en el proceso de angiogénesis. Los triángulos en blanco representan los días de preñez previos y posteriores al tratamiento. Los triángulos anaranjados representan los días de preñez en los que los animales fueron sometidos a tratamiento, ya sea con vehículo (solución salina) o con cromoglicato de sodio (el estabilizador de MC) mediante inyecciones diarias por vía ip. En el esquema se indican los días de sacrificio para los distintos grupos experimentales estudiados: D14, D18 y D22.

Los grupos experimentales resultantes fueron:

- **Grupo T14:** ratas preñadas tratadas con estabilizador de MC desde D12 a D14, sacrificadas D14 de preñez.
- **Grupo T18:** ratas preñadas tratadas con estabilizador de MC desde D12 a D18, sacrificadas D18 de preñez.
- **Grupo T22:** ratas preñadas tratadas con estabilizador de MC desde D12 a D18, sacrificadas D22 de preñez.
- **Grupos Controles C14, C18 y C22:** ratas preñadas inyectadas con vehículo (solución salina) y sacrificadas el D14, D18 o D22 respectivamente.

Todos los animales del experimento recibieron 2 hs antes del sacrificio una dosis i.p. de 6 mg/100 g de peso corporal de BrdU, para la posterior determinación de la proliferación endotelial. Al momento del sacrificio se recogió sangre para la obtención de suero y se disecaron los cérvix uterinos. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en la sección 3.

En cortes histológicos de 5 μ m de espesor se determinó:

- densidad y degranulación de MC
- proliferación de células endoteliales
- área ocupada por vasos
- maduración vascular
- expresión del VEGF

A partir del ARN total de las muestras de cérvix uterino se evaluó:

- expresión del ARNm del VEGF y sus variantes de empalme alternativo

A partir muestras de suero se determinó:

- la concentración de E₂

4.3.2.1- Evaluación de MC

La densidad de MC y el porcentaje de MC degranulados y no degranulados se evaluaron sobre ensayos de IHQ (sección 4.3.1) con el objetivo de valorar la efectividad del tratamiento. La cuantificación de la densidad de MC se determinó calculando el Vv, como se describió previamente. Los MC con más de 3 gránulos fuera de la célula o con cavidades vacías dentro del citoplasma fueron considerados como MC degranulados, mientras que los que presentaron gránulos densamente empaquetados en el citoplasma se consideraron no degranulados (Figura 23). Estos criterios para la diferenciación entre los dos estados de los MC fueron tomados de Gunin y Sharov (1998) y se utilizaron para calcular el porcentaje de MC degranulados.

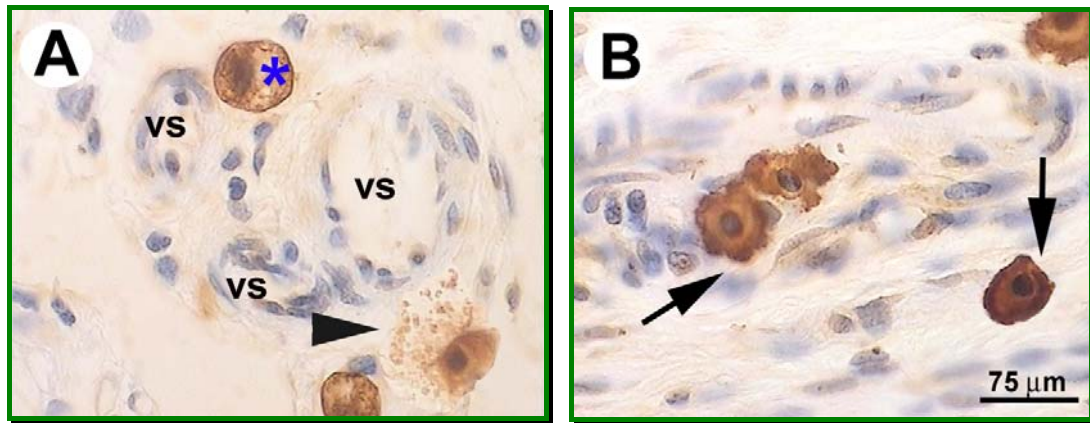


Figura 23: Características morfológicas e inmunohistoquímicas de los MC evidenciando su estado de degranulación. La IHQ se realizó usando el anticuerpo anti-RMCPI. En la figura de la izquierda (**A**) la punta de flecha muestra un MC degranulado, observándose gránulos fuera de la célula. El asterisco nos muestra un halo citoplasmático representativo de la ausencia de gránulos. En (**B**) las flechas indican MC no degranulado, con los gránulos densamente empaquetados dentro del citoplasma celular. Escala de A y B: 75 μm .

4.3.2.2- Proliferación de células endoteliales

La determinación y cuantificación de la incorporación de BrdU para evaluar las células endoteliales en fase S del ciclo de división celular se realizó según lo descrito en la sección 4.1.2.

4.3.2.3- Área ocupada por vasos

El estudio del área ocupada por vasos sanguíneos en el cérvix uterino de ratas tratadas con cromoglicato de sodio se realizó como fue anteriormente descrito (sección 4.1.1).

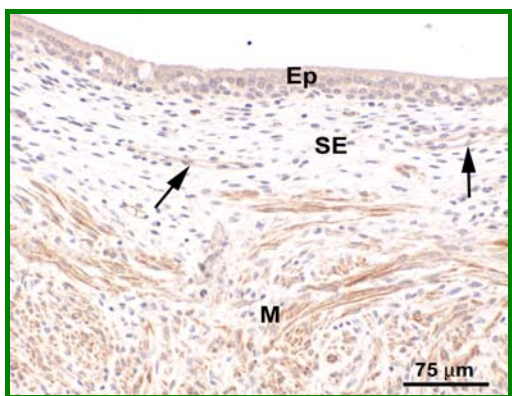
4.3.2.4- Maduración vascular

La determinación del área ocupada por pericitos y células musculares lisas vasculares se realizó mediante la inmunodetección de α -SMA (descrita en la sección 4.1.3).

4.3.2.5- Expresión del VEGF

La expresión del VEGF en el cérvix uterino de animales que presentaban inhibida la degranulación de MC fue evaluada a distintos niveles:

- ARNm total del VEGF: se realizó por RT-PCR competitiva siguiendo el protocolo previamente descrito en la sección 4.1.4
- expresión relativa de las variantes de emplame alternativo del VEGF: se evaluó por PCR múltiple usando los oligonucleótidos diseñados específicamente (ver sección 4.1.4)
- proteína de VEGF: se realizó por IHQ utilizando un anticuerpo contra VEGF que detecta todas las variantes de empalme alternativo (Figura 24).



Anticuerpo primario Clon	Anti-VEGF * C-1
Dilución utilizada	1:40
Anticuerpo secundario biotinilado	Antiratón 1:50
Extravidina peroxidasa	1:80
Cromógeno empleado	DAB

*proveedor: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Figura 24: Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de VEGF. La flecha indica endotelio vascular con marcación positiva para VEGF. Ep: epitelio, SE: subepitelio, M: región muscular del estroma cervical. Contracoloración con hematoxilina. En la tabla localizada a la derecha de la figura se mencionan los reactivos utilizados.

4.3.2.6- Determinación de los niveles séricos de E₂

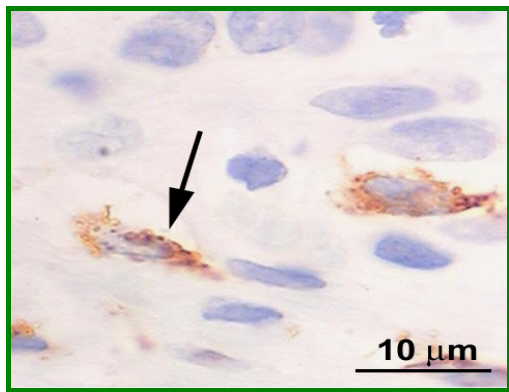
Para descartar posibles influencias del tratamiento con cromoglicato de sodio sobre la síntesis o liberación del E₂ se evaluaron por radioinmunoensayos sus niveles séricos en los animales tratados con el inhibidor de la degranulación de MC y controles sacrificados en el D18 de la gestación.

4.3.3- Evaluación de macrófagos

Otra célula del sistema inmune vinculada con la angiogénesis es el macrófago. Como primer paso se evaluó la densidad de estas células presentes en el cérvix uterino en diferentes situaciones fisiológicas:

- ciclo estral: estro y diestro II,
- preñez: D9 y D12 a D23
- posparto: 24, 48 o 72 hs después del parto (PP1, PP2 y PP3 respectivamente).

Las muestras de cérvix fueron disecadas y procesadas para estudios por microscopía óptica (sección 3b). La determinación de macrófagos se realizó en cortes de 5 μm de espesor mediante ensayos de IHQ siguiendo el protocolo descrito en la tabla 4. Se usó un anticuerpo monoclonal que reconoce una glicoproteína sobre la membrana lisosomal de los macrófagos.



Anticuerpo primario	Anti-macrófago *
Clon	ED1
Dilución utilizada	1:300
Anticuerpo secundario biotinilado	Antiratón 1:130
Extravidina peroxidasa	1:150
Cromógeno empleado	DAB

*proveedor: Serotec Ltd., Oxford, UK

Figura 25: Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de macrófagos. La flecha muestra un macrófago con marcación citoplasmática positiva para ED1. Contracoloración con hematoxilina. En la tabla localizada a la derecha de la figura se mencionan los reactivos utilizados.

Cuantificación: Para cuantificar la presencia de macrófagos en el cérvix uterino se tuvo en cuenta la regionalización del estroma cervical (subepitelio y músculo) descrita en Varayoud y col. (2001). Se cuantificaron aquellos macrófagos que presentaban un citoplasma con depósito de cromógeno marrón (positivo para la marcación con ED1) rodeando un núcleo azul teñido con hematoxilina. La tinción marrón en

pseudopodias y fragmentos celulares, no asociados con núcleos fueron excluidos de la cuantificación. La misma fue realizada utilizando el procedimiento de conteo de puntos como fue descrito en la sección 4.3.1 para la cuantificación de MC.

4.3.4- Asociación entre MC y macrófagos

Debido a que los macrófagos y MC son capaces de regular el proceso de angiogénesis, quisimos estudiar si existe alguna asociación entre ellos. Para tal fin evaluamos la presencia de macrófagos en las muestras de los animales que fueron tratados con el estabilizador de MC (sección 4.3.2). La identificación y cuantificación de macrófagos se llevó a cabo como se describió en el punto anterior.

5- CAPITULO II. Efecto de la exposición neonatal a estrógenos ambientales sobre la angiogénesis uterina en la rata adulta

Debido a que eventos vasculares en el endometrio son parte fundamental de la etapa temprana de implantación del embrión en la rata y que dichos procesos están bajo control de hormonas esteroides ováricas, desarrollamos un modelo de rata castrada sometida a terapia hormonal con Eg más Pg para evaluar los efectos a largo plazo de la exposición a xenoestrógenos sobre la angiogénesis hormonodependiente del útero.

5.1- Caracterización de un modelo que imita los efectos uterinos inducidos por las hormonas ováricas durante el periodo pre-implantatorio.

Ratas hembras adultas fueron ovariectomizadas como se describió en la sección 2.2.2. Luego se las dejó 10 días para permitir la disminución de niveles séricos de los esteroides ováricos y evitar sus efectos sobre órganos blanco. Seguidamente fueron tratadas por vía subcutánea con el siguiente protocolo que imita los cambios hormonales que se dan en los días previos a la implantación en la rata (Rider y col. 2003):

GRUPO OVX-P+E: - Día 1: Pg (10 mg/kg, Sigma)

- Día 2: Pg (10 mg/kg)

- Día 3: Pg (10 mg/kg) + Eg (4 µg/kg, Sigma)

GRUPO OVX: Recibieron durante los 3 días de tratamiento el vehículo en el cual fueron disueltas las hormonas: aceite de maíz.

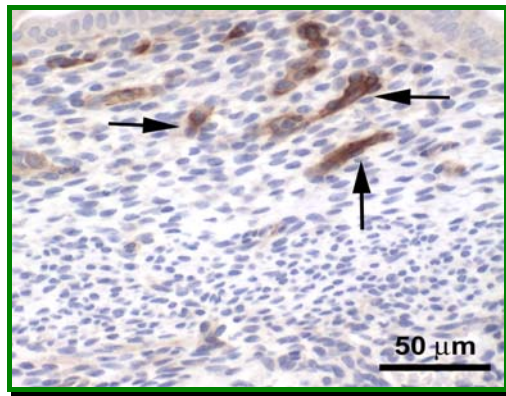
16 hs después de la última inyección, a cada rata se le administró una dosis de BrdU (60 mg/kg, Sigma) para evaluar la proliferación celular, siendo sacrificados los animales 4 hs posteriores. Se disecaron los cuernos uterinos como se describió en la sección 2.2.1. Uno de los cuernos uterinos fue rápidamente sumergido en nitrógeno líquido y el otro fijado para su utilización en microscopía óptica (secciones 3.c y 3.b, respectivamente).

En estos animales se evaluaron los siguientes parámetros:

- área ocupada por células nestina (+)
- proliferación de células endoteliales
- expresión del VEGF (a nivel del ARNm y proteína)

5.1.1- Área ocupada por nestina

La nestina es un filamento intermedio que originariamente fue detectado en células madres neuroepiteliales del sistema nervioso central y que recientemente se lo ha identificado como un nuevo marcador del endotelio proliferativo (Shimizu y col. 2006). En este trabajo se utilizó la inmunodetección de nestina por IHQ para la identificación de células endoteliales con capacidad de proliferar. Para ello se siguió el protocolo descrito en la tabla 4 y las condiciones del ensayo definidas en la tabla de la figura 26.



Anticuerpo primario	Anti-nestina *
Clon	rat 401
Dilución utilizada	1:200
Anticuerpo secundario biotinilado	Antiratón 1:80
Extravidina peroxidasa	1:150
Cromógeno empleado	DAB

*proveedor: BD Pharmingen, San Jose, CA

Figura 26: Fotomicrografía representativa de la IHQ para la detección de nestina en el útero de la rata. Las flechas señalan células endoteliales que expresan nestina. Contracoloración con hematoxilina. En la tabla localizada a la derecha de la figura se mencionan los reactivos utilizados.

Quantificación: Con el objetivo de medir el área de tinción positiva para la expresión de nestina se analizaron imágenes digitalizadas como previamente describimos para la evaluación del área ocupada por vasos en la sección 4.1.1. Se cuantificó específicamente el área de vasos sanguíneos que expresan este filamento en relación al área total ocupada por los vasos.

5.1.2- Proliferación de células endoteliales

En ambos grupos de animales experimentales se evaluó la proliferación de las células endoteliales a través de la incorporación de BrdU. Para ellos se utilizó una metodología de doble IHQ que básicamente consiste de dos IHQ sucesivas. En una primera instancia se realiza la inmunomarcación de BrdU como se describió previamente en la sección 4.1.2. Luego del revelado, se sumergen los cortes histológicos en PBS y se continúa con una segunda IHQ para la detección de las células que expresan nestina (Tabla 7), de tal manera de poder identificar las células endoteliales que expresan nestina y que están proliferando (Figura 27).

Tabla 7. Protocolo básico de la segunda parte de una doble IHQ

Lavado y recuperación antigénica	
Calentamiento en Horno microondas. Buffer Citrato 0.01 M, pH: 6 PBS	Calentar 10 min a 100% de potencia y 20 min apagado. 5 min
Segundo Anticuerpo Primario	
Anticuerpo anti-nestina 1:200 PBS	14 - 16 hs (en cámara húmeda) a 4°C 15 min
Sistema de Revelado	
Anticuerpo antiratón biotinilado 1:80 PBS Extravidina-peroxidasa 1:150 PBS Sustrato enzimático (3,3 µl de H ₂ O ₂ 30 vol) + cromógeno (1,65mg de DAB) + 39,72 mg de NiCl ₂ disueltos en 3,3 ml de 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) Agua destilada	30 min (en cámara húmeda) 5 min 30 min (en cámara húmeda) 5 min 10 min 5 min
Contracoloración: Se utiliza <i>Nuclear Fast Red</i> 1min y luego se lava en agua destilada. Deshidratar y montar	

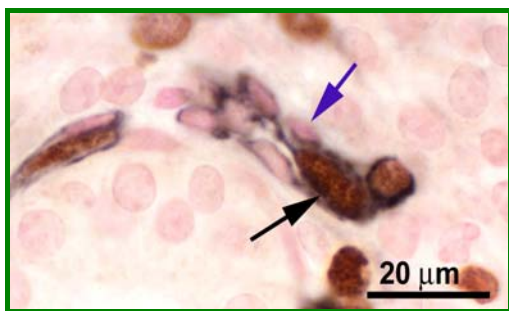


Figura 27: Fotomicrografía representativa de la doble IHQ para la determinación de las células endoteliales que expresan nestina y que además han incorporado BrdU. La flecha negra señala una célula endotelial que expresa nestina

y prolifera, mientras que la flecha azul indica una célula endotelial que expresa nestina pero que no está proliferando.

Cuantificación: El porcentaje de células endoteliales proliferando se calculó dividiendo el número de células doblemente marcadas (BrdU-nestina) por el número de células endoteliales positivas para la marcación con el anticuerpo anti-nestina. La evaluación se realizó sobre un total de 100 vasos sanguíneos en la región subepitelial del útero.

5.1.3- Expresión del VEGF

Estudio sobre la proteína de VEGF: en cortes histológicos de 5 μm de espesor se realizaron IHQ para evaluar la expresión de la proteína del VEGF. El protocolo utilizado fue el descrito en la sección 4.3.2.5. Se obtuvieron imágenes de las muestras ensayadas que fueron analizadas en un software adecuado, determinándose por densitometría la DOI del VEGF en la región subepitelial del útero.

Estudio sobre el ARNm de VEGF: a partir de las muestras de útero congeladas se realizó la extracción del ARN total siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.1.4.1. Posteriormente, se determinó la expresión del ARNm del VEGF mediante ensayos de PCR en tiempo real. Esta metodología se basa en la detección y cuantificación ciclo a ciclo de una molécula fluorescente. La técnica empleada en nuestro laboratorio consiste en la detección de ADN amplificado por la inserción del colorante fluorescente SYBR Green I (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ). La fluorescencia es detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR (*ADN Engine Opticon System*, Bio-Rad Laboratories, Inc. Waltham, MA).

Para las amplificaciones de los ADNc, 5 μl de ADNc se combinaron con una mezcla conteniendo 2,5 U de *Taq*-ADN polimerasa (Invitrogen), 2 mM MgCl_2 (Invitrogen), 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTP (Promega) y 10 pmol de cada oligonucleótido (Invitrogen) en un volumen final de 25 μl de la solución reguladora de la reacción con 1X SYBR Green. El protocolo de ciclado empleado es el que se describió previamente para la evaluación del VEGF en el cérvix durante la gestación. Luego de un suficiente número de ciclos (40 aproximadamente) se realizó una curva de desnaturalización para determinar la especificidad de los productos amplificados de la siguiente manera: 97°C por 15 s (desnaturalización), 60°C por 20 s, luego incrementar gradualmente a 97°C por 20 min, finalmente se calienta a 97°C por 15 s.

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra, se realizó utilizando el método del ciclo umbral (C_T) (Higuchi y col. 1993).

En nuestros experimentos, el valor de C_T para cada muestra fue calculado usando el software *Opticon Monitor Analysis* (MJ Research) y la eficiencia de la reacción de PCR fue evaluada realizando ampliaciones a partir de diluciones seriadas (alrededor de 5 ordenes de magnitud) de los fragmentos de ADNc de los transcritos en estudio. Adecuadamente, el aumento o disminución de la expresión en relación a los valores controles fue calculada para cada muestra utilizando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde el ΔC_T es determinado restando el valor de C_T correspondiente a la expresión de la 18S ribosomal (control interno) del C_T específico para cada muestra y condición experimental ($\Delta C_T = C_T_{(VEGF)} - C_T_{(18S)}$) y el $\Delta\Delta C_T$ se obtiene sustrayendo el ΔC_T de cada grupo experimental del grupo control ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T_{(grupo\ tratado)} - \Delta C_T_{(grupo\ control)}$) (User Bulletin n° 2, ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System).

5.2- Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre el proceso de angiogénesis uterino

Este experimento se realizó para evaluar los efectos a largo plazo de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre el útero, usando el modelo de reemplazo hormonal caracterizado en el punto 5.1.

El diseño experimental consistió de ratas preñadas que al momento del parto (día 0) fueron dejadas con 10 crías. Las crías hembras fueron expuestas el día postnatal (DPN) 1, 3, 5 y 7 a bajas dosis de los xenoestrógenos **DES** (Sigma) en una concentración de 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ y BPA (Sigma) en una dosis de 0,05 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ (**BPA.05**) o 20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ (**BPA20**). Los animales controles fueron inyectados los mismos días con un volumen igual de aceite de maíz (Figura 28). Durante el tratamiento no se observaron signos de toxicidad, ni diferencias en la ganancia de peso entre los animales expuestos a xenoestrógenos y los animales controles.

Las hembras fueron destetadas a los 21 días de edad. A partir de entonces se las dejó crecer hasta los 80 días de vida. Estos animales no mostraron diferencias en el comienzo de la pubertad, evaluado por la edad a la cual se observaba la apertura vaginal. A los 80 días los animales se dividieron en dos grupos: un grupo de animales fueron ovariectomizados

(como se describió en la sección 2.2.2), luego de dejarlos 10 días para favorecer la regresión del endometrio fueron sometido al mismo tratamiento de reemplazo hormonal descrito en la sección anterior (5.1). El otro grupo de animales fue destinado para estudiar los efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la fertilidad (se describe en la sección 5.3).

El diseño del experimento es resumido y esquematizado en la siguiente figura:

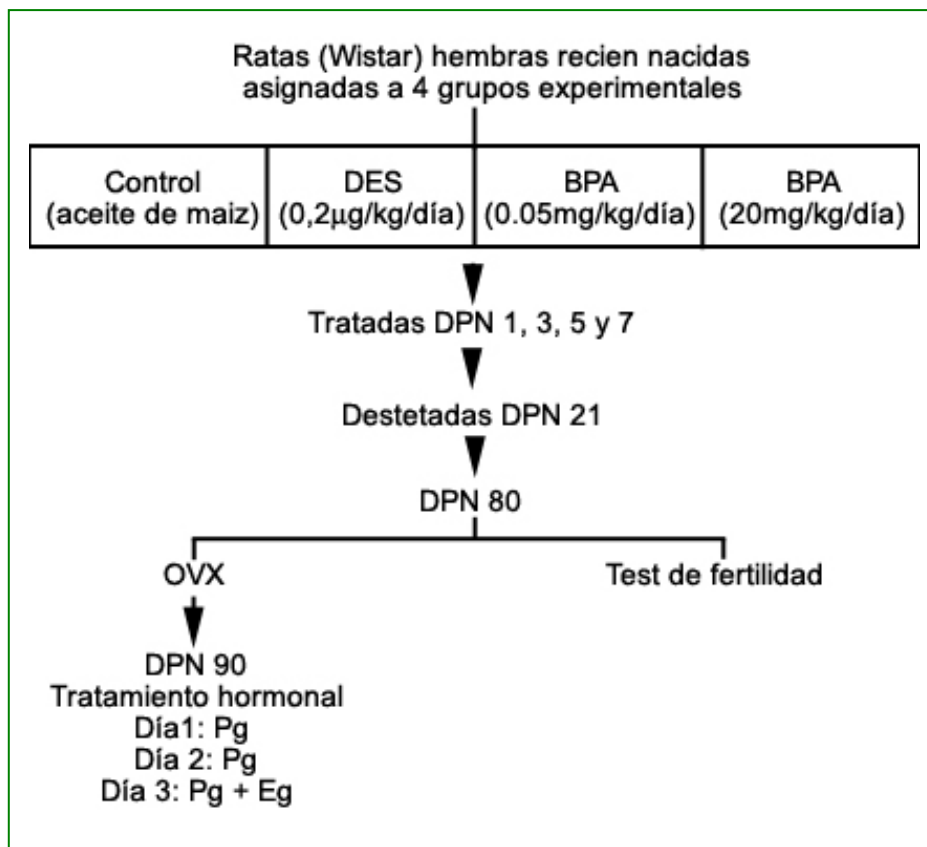


Figura 28: Esquema del diseño experimental empleado para evaluar el efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos. DPN: día postnatal

En el grupo de animales OVX y sometidos a tratamiento hormonal evaluamos los parámetros que se describen a continuación.

5.2.1- Área ocupada por nestina

La determinación de este parámetro se realizó tal cual se describió en la caracterización del modelo empleado (sección 5.1.1).

5.2.2- Proliferación de células endoteliales

El porcentaje de células endoteliales en proliferación se determinó por doble IHQ como previamente se comentó en la sección 5.1.2.

5.2.3- Expresión del VEGF

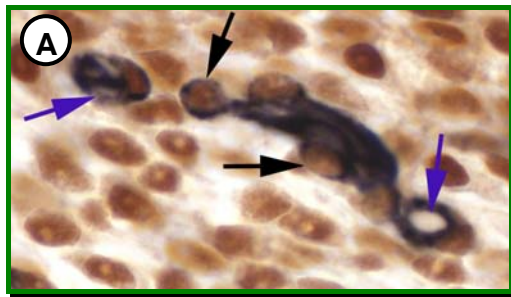
La expresión de la proteína del VEGF se realizó por IHQ como se describió en la sección 5.1.3.

La evaluación del ARNm total del VEGF se hizo por PCR en tiempo real (sección 5.1.3) y además se evaluó la expresión de las variantes de empalme alternativo del VEGF. La determinación se realizó por RT-PCR tal como se describió en la sección 4.1.4. Se cuantificó la expresión relativa de cada una de las variantes de empalme a partir de la evaluación de la DOI de cada una de las bandas resueltas en un gel de agarosa.

Para todas las PCR se utilizó la expresión de la subunidad 18S ribosomal como control interno de carga de ADNc. La secuencia de los oligonucleótidos empleados es la siguiente: sentido 5'-CAACTTTCGATGGTAGTCGC-3', antisentido: 5'-CGCTATTGGAGCTGGAATTAC-3', generando un producto de 285 pb.

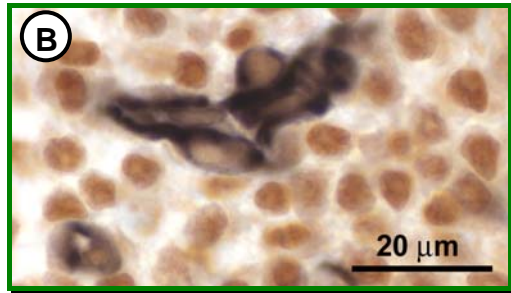
5.2.4- Expresión de receptores de hormonas esteroideas ($RE\alpha$ y RP)

La evaluación de las células que expresan $RE\alpha$ y RP fue realizada por doble IHQ (Figura 29): $RE\alpha$ /Nestina y RP/Nestina siguiendo el protocolo descrito en las tablas 5 y 7.



Anticuerpo primario	Anti-REα *
Clon	6F-11
Dilución utilizada	1:200
Anticuerpo secundario biotinilado	Antiratón 1:80
Extravidina peroxidasa	1:150
Cromógeno empleado	DAB

*proveedor: Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK



Anticuerpo primario	Anti-RP *
Dilución utilizada	1:500
Anticuerpo secundario biotinilado	Anticonejo 1:200
Extravidina peroxidasa	1:150
Cromógeno empleado	DAB

*proveedor: Dako, Glostrup, Denmark

Figura 29: Fotomicrografía representativa de la doble IHQ para la detección de células endoteliales expresando el RE α (A) y RP (B). Las condiciones del anticuerpo anti-nestina y su sistema de revelado es el descrito anteriormente. Las flechas negras señalan células endoteliales coexpresando el RE α y nestina y las flechas azules indican células endoteliales que expresan solamente nestina. Observese que el RP coexpresa con el marcador de nestina en la mayoría de las células endoteliales. Las tablas a la derecha de las figuras muestran las condiciones de los reactivos empleados en la primera parte del ensayo de IHQ.

Cuantificación: La evaluación se realizó diferencialmente en la región subepitelial y en las células endoteliales. La cuantificación sobre el compartimiento subepitelial fue realizada por análisis de las imágenes como se describió en la sección 4.1.1. Las imágenes inmunoteñidas fueron convertidas a escala de grises, se delimitó el compartimiento subepitelial estromal (un área de 300 μ m de espesor adyacente al epitelio, desde la membrana basal hacia las capas más externas) y se le midió la DOI como una combinación lineal entre el promedio de intensidades de grises y el área relativa ocupada por células positivas. El resultado se expresó como unidades arbitrarias.

Las células endoteliales se cuantificaron como porcentaje de células endoteliales doblemente positivas (RP o RE α -nestina) en función de las

células endoteliales positivas para nestina. Se cuantificaron un total de 100 vasos sanguíneos positivos para la marcación de nestina por muestra de útero.

5.2.5- Expresión de coreguladores de la acción de los receptores de hormonas esteroides (SMRT y SRC-3).

Para la determinación por IHQ de estos dos coreguladores se generaron los anticuerpos específicos como se detalla a continuación.

5.2.5.1- Obtención de antígenos recombinantes en células procariontas

Las proteínas recombinantes que se generaron corresponden a porciones antigénicas del SMRT y SRC-3 predichas de rata. El antígeno de SRC-3 incluyó la región correspondiente a los aminoácidos 581-650 (número de acceso XP_215947) y el de SMRT fue compuesto de los aminoácidos 1946-1995 (número de acceso XP_341073).

Para la producción de estos antígenos se utilizó un procedimiento preparado para expresar una fusión del SMRT o SRC-3 con glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. (GST Gene Fusion System, Handbook, Amersham Biosciences). Los pasos realizados son los que se detallan a continuación:

a) Amplificación de la región codificante del ARNm de SMRT y SRC-3 y posterior clonado en el vector pGEX-4T3: Se comienza con la purificación del ARN total proveniente de útero de rata como se describió previamente (sección 4.1.4.1). Luego se realiza una RT seguida de una PCR utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para agregar sitios de cortes para enzimas de restricción (*XhoI*: CTCGAG, *EcoRI*:GAATTC, Tabla 8) que permiten un clonado direccional.

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos específicos

Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño
SMRT (s) para clonado	5'-TATTT <u>GAATT</u> CAACAGCCATCGCCCGCAC -3'	180 pb
SMTR (as) para clonado	5'-TTTGCTCGAGTCAGTGGTAACCCAGAGAAC-3'	
SRC-3 (s) para clonado	5'-AGGGGA <u>AATTC</u> GTCAAACAGCAGGGATCAC-3'	240 pb
SRC-3 (as) para clonado	5'-TTTT <u>CTCGAG</u> TCAAGAGGGGCTGGTGACAC-3'	

(s) oligonucleótido sentido

(as) oligonucleótido antisentido

Los nucleótidos subrayados indican los sitios de corte con enzimas de restricción.

El producto de amplificación por PCR se digiere con las enzimas *XhoI* y *EcoRI* y se liga al vector pGEX 4-T3 (Amersham Biosciences) digerido con las mismas enzimas. De esta forma, el marco de lectura de SMRT o SRC-3 queda en fase con el de la GST. Así, los constructos ([pGEX 4-T3/SMRT] o [pGEX 4-T3/SRC-3]) dirigen la síntesis de la proteína de fusión GST-SMRT y GST-SRC-3 respectivamente.

b) Expresión de la proteína de fusión: Con el ADN plasmídico purificado se transforman células *E. coli JM109* (Stratagene) por el método del CaCl_2 (Sambrook y col. 2001), escalando el cultivo a 200 ml (Maniatis y col. 1982, Baneyx 1999). La expresión de las proteínas de fusión se induce con el agregado de IPTG (Promega) en una concentración final de 250 μM .

c) Purificación de las proteínas de fusión: Las células se cosecharon y se lisaron por sonicado. A partir del lisado se purificaron las proteínas de fusión por cromatografía utilizando columnas de *glutación-sefarosa Fast Flow* (Amersham Biosciences). Se recogieron las fracciones de elusión, cuya concentración de proteína se evaluó por medio de la absorbancia 280nm. Las fracciones obtenidas fueron sembradas y corridas en un gel de poliacrilamida del 5 al 20% para evaluar su pureza relativa. Se juntaron todas las fracciones que contenían proteína y se las concentró utilizando tubos de filtración forzada (Centricon, límite de paso 10 KDa, Millipore).

Luego, la cantidad total de proteínas se evaluó cuantitativamente en un espectrofotómetro a 280nm.

5.2.5.2- Obtención, caracterización y purificación de anticuerpos policlonales monoespecíficos de conejo

a) Inoculación de los conejos: Una vez obtenidas las proteínas de fusión purificadas (GST-SMRT y GST-SRC-3) se procedió a la inoculación de dos conejos, uno para cada antígeno de acuerdo al siguiente protocolo (Vaitukaitis y col. 1971, Harlow y Lane 1998):

- Se tomó una muestra de sangre de la cual se obtuvo el suero basal y luego se inoculó cada antígeno,

- Se inyectó en forma subcutánea 100 µl por sitio, de la preparación constituida por 300 µg de cada antígeno en 300 µl de PBS y 300 µl de adyuvante completo de Freund.

- Quince días después se realizó una nueva inoculación de la misma preparación antes descrita, pero esta vez utilizando adyuvante incompleto de Freund. Este procedimiento se repitió dos veces cada 15 días, finalizando el proceso de inoculación a los 60 días de la primera inoculación. En ese momento se extrajo de cada conejo una muestra de sangre que se incubó a 37°C para facilitar la exudación del suero, luego de lo cual fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 20 minutos. El suero se almacenó a -20°C.

b) Evaluación del título de anticuerpo: Para seguir la evolución del título de los anticuerpos se realizaron ensayos de ELISA indirectos. Para esto se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con 200 ng del antígeno en solución de sensibilización (carbonato/bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,6). Estas placas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego de realizar lavados con PBS se bloquearon los sitios de interacción inespecífica con PBS-leche 4% y se incubaron durante 90 min a 37°C. Seguidamente se lavó con PBS-Tween 20 y se agregaron 100 µl de diluciones de los antisueros en una solución tampón de ELISA (PBS-Leche + 0,05% Tween 20). Se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Luego del lavado se adicionó a cada placa 100 µl de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa, diluidos

1/1500 en la misma solución reguladora y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente, luego del lavado con PBS-Tween 20 se llevó a cabo la reacción enzimática empleando una solución reveladora de TMB (Tetramethyl Benzidine, ZYMED) lista para usar. La incubación se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente. Si el título de anticuerpo es adecuado (obteniéndose una diferencia de por lo menos 2 órdenes entre la reacción de GST y GST-SMRT o GST-SRC-3) se procedió al sacrificio del conejo por decapitación. Se recogió la sangre y se la procesó para la obtención del antisuero correspondiente.

c) Purificación de los anticuerpos específicos: Se realizó una cromatografía de afinidad para IgG específicas de 5-8 ml del antisuero mediante el uso de una columna HiTrap NHS-Sefarosa activada (Amersham) a la cual se le acopló 10 mg del antígeno pertinente. A las fracciones de elusión se las concentró utilizando tubos de filtración forzada (Centricon, límite de paso 30 KDa, Millipore). La elusión de los anticuerpos se evaluó cuantitativamente por espectroscopia UV.

d) Caracterización de los anticuerpos generados por Western blot e IHQ.

Para caracterizar los anticuerpos producidos (anti-SMRT y anti-SRC-3) por Western blot, se obtuvieron extractos proteicos de útero, mama, próstata y cerebro de rata. Los homogenatos de proteínas se separaron por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio del 4-20% y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5% en PBS durante toda la noche a 4°C para prevenir uniones inespecíficas. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con TBST (TBST: solución tampón Tris con Tween) y se incubó con el anticuerpo anti-SMRT o anti-SRC-3 en TBST-leche 2% durante 1:30 h. Luego, la membrana se lavó con TBST y se incubó con anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo generado en cabra marcado con peroxidasa (Amersham), diluido 1/2500 en TBST-leche 2%. La membrana se lavó 3 veces con TBST y la reacción se visualizó utilizando DAB 0,5 mg/ml (Sigma) como sustrato de la enzima ligada al anticuerpo secundario.

Los anticuerpos generados fueron evaluados por IHQ en distintos tejidos de rata (mama, próstata, útero, cerebro). Para determinar la especificidad de la reacción IHQ se ensayaron muestras en las cuales el anticuerpo fue previamente incubado con el antígeno. Para investigar la expresión de estos coreguladores en nuestro experimento se empleó la técnica de IHQ previamente descrita (tabla 4). El anticuerpo **anti-SMRT** se utilizó diluido 1:50 y el **anti-SRC-3** 1:150. El sistema de revelado consistió en IgG de cabra anti-IgG de conejo biotinilada 1:200 seguido de estravidina-peroxidasa 1:150 y como cromógeno se usó DAB.

Cuantificación. La cuantificación de los mismos fue realizada por análisis de imágenes, evaluando la DOI de la expresión positiva en el compartimiento subepitelial como se describió en el punto anterior para los receptores de esteroides.

5.3- Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la fertilidad de la hembra

El segundo grupo de animales que habían sido tratados neonatalmente con xenoestrógenos (sección 5.2) y luego se los había dejado crecer hasta los 80 días de edad fueron destinados al estudio del efecto de lo xenoestrógenos sobre la fertilidad. Para ello, las hembras controles y tratadas con DES o BPA fueron puestas en jaulas con machos de la misma cepa y de fertilidad comprobada. Todas las mañana se procedía a hacer extendidos vaginales, en gota fresca, observando al microscopio óptico la presencia de espermatozoides como confirmación de la preñez del animal. Este día se consideraba el día 1 de la gestación. Las hembras que presentaron un extendido vaginal positivo para espermatozoides, fueron separadas de los machos, colocadas en jaulas individuales y sacrificadas entre el D18-D20 de gestación. Las hembras que no mostraban un extendido vaginal positivo se las mantuvo con el macho durante dos semanas consecutivas para aumentar al máximo la posibilidad de preñez. Se seleccionó entre el D18-D20 de gestación para sacrificar los animales debido a que en esta etapa se puede contar fácilmente el número de cuerpos lúteos (CL), reflejando el número de ovocitos ovulados, por visualización directa con una lupa esteroscópica (Leica Corp, Buffalo, NY).

Cuando la preñez fue confirmada, el número de CL fue determinado y al mismo tiempo se cuantificó el número de sitios de implantación los cuales fueron clasificados como fetos viables y sitios de reabsorción (embriones que han implantado y cuyo crecimiento no progresó o involucionó) (Figura 30).

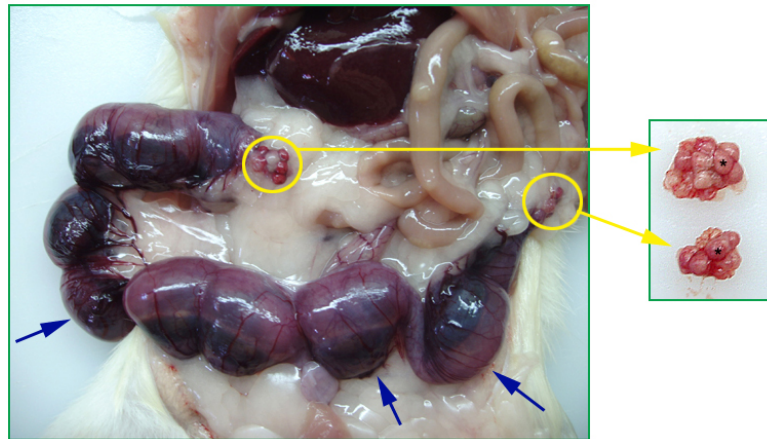


Figura 30: Fotografía del útero y ovarios de una rata preñada control en D18 de gestación. Se observan los ovarios (en círculos amarillos) y los cuernos uterinos con los fetos implantados (flechas azules). La foto de la derecha muestra a mayor aumento los ovarios en los cuales claramente se pueden visualizar los cuerpos lúteos (asterisco).

Los siguientes parámetros de fertilidad fueron evaluados en los diferentes grupos experimentales:

$$\text{Porcentaje de falla de preñez} = \frac{\text{número de hembras no preñadas} \times 100}{\text{número de hembras apareadas con machos}}$$

$$\text{Número de CL} = \text{CL del ovario derecho} + \text{CL del ovario izquierdo}$$

$$\text{Número de sitios de implantación} = \text{sitios de implantación sobre los 2 cuernos uterinos}$$

$$\text{Número de sitios de reabsorción} = \text{sitios (observados como cicatrices) sobre los cuernos uterinos, donde hubo implantación pero el embrión no se desarrolló}$$

Número de sitios en desarrollo = sitios sobre los cuernos uterinos donde el embrión se está desarrollando (n° sitios implantación – n° sitios de resorción)

6. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando análisis de variancia no paramétrico intergrupos de Kruskal-Wallis, seguido del post-test de Dunn para comparar cada grupo experimental con el grupo control. Para la comparación entre 2 grupos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney. Cuando fue necesario se utilizó el análisis de Pearson para realizar pruebas de correlación entre determinadas variables medidas (Siegel, 1956). En todos los casos un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

IV- RESULTADOS

CAPITULO I

Angiogénesis en el cérvix uterino de la rata durante la gestación

En esta primera parte de la tesis describimos los cambios vasculares experimentados por el cérvix uterino de la rata como respuesta fisiológica a las modificaciones celulares y tisulares durante la preñez.

1- Evaluación de parámetros angiogénicos

1.1- Proliferación endotelial

La incorporación de BrdU en las células endoteliales mostró un aumento significativo a medida que transcurre la preñez, sin encontrarse diferencias en la distribución de células endoteliales positivas para la marcación de BrdU entre los vasos que componen el estroma subepitelial y la región muscular del cérvix uterino (Figura 31 A).

1.2- Área vascular

Mediante la detección por IHQ del antígeno específico de células endoteliales (el factor de von Willebrand, FvW), se determinaron por análisis de imágenes dos áreas vasculares diferentes, las cuales se cuantificaron de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1.1 de materiales y métodos (M y M). Una de ellas, el *área vascular absoluta* (que evalúa el área total ocupada por vasos), aumentó significativamente durante la preñez, alcanzando los máximos valores antes del parto (Figura 31 B). Sin embargo, el *área vascular relativa* (que evalúa el área ocupada por vasos en relación al área total de la pared del cérvix), no mostró diferencias significativas entre los diferentes días de la gestación estudiados (Figura 31 C). Este resultado sugiere que el crecimiento del compartimento vascular se produjo en paralelo con el incremento tisular que experimenta el cérvix uterino a lo largo de la gestación.

1.3- Maduración vascular

El índice de maduración vascular (determinado por la detección IHQ de alfa actina de músculo liso en pericitos y en células musculares lisas de los vasos) mostró altos valores en el D12 de preñez, para luego disminuir

significativamente los D14 y D15. A partir de D18 y hasta el día del parto (D23) se observó un incremento en la proporción de vasos maduros (Figura 31 D).

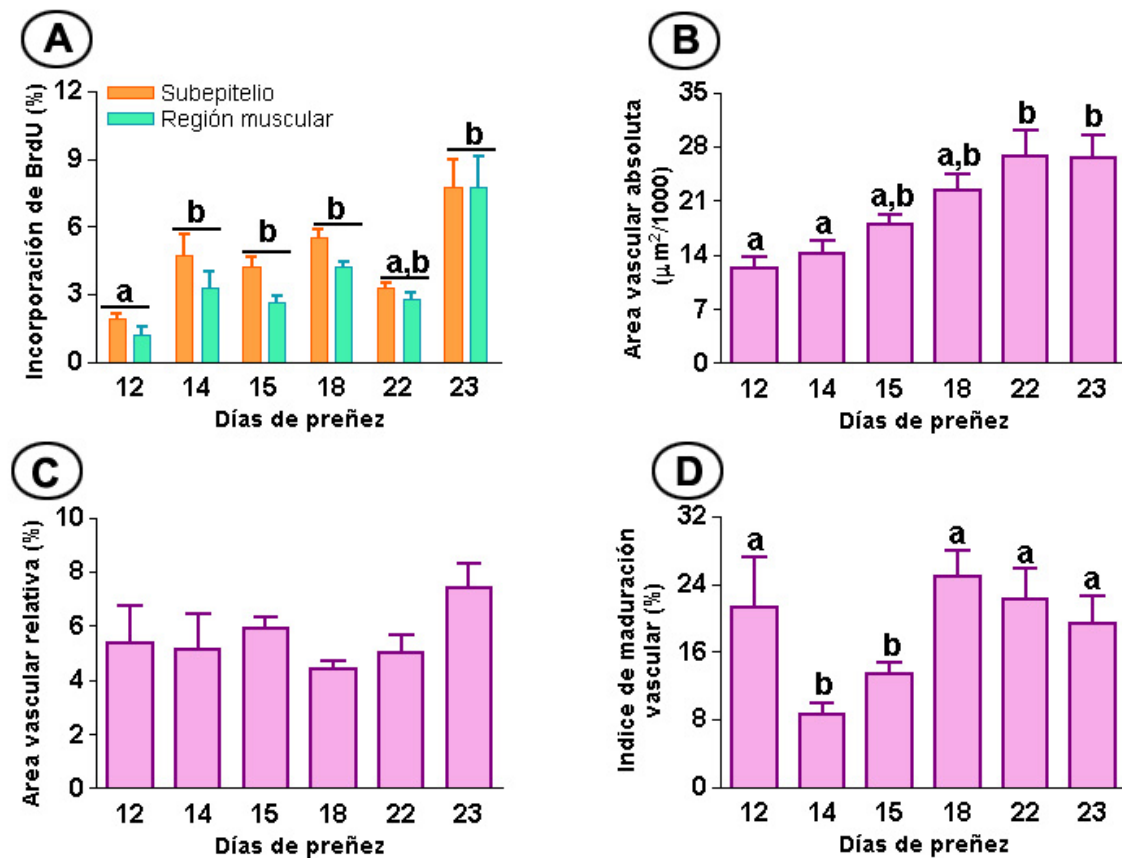


Figura 31: Parámetros angiogénicos en el cérvix uterino de la ratona durante la preñez. **(A)** Porcentaje de células endoteliales positivas para la detección BrdU en las células endoteliales del estroma subepitelial y la región muscular. **(B)** Área vascular absoluta, expresada como $\mu\text{m}^2 \times 1000$ y **(C)** área vascular relativa, expresada como porcentaje del área vascular respecto del área cervical total. **(D)** Cuantificación del índice de maduración vascular expresado como porcentaje de vasos maduros respecto del área vascular del cérvix uterino. Las barras representan valores promedio \pm el error estándar de 5-6 animales/día de preñez. Los valores promedio con diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

1.4- Expresión del VEGF

a) Determinación del ARNm de VEGF

De acuerdo a lo descrito en la sección 4.1.4 de M y M, la evaluación de la expresión del ARNm del VEGF se realizó por RT-PCR competitiva

usando oligonucleótidos específicos (Tabla 5 de M y M) que producen un producto de 320 pb y que también amplifican el ADN competidor dando un producto de aproximadamente 290 pb. La reproducibilidad y precisión de las diferentes amplificaciones de PCR competitiva fueron evaluadas por las pendientes y los r^2 resultantes de graficar la DOI del competidor/DOI del VEGF como función de la cantidad de competidor adicionada a la reacción. La ausencia de diferencias importantes en estos parámetros demostró la fortaleza de esta metodología para ser usada en el experimento (Figura 32).

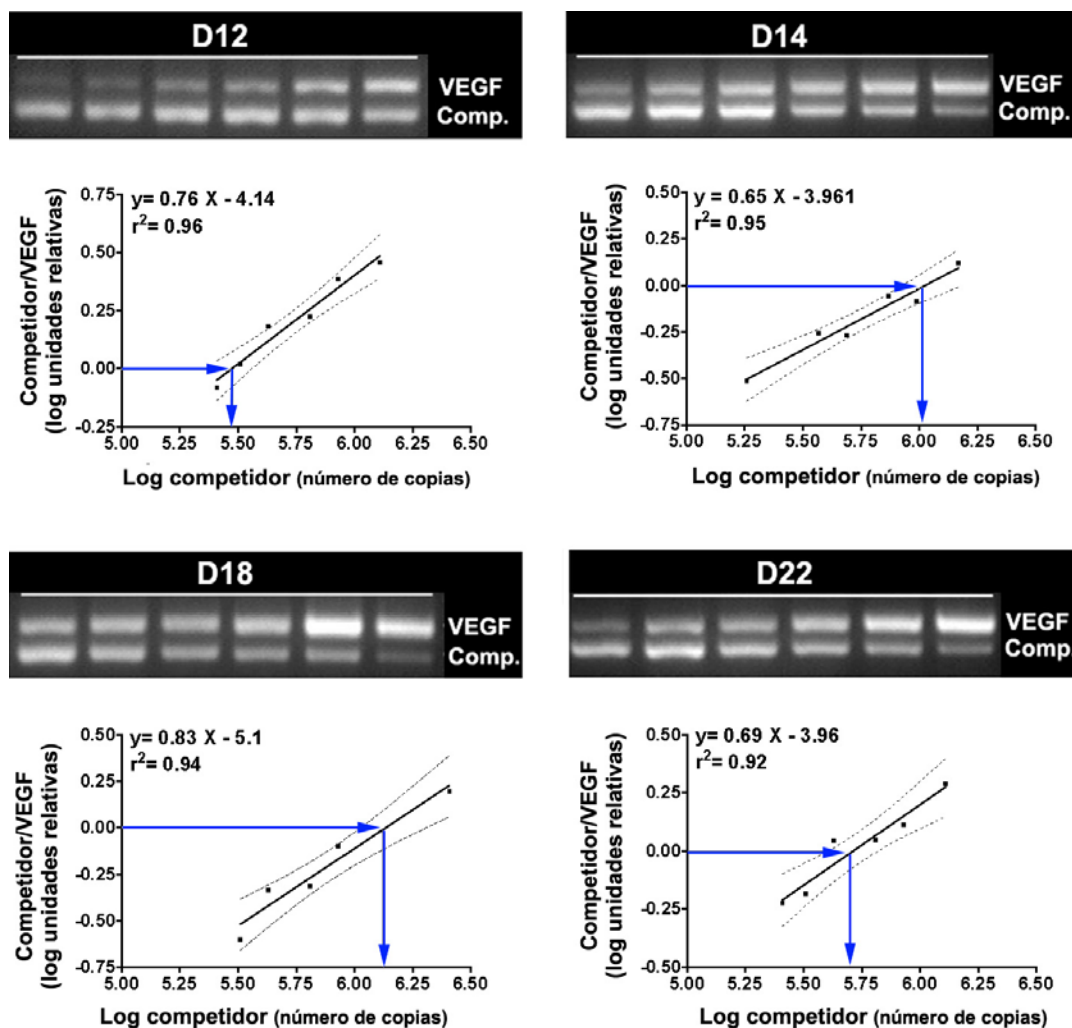


Figura 32: Transcripción reversa seguida de PCR competitiva del ARNm del VEGF en el cérvix uterino de la rata durante la preñez. Los productos de la PCR (ADN del VEGF en el cérvix uterino-VEGF- y ADN del competidor-comp.) son mostrados en los gels de agarosa representativo de cada día de la gestación estudiado. En las gráficas, las flechas indican el logaritmo del punto de equivalencia (definido como la relación entre la DOI del competidor y la del VEGF igual a 1) y los valores sobre el eje x marcan el correspondiente número de copia inicial del ARNm del VEGF.

Para los diferentes días de la gestación y para cada PCR competitiva realizada se determinó el número de copias iniciales del ARNm del VEGF. Los resultados mostraron que los niveles de expresión cambiaron significativamente durante la preñez siendo mayor en D14 y D18 comparado con D12 y D22 ($p < 0,05$; Figura 33).

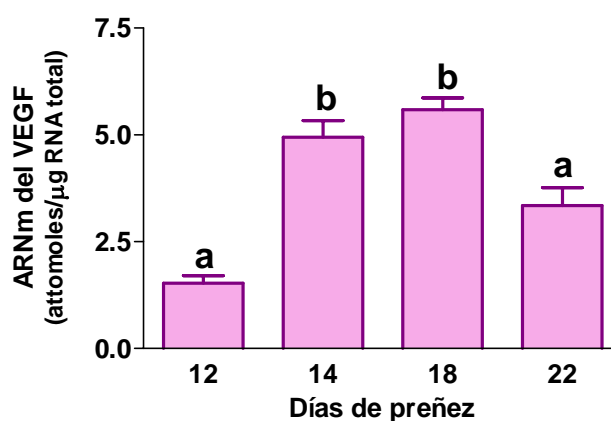


Figura 33: Cuantificación del ARNm del VEGF determinado por RT-PCR competitiva. Los valores son expresados como el promedio \pm el error estándar de 6 animales por grupo. Los valores promedios con diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

b) Determinación de las variantes de empalme alternativo del VEGF

Debido a que las diferentes variantes de empalme del ARNm del VEGF presentan diferencias funcionales, investigamos su expresión diferencial en el cérvix uterino durante la segunda mitad de la gestación. Observamos que el cérvix uterino expresó las variantes VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈ y que los niveles de expresión relativa de estos transcritos fueron: VEGF₁₆₄ > VEGF₁₈₈ > VEGF₁₂₀ (Figura 34). Además la contribución relativa de cada una de las variantes a la expresión total del ARNm VEGF no mostró cambios, sugiriendo que el mecanismo de empalme alternativo del ARNm del VEGF no se modificó durante la gestación.

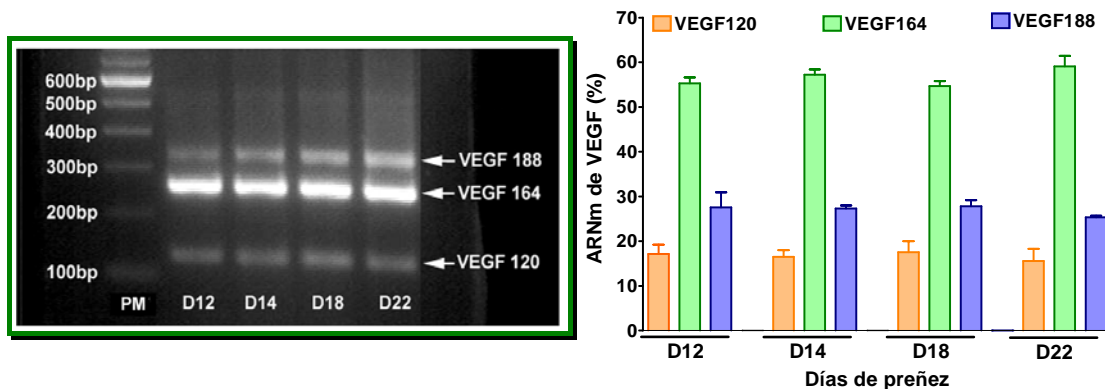


Figura 34: Análisis de las variantes de empalme del ARNm del VEGF en el cérvix uterino durante la preñez. La imagen de la izquierda muestra un gel representativo de los productos obtenidos por RT-PCR. Las bandas que se observan se corresponden con las tres principales variantes del VEGF: VEGF₁₂₀ (126 pb), VEGF₁₆₄ (258 pb) y VEGF₁₈₈ (330 pb). PM: patrón de peso molecular. La gráfica de la derecha se corresponde con la evaluación de la cantidad relativa de las variantes del ARNm del VEGF cuantificada por densitometría. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 6 animales por grupo.

1.4.1- Asociación entre proliferación endotelial y expresión del ARNm del VEGF

Debido a que es ampliamente conocido que el VEGF es el principal mediador de la angiogénesis y, más específicamente, de la proliferación de las células endoteliales, se analizó en forma conjunta los resultados obtenidos para estos dos parámetros en el cérvix uterino durante la gestación. Se observó que el patrón de proliferación endotelial en el cérvix uterino durante la preñez (Figura 35 A) presentaba un patrón temporal similar al observado para la expresión del ARNm del VEGF (Figura 35 B), con valores más altos en el D14 y D18 comparado con D12. Como consecuencia de esta observación se realizó un análisis de correlación entre dichas variables, confirmando una asociación positiva y significativa entre ellas (Figura 35 C).

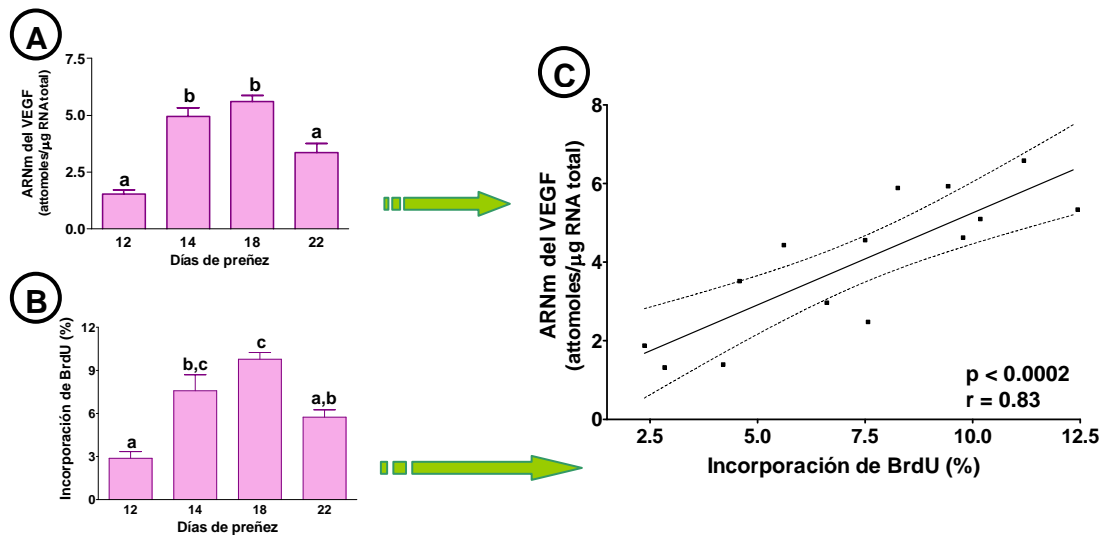


Figura 35: Proliferación endotelial y expresión del ARNm del VEGF durante la segunda mitad de la preñez. **(A)** Niveles de expresión del ARNm del VEGF, evaluados por RT-PCR competitiva, en diferentes días de la preñez. **(B)** Porcentaje de proliferación de células endoteliales determinada por la incorporación de BrdU en los D12, D14, D18 y D22 de gestación. **(C)** Gráfica de correlación entre los resultados presentados en las gráficas **(A)** y **(B)**. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 6 animales por grupo. Las letras diferentes indican diferencia significativa estadísticamente ($p < 0,05$)

2. Control de la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación

Los resultados presentados hasta el momento demuestran que en el cérvix uterino de la rata durante la gestación ocurren importantes cambios vasculares que reflejan la existencia de un proceso de angiogénesis, sin embargo, no se conoce cual/cuales son los mecanismos involucrados en su control. En este trabajo de tesis evaluamos dos posibles vías de control: una regulada por hormonas esteroides y otra regulada por mediadores químicos contenidos en los gránulos secretorios de células del sistema inmune.

2.1- Evaluación de los niveles séricos de E_2

Utilizando la metodología de radioinmunoensayos previamente descrita en la sección 4.2 de M y M se determinaron las concentraciones séricas de E_2 de animales preñados pertenecientes a nuestra colonia. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

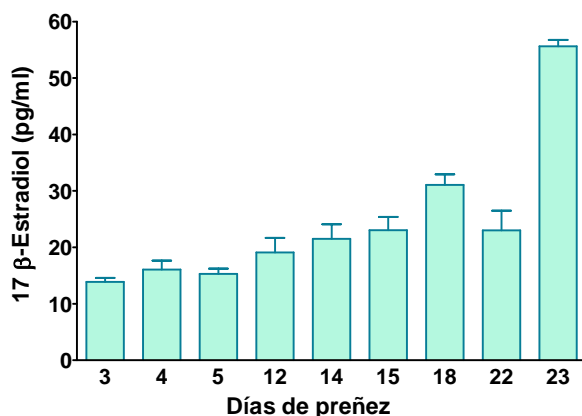


Figura 36: Determinación de los niveles séricos de E₂ durante la gestación evaluados por radioinmunoensayos. Las barras representan los valores promedios ± el error estándar de al menos 3 animales por grupo.

Conociendo que el gen del VEGF es regulado por E₂ consideramos si existe alguna asociación entre los niveles circulantes de esta hormona y la angiogénesis del cérvix uterino. Para ello se realizó un estudio de correlación entre:

- E₂ y la expresión del ARNm del VEGF (Figura 37 A)
- E₂ y la proliferación de las células endoteliales (Figura 37 B)

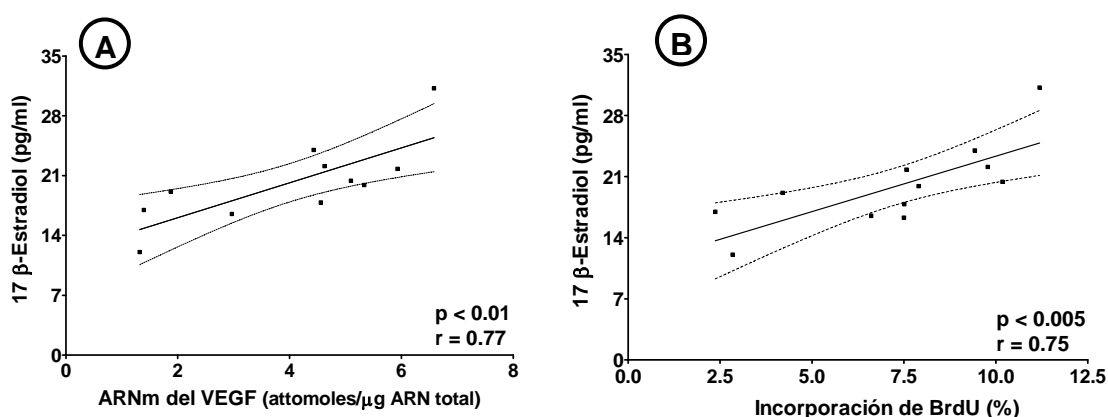


Figura 37: Estudios de correlación entre las concentraciones séricas de E₂ y la expresión del ARNm de VEGF **(A)** y la proliferación endotelial **(B)**. Los valores de $p < 0,05$ indican significancia estadística de los resultados.

Los resultados de estos análisis demostraron que los niveles séricos de E₂ se asociaron positivamente, tanto con la expresión del VEGF como con la proliferación endotelial. Lo que sugiere que el E₂ podría ser un importante modulador de la angiogénesis en el cérvix uterino.

2.2- Evaluación de células del sistema inmune

Otra posible vía de control de la angiogénesis cervical que estudiamos fue la regulación mediada por células del sistema inmune, y especialmente la participación de MC en este evento. Como primer paso se describió la cinética de infiltración de esta célula en el cérvix uterino de la rata en diferentes situaciones fisiológicas, para luego focalizarnos en evaluar su participación en la angiogénesis del cérvix uterino durante la preñez.

2.2.1- Densidad de MC

Conforme a lo descrito en M y M la inmunodetección de MC se realizó utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteasa I contenida en los gránulos de los MC (RMCP1). La evaluación se llevó a cabo en el estroma del cérvix uterino en las siguientes situaciones fisiológicas:

- Ciclo estral: No se observaron diferencias significativas en las densidades de MC presentes entre el diestro II (promedio \pm error estándar: $0,53 \pm 0,06$) y el estro (promedio \pm error estándar: $0,36 \pm 0,13$).

- Preñez: La Figura 38 muestra los resultados de la cuantificación de MC durante la gestación. Se observó una mayor densidad de MC durante la primera mitad de la gestación (D9 y D12), mientras que durante la segunda mitad de la preñez (D14-D22) la cantidad de MC disminuyó significativamente ($p < 0,05$). Además, una mayor proporción de MC mostrando signos de degranulación (evidenciados por halos citoplasmáticos o gránulos fuera de la célula) fueron observados frecuentemente durante la primera mitad de la preñez (D9: $98,2 \pm 1,4$ %; D12: $99,1 \pm 0,78$ %) comparado con la segunda mitad (D14: $91,8 \pm 1,8$ %; D22: $90,8 \pm 1,2$ %). Es importante resaltar la localización particular de estas células, que en general se ubicaron en zonas cercanas a los vasos sanguíneos del estroma cervical (Figura 38 B).

- Postparto: Después del parto la densidad de MC aumentó significativamente permaneciendo elevada durante los tres días evaluados, alcanzando valores similares a los observados en la primera mitad de la gestación.

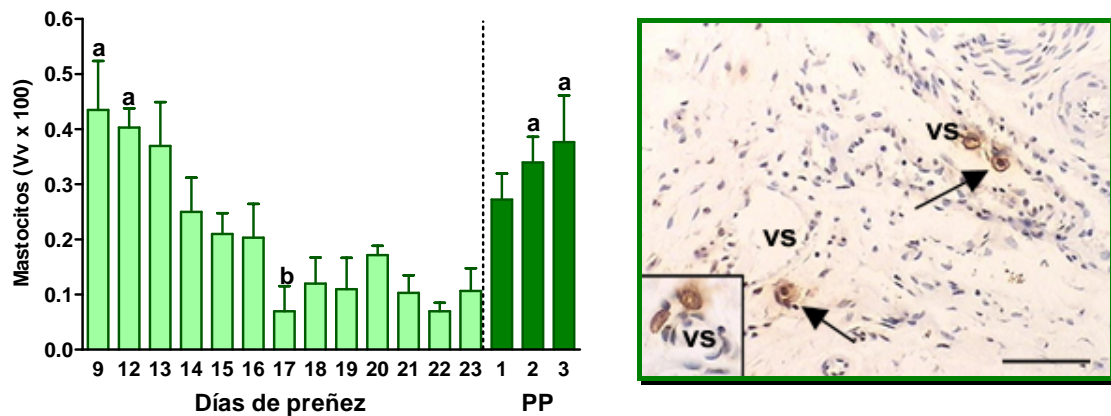


Figura 38: Distribución de MC en el estroma del cérvix uterino de la rata durante la preñez. **(A)** Cuantificación de la densidad de volumen (Vv x 100) de MC, observándose una disminución a medida que avanza la gestación y un aumento considerable luego del parto. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 5-6 animales por grupo. Las letras diferentes sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **(B)** Campo representativo mostrando la distribución de MC (flecha) en el D12 de gestación. La inserción muestra a mayor aumento la localización perivascular de los MC. Contracoloración con hematoxilina. vs: vasos sanguíneos. Escala: 25 μ m.

2.2.2- Participación de los MC en la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación

Con el objetivo de evaluar si los MC intervienen en el control del proceso de angiogénesis en el cérvix uterino durante la gestación se diseñó un experimento utilizando cromoglicato de sodio como estabilizador de la degranulación de éstas células. Sobre la base de los resultados presentados en el punto anterior, el tratamiento de inhibición de la degranulación de MC comenzó el D12 de gestación por dos razones: a) porque coincide con la mayor densidad de ésta célula en el cérvix uterino y b) para evitar posibles interferencias con el proceso de implantación del embrión. El protocolo experimental empleado fue descrito en la sección 4.3.2 de M y M. A todos los animales (tratados y controles) se les evaluó la ganancia de peso a lo largo de la gestación y el tamaño de las camadas al momento del sacrificio. No se observaron diferencias entre los grupos experimentales lo que nos permitió concluir que no habría signos de toxicidad aguda o crónica.

Para valorar la efectividad del tratamiento con cromoglicato de sodio se evaluó si los animales tratados presentaban cambios en la densidad de MC presentes en el cérvix o si se modificaba el porcentaje de MC degranulados.

2.2.2.1- Densidad de MC

Los animales tratados con el estabilizador de la degranulación de MC mostraron una distribución de MC idéntica a la de los animales controles, sin observarse cambios en la densidad de volumen (Tabla 9).

Tabla 9. Densidad de MC en el cérvix uterino

MC (Vvx100)	D14		D18		D22	
	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
	0,12±0,02	0,08±0,02	0,12±0,01	0,09±0,02	0,08±0,02	0,08±0,01

Los valores de la tabla se corresponden con valores promedios ± el error estándar de 5-6 animales por grupo

2.2.2.2- Porcentaje de MC degranulados

Debido a que no se observaron cambios en la densidad de MC presentes en el cérvix uterino durante el tratamiento con cromoglicato de sodio, a continuación evaluamos la efectividad del tratamiento cuantificando el porcentaje de MC degranulados y no degranulados. Para ello utilizamos el mismo anticuerpo empleado para evaluar la densidad celular de MC. Las evidencias usadas para definir MC degranulados fue la presencia de gránulos liberados del citoplasma al espacio pericelular y la presencia de halos citoplasmáticos en los MC. Los MC con gránulos densamente empaquetados se los consideró como no degranulados. Los resultados de esta cuantificación mostraron que las ratas preñadas tratadas con estabilizador de MC tenían más del 40% de MC no degranulados mientras que, por el contrario, los MC presentes en los animales controles en su mayoría presentaban signos de degranulación.

Tabla 10. Porcentaje de MC no degranulados

MC no Degranu- lados(%)	D14		D18		D22	
	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
	8,2±0,5	45,6±2,5*	6,4±0,9	43,4±1,8*	9,1±0,8	8,3±1,6

Los valores de la tabla se corresponden con valores promedios \pm el error estándar de 5-6 animales por grupo.

* indican que los valores de los grupos tratados son diferentes significativamente respecto de los animales controles ($p < 0,05$)

2.2.2.3- Determinación de los niveles séricos de E_2

Para descartar posibles efectos del tratamiento con cromoglicato de sodio sobre la síntesis y el metabolismo de E_2 se midieron por RIA sus niveles séricos en el D18 de preñez. Como se observa en la Figura 39 no hay diferencias significativas en las concentraciones de E_2 entre los animales tratados con el estabilizador de MC y los controles.

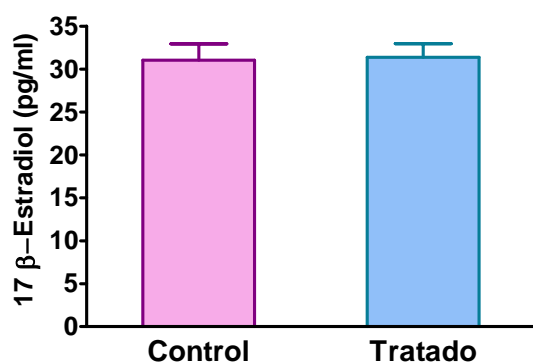


Figura 39: Niveles séricos de E_2 en el D18 de preñez de animales controles y tratados con cromoglicato de sodio. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 5-6 animales por grupo.

2.2.2.4- Evaluación de parámetros angiogénicos

Para conocer el efecto de la inhibición de la degranulación de MC sobre la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación se evaluó:

- proliferación de células endoteliales
- área vascular relativa
- maduración vascular
- expresión de VEGF

El tratamiento con cromoglicato de sodio desde el D12 al D14 de preñez no modificó la proliferación de las células endoteliales ni el área

vascular relativa en el D14, respecto del grupo control. Por el contrario, el índice de maduración vascular aumentó significativamente en comparación al grupo control, indicando una mayor proporción de vasos maduros (Tabla 11).

Tabla 11. Parámetros angiogénicos en D14

Proliferación endotelial (%)		Área vascular relativa (%)		Índice de maduración vascular	
Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
7,97±1,66	6,44±0,71	5,10±1,31	3,42±0,84	0,09±0,01	0,29±0,05*

Los valores de la tabla se corresponden con valores promedios \pm el error estándar de 5-6 animales por grupo

* indican que los valores de los grupos tratados son diferentes significativamente respecto de los animales controles ($p < 0,05$)

En el D18 y D22 se observó una caída significativa en el índice de células endoteliales en proliferación tanto en el compartimiento subepitelial como en la región muscular de la pared del cérvix uterino (Figura 40 A). El área vascular relativa también mostró una disminución significativa en los mismos días evaluados (Figura 40 B). Con respecto al índice de maduración de los vasos, los animales tratados con cromoglicato de sodio mostraron en el D18 y D22 una mayor área de alfa actina alrededor de los vasos sanguíneos en ambos compartimientos del estroma cervical, reflejando un mayor índice de maduración vascular en los grupos tratados con el estabilizador de MC (Figura 40 C).

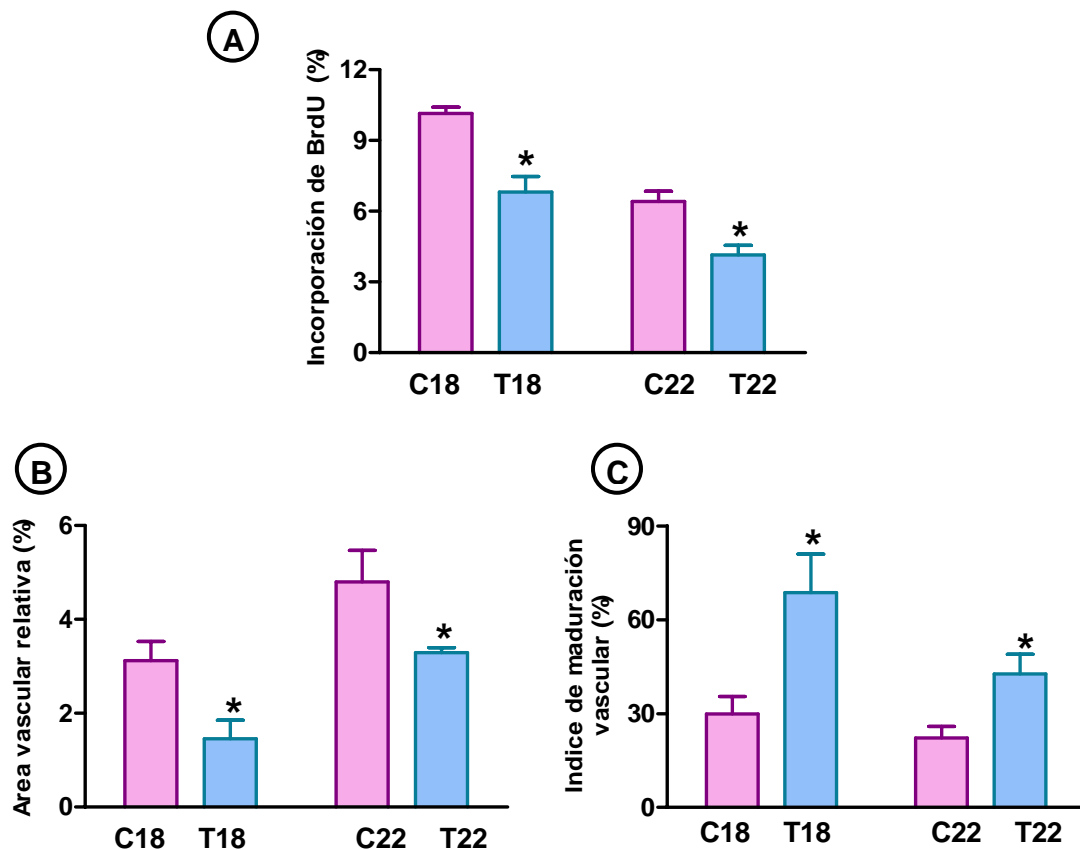


Figura 40: Determinación de parámetros vasculares en ratas controles (C) y tratadas con el estabilizador de MC (T) sacrificadas el D18 y el D22 de gestación. Los resultados mostraron que, en ambos días de preñez, el tratamiento con cromoglicato de sodio afectó significativamente la proliferación de las células endoteliales **(A)**, el área vascular relativa **(B)** y el índice de maduración vascular **(C)**. Las barras representan valores promedio \pm el error estándar de los grupos controles y grupos tratados con estabilizador de MC de 5-6 animales por grupo. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y tratados en el mismo día de preñez ($p < 0,05$).

Los resultados presentados hasta aquí indican que la inhibición de la degranulación de MC disminuyó la angiogénesis en el cérvix uterino de la rata durante la gestación. En base a esto y a que el VEGF está íntimamente asociado con la angiogénesis, nos hicimos la siguiente pregunta: ¿Los MC controlan la angiogénesis en el cérvix uterino por un camino dependiente del VEGF? Para responder a esta pregunta se evaluó la expresión del VEGF en los animales tratados con cromoglicato de sodio desde el D12 hasta el

D18 de gestación. Se determinó en el D18 la expresión del ARNm de VEGF (por RT-PCR competitiva), las variantes de empalme alternativo (por RT-PCR múltiple) y la proteína (por IHQ).

Los resultados demostraron que cuando se inhibió la degranulación de MC la expresión del ARNm del VEGF disminuyó significativamente (Figura 41 A), mientras que no se observaron cambios en el proceso de empalme alternativo del VEGF. Al igual que en el grupo control, la expresión de la variante VEGF₁₆₄ fue predominante respecto de las otras dos variantes de empalme expresadas en el cérvix uterino (Figura 41 B). En cuanto a la proteína del VEGF, la IHQ reveló una expresión citoplasmática intensa sobre el epitelio luminal, el endotelio y las células musculares lisas, mientras que no se detectó marcación en los MC. La expresión del VEGF fue más intensa en regiones del cérvix cercanas al útero, en cambio la región próxima a la vagina presentó una marcación más suave. Es interesante destacar que los animales tratados con cromoglicato de sodio mostraron una disminución en la expresión de la proteína del VEGF en las células epiteliales (Figura 41 C y D).

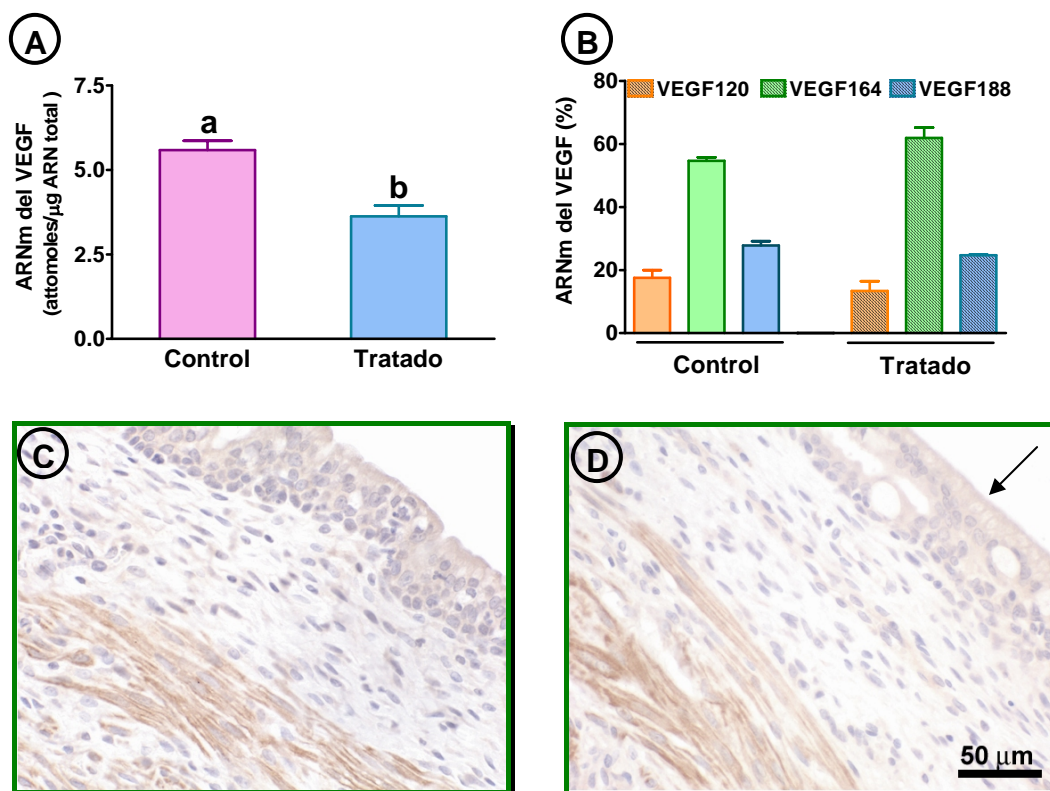


Figura 41: Niveles de expresión del VEGF en el cérvix uterino de animales

controles y tratados con cromoglicato de sodio, sacrificado en el D18 de gestación. **(A)** Expresión del ARNm del VEGF medido por RT-PCR competitiva. **(B)** Expresión de las variantes de empalme del ARNm del VEGF determinada por RT-PCR. Expresión de la proteína del VEGF evaluada por IHQ en animales controles **(C)** y tratados con el estabilizador de MC **(D)**. Los animales tratados con el inhibidor de la degranulación de MC mostraron una menor expresión del VEGF en las células epiteliales (flecha). Contracoloración con hematoxilina. C y D presentan la misma escala.

2.2.3- Densidad de macrófagos

Debido a que los macrófagos son también células vinculadas con la formación de vasos sanguíneos estudiamos su distribución tisular y asociación con los MC en el cérvix uterino. Se comenzó determinando su patrón de distribución temporal y espacial durante el ciclo estral, la preñez y los primeros días postparto. Para la identificación de macrófagos se usó el anticuerpo monoclonal ED1 que mostró un patrón de tinción granular dentro del citoplasma. La cuantificación se realizó en los mismos grupos experimentales que se le evaluó previamente la densidad de MC.

Independientemente del momento fisiológico en el que se evaluaron, la distribución tisular de los macrófagos fue similar. En general, se los observó en el subepitelio del cérvix uterino mostrando una distribución dispersa, mientras que en la región muscular eran escasos y se ubicaban en el tejido conectivo entre las fibras musculares. A continuación se detallan los resultados respecto a la densidad de éstas células en las diferentes situaciones estudiadas.

- Ciclo estral: No se observaron diferencias significativas en las densidades de macrófagos entre diestro II (promedio \pm error estándar: $2,62 \pm 0,74$) y estro (promedio \pm error estándar: $2,26 \pm 0,37$).

- Preñez: Se observó un incremento de la cantidad de macrófagos en el cérvix uterino hacia el final de la gestación, alcanzando los valores más altos antes del parto (D20 y D21) (Figura 42). Como dato interesante podemos señalar que los valores más altos observados durante la preñez (ie: previo al parto) fueron similares a las densidades observadas durante el

ciclo estral.

- Postparto: En los primeros días después del parto la densidad de macrófagos disminuyó a valores similares a los obtenidos en la primera mitad de la preñez (Figura 42).

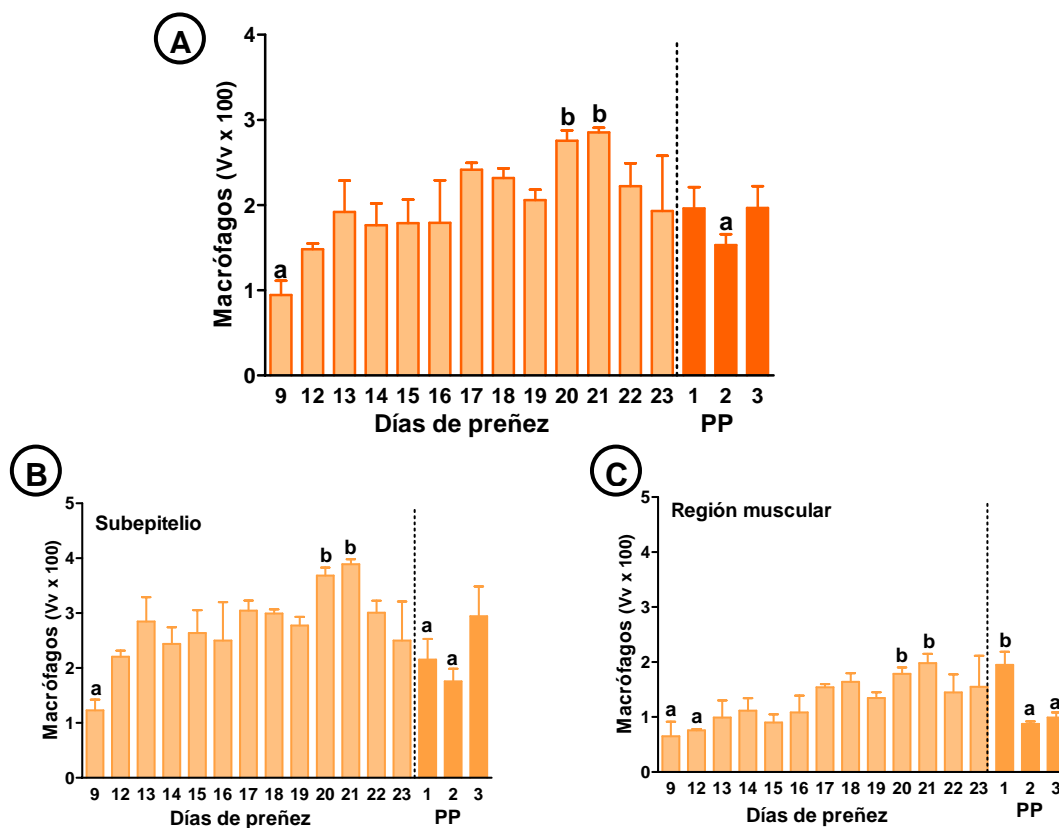


Figura 42: Distribución de macrófagos en el cérvix uterino a lo largo de la preñez y el postparto. Las densidades de macrófagos fueron cuantificadas como se definió previamente en la sección 4.3.3 de M y M. **(A)** En el tejido cervical se observó un incremento de la cantidad de macrófagos hacia el final de la preñez (D20 y D21) mientras que durante el postparto los valores de (Vv) disminuyeron. En la figura **(B)** y **(C)** se muestra diferencialmente la distribución de macrófagos en el compartimiento subepitelial y muscular de la pared del cérvix, siendo mayor la densidad en la región subepitelial. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 5-6 animales por grupo. Las letras diferentes sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

2.2.4- Asociación entre MC y macrófagos

Cuando se comparó el patrón de densidades de macrófagos y MC en el cérvix uterino durante la preñez se aprecia un patrón de cambio inverso a medida que nos acercamos al momento del parto. Para confirmar esta asociación se realizó un estudio de correlación entre ambas células, del cual resultó que la densidad de macrófagos se asoció significativa y negativamente con la densidad de MC ($r = -0,75$, $p < 0,005$, Figura 43). En función de este resultado nos preguntamos si existía alguna asociación entre ambas células y si la inhibición de la degranulación de MC afectaba el número de macrófagos presentes en el cérvix uterino.

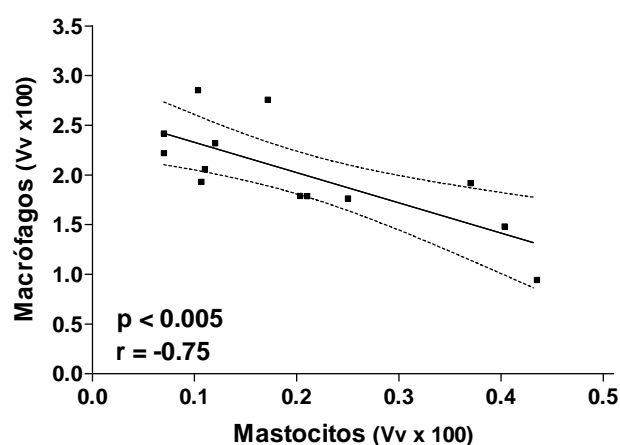


Figura 43: Estudio de correlación entre la densidad de MC y de macrófagos presentes en el cérvix uterino a lo largo de la preñez. El valor de $p < 0,005$ indican significancia estadística del resultado.

Para responder a este interrogante, se evaluó la densidad de macrófagos en los animales que fueron tratados con el estabilizador de MC. La cuantificación se realizó diferencialmente en cada compartimiento del estroma cervical. En el D14 y D22 se detectó un aumento de la densidad de macrófagos en la región muscular, mientras que en el D18 ambos compartimientos (subepitelio y músculo) mostraron un número mayor de macrófagos presentes en el cérvix uterino comparado con el grupo control (Figura 44). Estos resultados sugieren que la densidad de macrófagos en el cérvix uterino durante la preñez estaría modulada por la degranulación de MC.

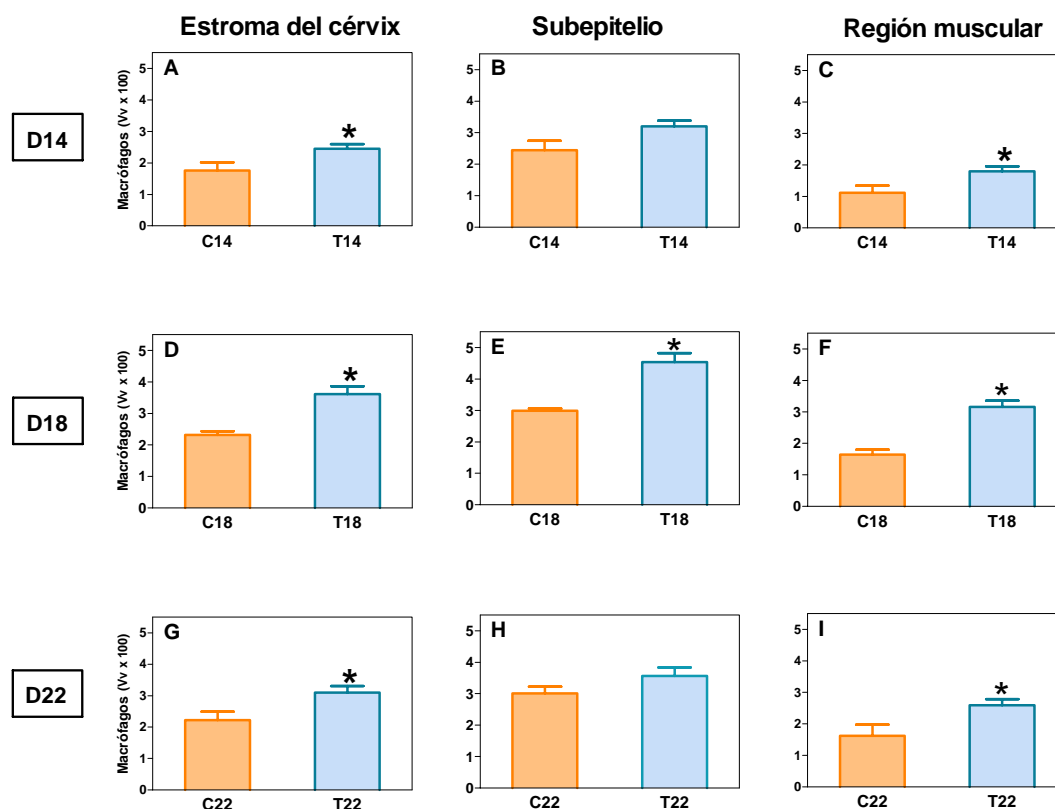


Figura 44: Densidad de macrófagos en el cérvix uterino en D14, D18 y D22 de preñez de ratas controles (C) y tratadas con el estabilizador de MC (T). La densidad de macrófagos se determinó en toda la pared del cérvix uterino (A, D, G) y diferencialmente en cada compartimiento estromal: subepitelio (B, E, H) y región muscular (C, F, I). Se observó que el tratamiento con cromoglicato de sodio aumentó la densidad de macrófagos en el cérvix uterino de la rata durante la preñez. Las barras representan valores promedio \pm el error estándar de los grupos controles (barras anaranjadas) y grupos tratados con estabilizador de MC (barras celestes) de 5-6 animales por grupo. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y tratados en el mismo día de preñez ($p < 0.05$).

Previamente describimos que, como consecuencia de la inhibición de la degranulación de MC, se observaba una angiogénesis disminuída en el cérvix uterino, ahora observamos que el tratamiento también se asocia con un aumento de macrófagos. Como se comentó en la introducción (sección

2.3.2), los macrófagos pueden activarse en respuesta a estímulos adecuados (tales como hipoxia) liberando citoquinas y factores de crecimiento angiogénicos. En base a todo esto sugerimos que el incremento en la densidad de macrófagos sería un mecanismo compensatorio y que frente a una angiogénesis disminuida (como consecuencia de la inhibición de la degranulación de MC) los macrófagos podrían expresar el VEGF. Por ello se realizó una IHQ para VEGF en secciones consecutivas de cérvix uterino de D18 de gestación. En una de las secciones se identificó a los macrófagos (usando el anticuerpo ED1) y en la otra se evaluó la expresión de la proteína del VEGF. Como ya se describió se observó inmunoreactividad contra la proteína del VEGF en el epitelio luminal, endotelio y músculo liso de la pared del cérvix. No se observó expresión del VEGF en los macrófagos, ni en las muestras de animales controles ni en las de los tratados con el estabilizador de MC (Figura 45).

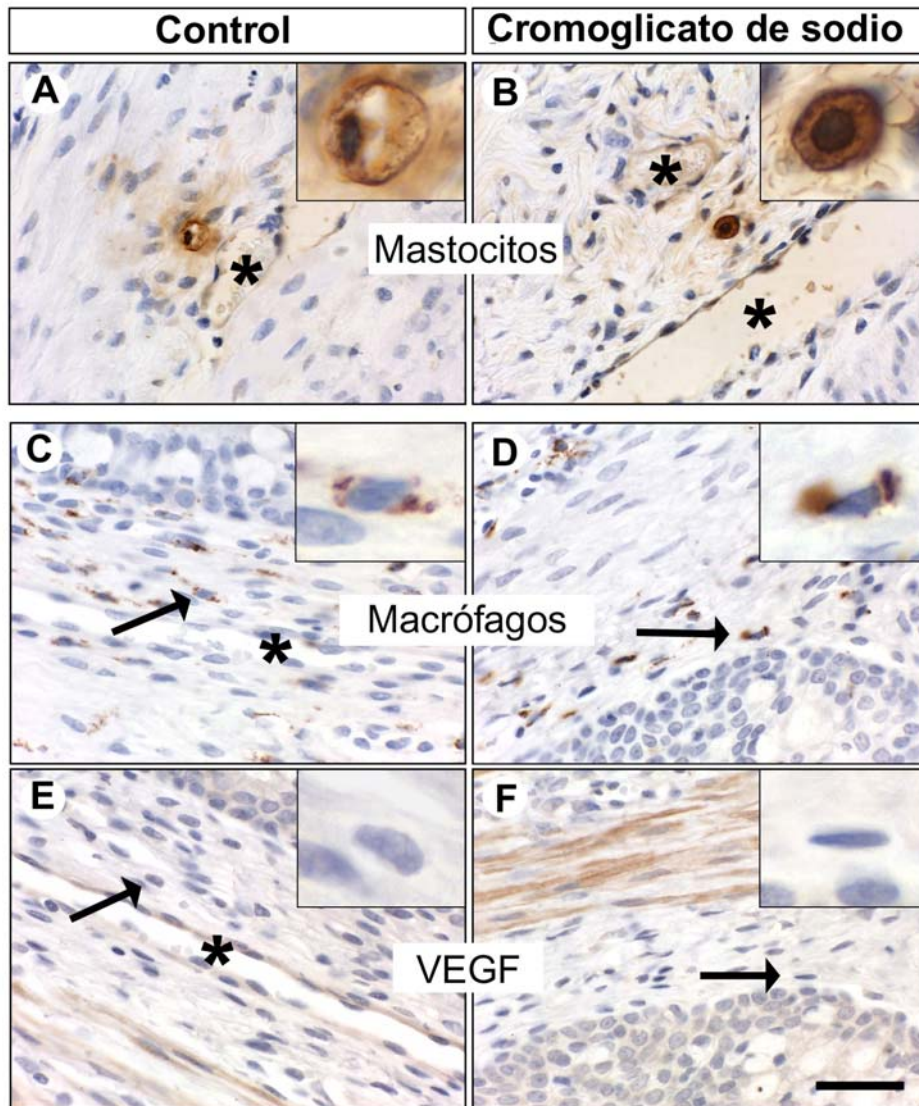


Figura 45: Fotomicrografía de secciones histológicas del cérvix uterino de rata en D18 de preñez. En el panel de la izquierda se representa el grupo control, mientras que en el panel de la derecha se presentan los resultados de animales tratados con cromoglicato de sodio. Los MC se localizaron alrededor de los vasos (asteriscos) en ambos grupos de animales (panel superior **A** y **B**). En los controles (**A**) los MC estaban principalmente degranulados, mientras que en los animales tratados con el cromoglicato de sodio (**B**) los MC presentaban gránulos citoplasmáticos inmunoteñidos. El resto de los paneles muestran secciones inmunomarcadas con anti-macrófagos (ED1) (**C**, **D**) o con anti-VEGF (**E**, **F**). Los macrófagos, identificados con el anticuerpo ED1 no mostraron inmunomarcación positiva para VEGF en secciones consecutivas. Las flechas identifican macrófagos en secciones consecutivas (**C**, **E**) y (**D**, **F**). Las inserciones recuadradas muestran células a mayor magnificación. Contracoloración con hematoxilina. La escala de la barra representa 50 μm .

CAPITULO II

Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la angiogénesis uterina en la rata adulta

En esta segunda parte del trabajo de tesis estudiamos si la exposición neonatal a xenoestrógenos (BPA y DES) afecta parámetros relacionados con la angiogénesis uterina durante la vida adulta de las ratas. Para ello utilizamos un modelo que imita los cambios hormonales (Eg y Pg) previo a la implantación del embrión. Se eligió ésta situación fisiológica debido a que durante este tiempo ocurren importantes cambios vasculares en el útero y además este es un evento clave para el éxito de la gestación.

3- Caracterización de un modelo que imita los efectos uterinos inducidos por las hormonas ováricas durante el periodo pre-implantatorio.

Se utilizó un modelo de rata ovariectomizada (OVX) en el cual no hay producción ovárica de hormonas esteroides de forma tal de eliminar la variabilidad de ciclado hormonal entre los grupos experimentales. Para reproducir algunos de los efectos de los cambios hormonales que ocurren en el periodo previo a la implantación, los animales OVX recibieron un tratamiento exógeno con Pg más Eg de acuerdo al diseño experimental descrito en M y M (sección 5.1).

El primer paso fue caracterizar el modelo mencionado, comparando ratas adultas OVX inyectadas con aceite de maíz (OVX) con animales inyectados con Pg más Eg (OVX-P+E). En estos grupos se evaluaron los siguientes parámetros relacionados con los eventos vasculares que tienen lugar en el útero previo a la implantación.

3.1- Área vascular ocupada por nestina

Se evaluó sobre el compartimiento subepitelial del útero el área ocupada por vasos sanguíneos que expresan nestina. La determinación se realizó por IHQ (sección 5.1.1, M y M) y se cuantificó por análisis de

imágenes. Los animales tratados con Pg más Eg presentaban una mayor área de vasos que expresan nestina, mientras que la inmunomarcación en los animales OVX la tinción fue significativamente menor (Figura 46).

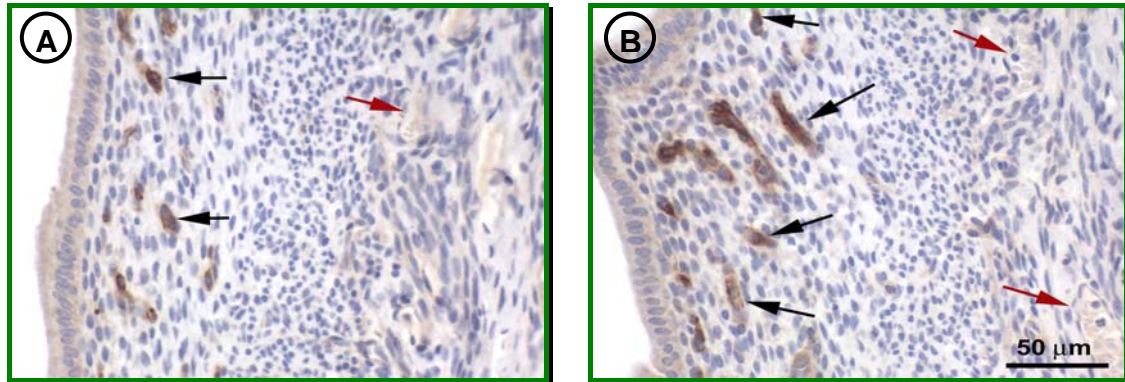


Figura 46: Fotomicrografía representativa de la expresión de nestina en los vasos sanguíneos del compartimiento subepitelial del útero. **(A)** Animales OVX tratados con vehículo y **(B)** OVX tratados con Pg más Eg. Se observó que el tratamiento con esteroides ováricos induce la expresión de nestina en las células endoteliales de la región subepitelial del útero. Las flechas negras muestran vasos positivos para nestina, mientras que las flechas rojas señalan células endoteliales que no expresan nestina. Contracoloración con hematoxilina.

3.2- Proliferación de células endoteliales

El desarrollo de un protocolo de doble IHQ (BrdU/Nestina) nos permitió distinguir la proliferación de las células endoteliales de la proliferación de células que componen el estroma subepitelial del útero. En los animales del grupo OVX, fue indetectable la incorporación de BrdU en las células endoteliales, mientras que después de la administración de Pg y Eg el porcentaje de células endoteliales proliferando aumentó significativamente (Figura 47).

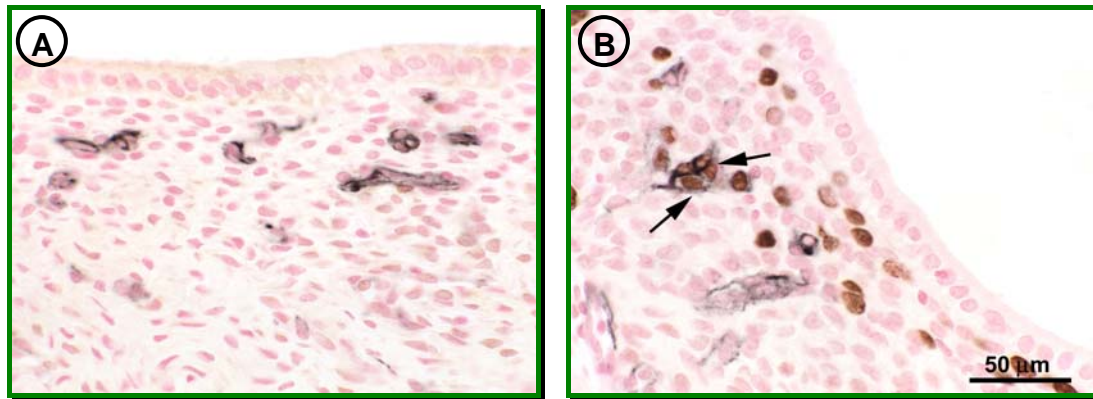


Figura 47: Fotomicrografías de dobles IHQ de células endoteliales proliferando en el estroma subepitelial del útero de animales OVX **(A)** y OVX-P+E **(B)**. Observe que el tratamiento con hormonas indujo proliferación endotelial. Las flechas señalan células endoteliales doblemente inmunomarcadas: positivas para nestina (color negro) y para la incorporación de BrdU (color marrón). Los núcleos negativos están contracolorados con *Nuclear Fast Red*.

3.3- Expresión del VEGF

La evaluación de la expresión del VEGF se realizó por PCR en tiempo real y por IHQ. Los ensayos de PCR revelaron que la expresión del ARNm del VEGF aumentó significativamente luego del tratamiento con Pg y Eg. En el mismo sentido que cambió la expresión del ARNm del VEGF se modificó la proteína medida por IHQ. En el grupo de animales OVX, la mayor expresión del VEGF fue restringida al epitelio glandular y luminal, mientras que el estroma subepitelial presentó baja expresión del VEGF (Figura 48 A). Como se puede observar en la Figura 48 B, la expresión del VEGF aumentó considerablemente en la región del estroma subepitelial luego del tratamiento con los esteroides ováricos. La expresión en el epitelio luminal y glandular no presentó diferencias entre los grupos experimentales (OVX y OVX-P+E).

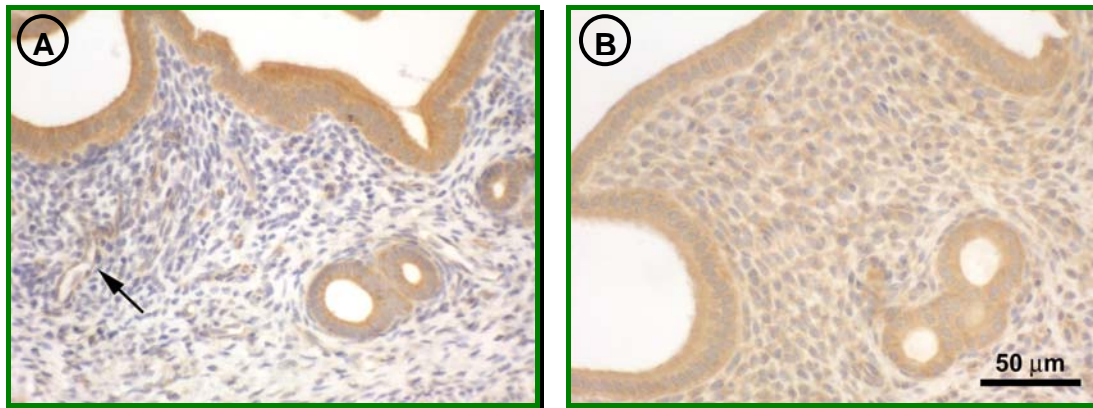


Figura 48: Expresión de la proteína del VEGF en el útero de rata adulta OVX y sometida a tratamiento hormonal. Fotomicrografía de la inmunomarcación en animales OVX **(A)** y OVX-P+E **(B)**. Se observó claramente un aumento en la expresión del VEGF en el estroma subepitelial del útero luego del tratamiento con esteroides ováricos. La flecha señala un vaso sanguíneo cuyas células endoteliales expresan dicho factor de crecimiento. Contracoloración con hematoxilina.

Los resultados hasta aquí presentados (área vascular expresando nestina, proliferación de células endoteliales y expresión del VEGF) mostraron que estos parámetros respondieron al tratamiento con Pg y Eg, sugiriendo que son eventos dependientes de estas hormonas.

4- Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre el proceso de angiogénesis uterino

Se usaron crías hembras expuestas los primeros días de vida a aceite de maíz, DES o BPA (BPA.05 y BPA 20), a los 80 días de edad fueron OVX y luego sometidas al tratamiento con Eg y Pg para simular los cambios uterinos del período pre-implantatorio. Se estudiaron parámetros histológicos, celulares y moleculares asociados con la respuesta al tratamiento hormonal, para conocer si la exposición neonatal a xenoestrógenos afecta la fisiología uterina a largo plazo.

4.1- Área vascular ocupada por nestina

El área de vasos sanguíneos positivos para nestina no se modificó entre los distintos grupos experimentales, demostrando que la inducción de

la expresión de nestina en las células endoteliales por el tratamiento con Pg y Eg no fue alterada por la exposición neonatal a xenoestrógenos (Figura 49). Teniendo en cuenta que la nestina es un marcador de células endoteliales con capacidad de proliferar, sugerimos que la ausencia de diferencias en el área de vasos ocupada por nestina entre los grupos experimentales refleja igual disponibilidad de células que pueden entrar en el ciclo de división celular y generar nuevos vasos sanguíneos.

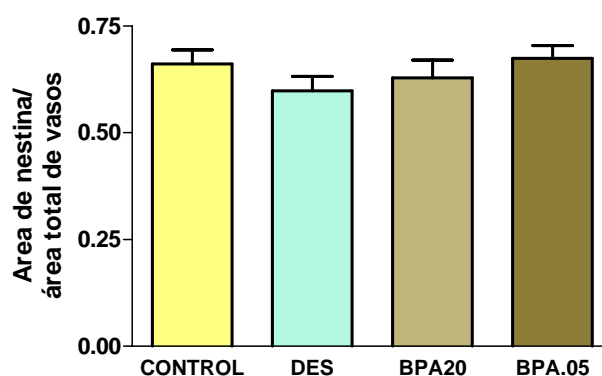


Figura 49: Área de vasos sanguíneos que expresan nestina en el estroma subepitelial del útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo.

4.2- Proliferación de células endoteliales

Para conocer la proporción de células endoteliales nestina positiva que efectivamente entran al ciclo de división celular, se evaluó la incorporación de BrdU por doble IHQ (BrdU/Nestina). Para ello, todos los animales fueron inyectados con BrdU 4 hs antes del sacrificio. Es interesante destacar que después del tratamiento con Pg y Eg la incorporación de BrdU en las células endoteliales (expresada como porcentaje) en los grupos expuestos neonatalmente a aceite de maíz (control) fue de $22,83 \pm 1,45$ mientras que en los expuestos a BPA.05, BPA20 y DES la proliferación endotelial fue de $16,9 \pm 2,05$; $17,8 \pm 1,16$; y $14,43 \pm 1,9$ respectivamente (Figura 50). El porcentaje de células endoteliales que incorporaron BrdU en el grupo de DES y las dos dosis de BPA disminuyó significativamente comparado con el control. Los resultados

demuestran que los perturbadores endocrinos afectaron la respuesta proliferativa hormonodependiente del endotelio vascular uterino.

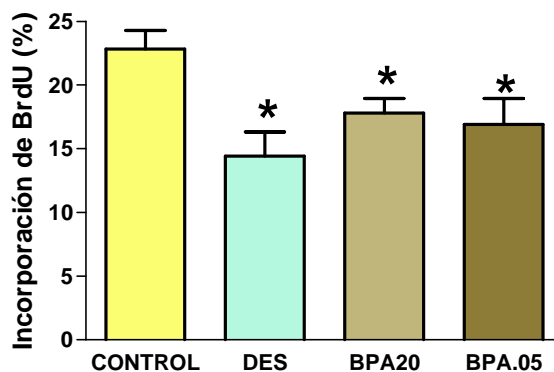


Figura 50: Proliferación de células endoteliales en el estroma subepitelial del útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos. Se puede observar que la exposición a DES y BPA disminuyó la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células endoteliales uterinas. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo. Los asteriscos sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas comparada con el grupo control ($p < 0,05$).

4.3- Expresión del VEGF

Con el objetivo de evaluar si la alteración en la proliferación de las células endoteliales en respuesta al tratamiento con Pg y Eg en los animales expuestos a xenoestrógenos podría estar asociada con cambios en la expresión del VEGF, se determinó su expresión tanto a nivel proteína (por IHQ) como a nivel de ARNm (por PCR en tiempo real).

La expresión IHQ del VEGF en la región subepitelial del útero disminuyó significativamente en los animales expuestos neonatalmente a DES o BPA.05, mientras que la exposición a la mayor dosis de BPA (BPA20) no presentó diferencias respecto al control (Figura 51).

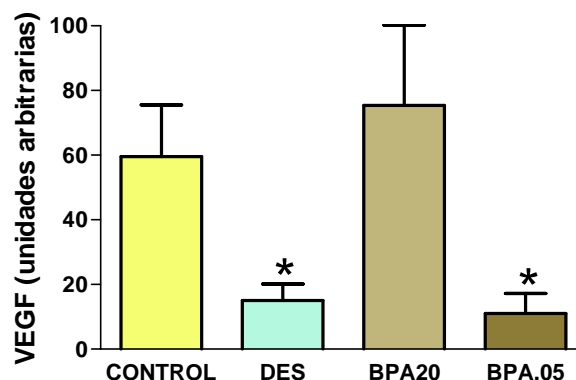


Figura 51: Cuantificación inmunohistoquímica del VEGF en la región subepitelial del útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo. Los asteriscos sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas comparada con el grupo control ($p < 0,05$)

El análisis de la expresión del ARNm de VEGF por PCR en tiempo real mostró que la inducción de la expresión del ARNm del VEGF por los esteroides ováricos fue significativamente atenuada en los animales expuestos a BPA o DES comparado con los expuestos al vehículo (Figura 52 A). En este sentido también examinamos las variantes de empalme alternativo del ARNm del VEGF por RT-PCR múltiple. Se detectaron las tres principales variantes descritas en la rata $VEGF_{120}$, $VEGF_{164}$, y $VEGF_{188}$ (Figura 52 B). Los niveles de expresión relativa de estos transcritos fueron: $VEGF_{164} > VEGF_{120} > VEGF_{188}$ y la contribución relativa de cada uno de ellos a la expresión total no se modificó entre los grupos experimentales, sugiriendo claramente que el mecanismo de empalme del ARNm del VEGF no se modificó por la exposición a perturbadores endocrinos.

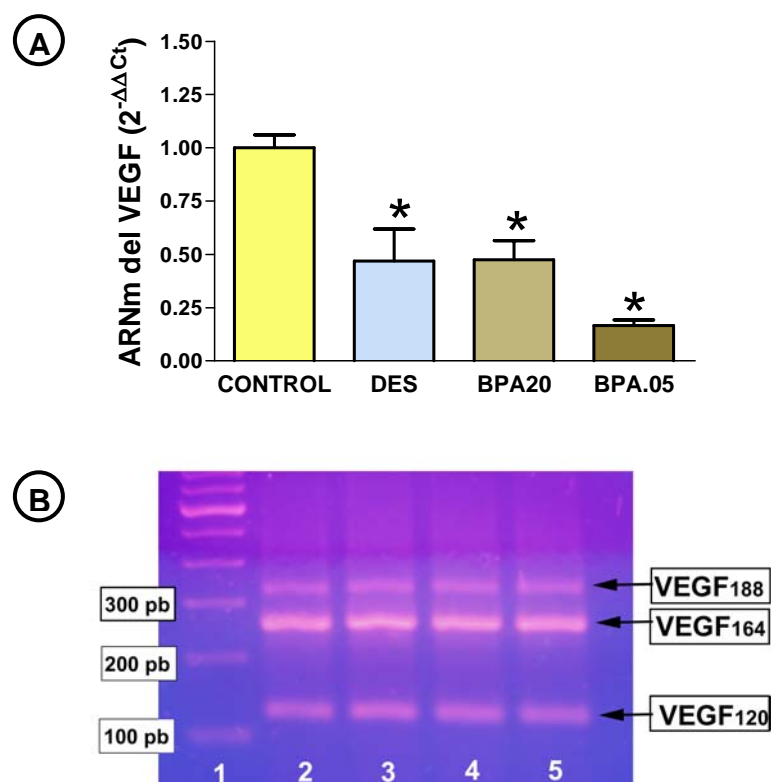


Figura 52: Expresión del ARNm del VEGF en el útero de ratas OVX-P+E y expuestas previamente a xenoestrógenos. **(A)** Cuantificación del ARNm del VEGF evaluado por PCR en tiempo real. Observe que los animales expuestos a DES y BPA fallaron en inducir la expresión del ARNm del VEGF luego del tratamiento con Pg más Eg. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo. Los asteriscos sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas con el control ($p < 0,05$). **(B)** Gel representativo de la RT-PCR de las variantes de empalme del ARNm de VEGF. Calles 1: patrón de peso molecular, calle 2: grupo control, calle 3: grupo expuesto a DES, calle 4: grupo BPA20 y calle 5: grupo expuesto a BPA.05.

Debido a que la falla en la expresión del ARNm total del VEGF observada en los animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos no se debería a un defecto en el procesamiento post-transcripcional, nos propusimos evaluar la regulación de la expresión del gen de VEGF. Para ello estudiamos la expresión de receptores de los esteroides ováricos y algunos coreguladores de su acción.

4.4- Expresión del receptor de estrógeno alfa (RE α)

La evaluación de este receptor se realizó por IHQ identificando su expresión en las células del estroma subepitelial y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos ubicados en la misma región. La cuantificación de la expresión del RE α se realizó por análisis de las imágenes digitalizadas determinando la DOI. Los animales expuestos a DES o a la menor dosis de BPA (BPA0.5) presentaron una menor expresión del ER α en las células estromales subepiteliales en comparación al control ($p < 0,05$; Figura 53 A-B, D), mientras que la exposición a BPA20 no presentó diferencias significativas con el control (Figura 53 A, C, D).

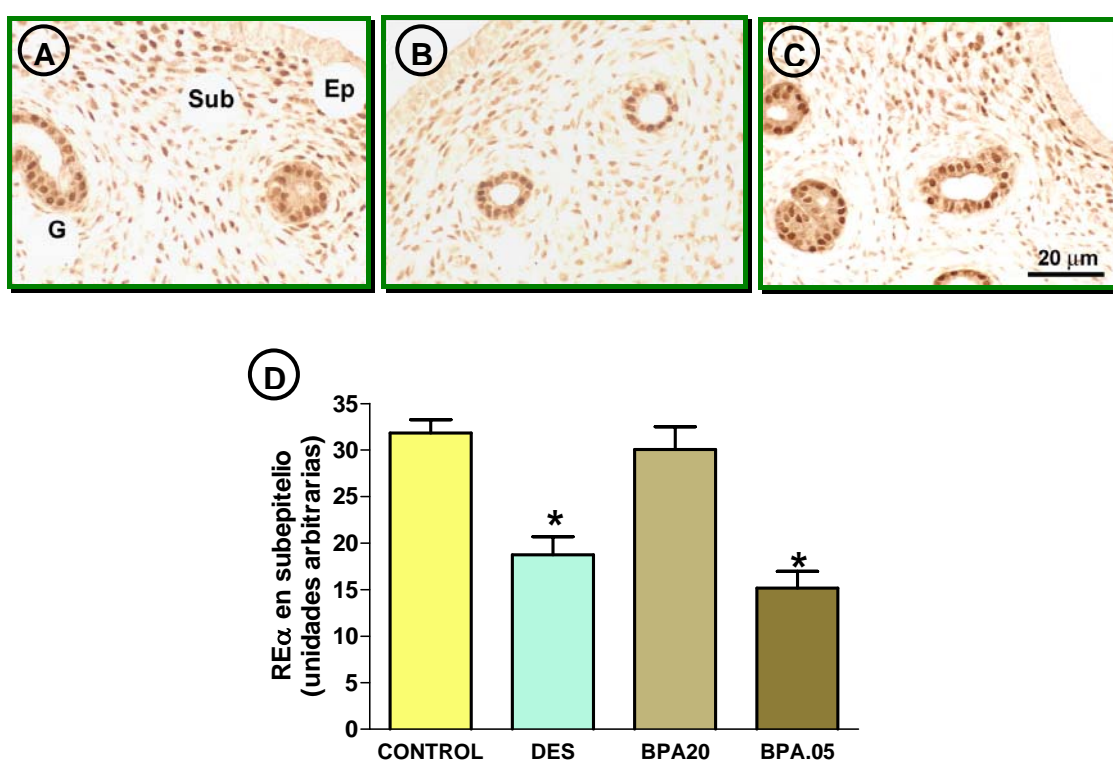


Figura 53: Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión del RE α en las células del estroma subepitelial del útero de ratas OVX tratadas con Pg más Eg. Las fotomicrográficas corresponden a secciones de tejido uterino inmunoteñidas para el RE α en (A) animales controles, (B) tratados con DES y (C) tratados con BPA20. Observé en los animales tratados con DES una menor expresión del RE α en el estroma subepitelial. Ep: epitelio, Sub: compartimiento subepitelial, G: glándulas uterinas. Las imágenes no presentan contracoloración. (D) Cuantificación del RE α en la región subepitelial del útero, evaluada por IHQ y cuantificada por densitometría. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo. Los asteriscos sobre las barras

representan diferencias estadísticamente significativas comparada con el grupo control ($p < 0,05$).

La determinación del RE α en las células endoteliales se realizó por doble IHQ (RE α /nestina) estableciendo el porcentaje de células endoteliales que expresaban nestina junto con el RE α . Se observó que la exposición a la menor dosis de BPA alteró la expresión del RE α sobre este compartimiento, disminuyendo significativamente su expresión respecto del control. Por el contrario, los animales expuestos neonatalmente a DES o BPA20 no presentaron cambios en la expresión del RE α en las células endoteliales luego del tratamiento con Pg más Eg en la vida adulta (Figura 54).

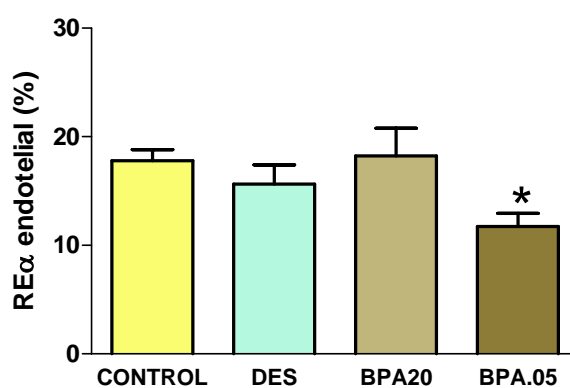


Figura 54: Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión del RE α en las células del compartimiento endotelial del estroma subepitelial del útero de ratas OVX tratadas con Pg más Eg. Se realizó doble IHQ evaluando el porcentaje de células endoteliales nestina positiva que expresan RE α . Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo. Los asteriscos sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas comparada con el grupo control ($p < 0,05$)

4.5- Expresión del receptor de progesterona (RP)

La expresión del RP se evaluó en los mismos compartimientos descriptos para el RE α . La determinación del receptor en la región subepitelial y en el endotelio vascular del útero no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los animales expuestos a BPA (BPA.05 y BPA20) y los controles. Los animales expuestos neonatalmente a DES

presentaron una menor expresión del RP en el estroma subepitelial, sin observarse diferencias en las células endoteliales (Figura 55).

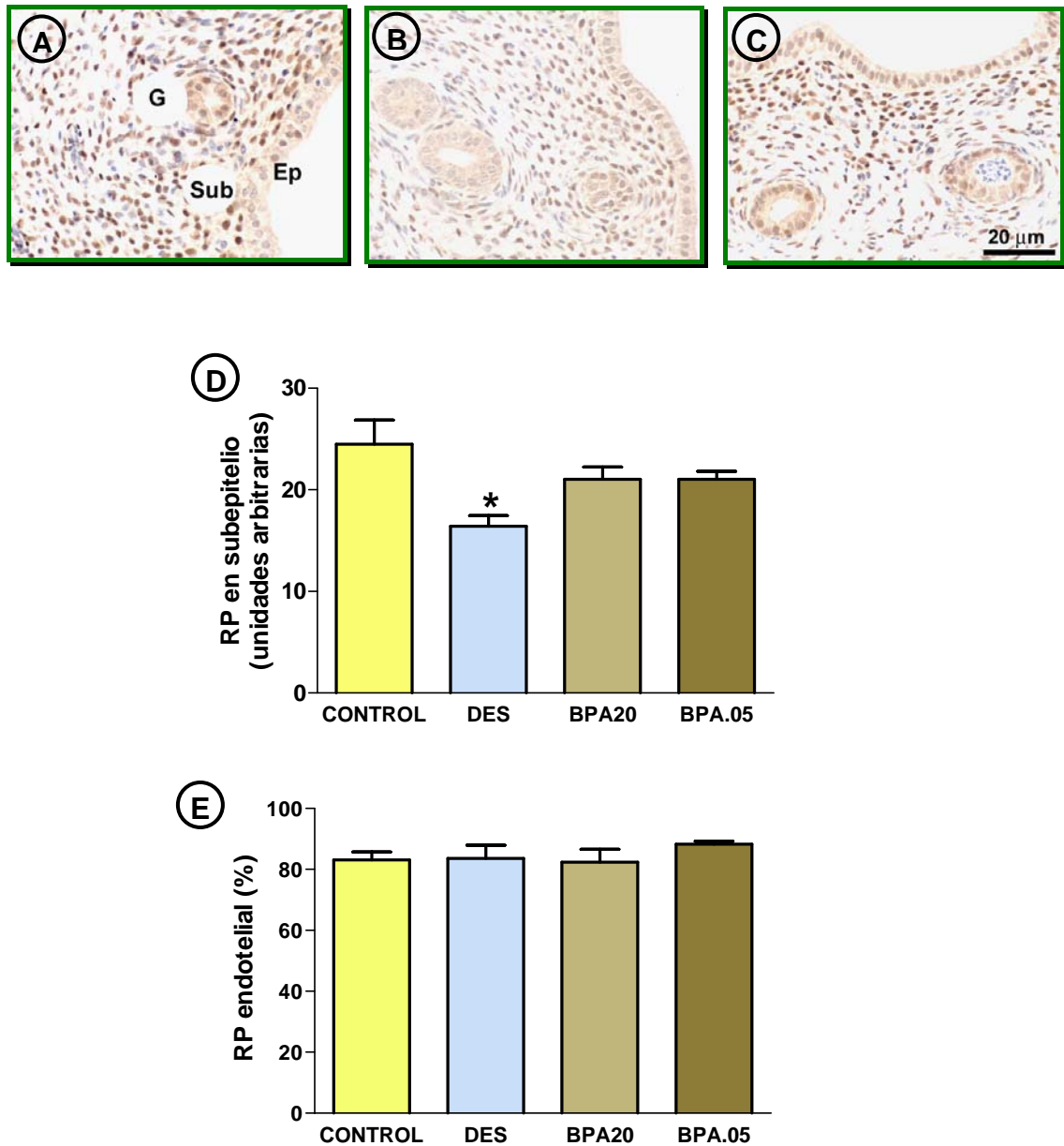


Figura 55: Evaluación de la expresión del RP en el estroma subepitelial y endotelio del útero de animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos. Las fotomicrografías corresponden a secciones de tejido uterino inmunoteñidas para el RP en (A) animales controles, (B) expuestas con DES o (C) con BPA20. Se observa una menor expresión del RP en el estroma subepitelial del útero de animales expuestos a DES respecto del control. Ep: epitelio, Sub: compartimiento subepitelial, G: glándulas uterinas. Contracoloración con hematoxilina. (D)

Expresión del RP en el compartimiento subepitelial. **(E)** Expresión del receptor en el compartimiento endotelial del estroma subepitelial, expresado como porcentaje de células endotelial positivas para nestina. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo. Los asteriscos sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas comparada con el grupo control ($p < 0,05$).

4.6- Generación de anticuerpos contra coreguladores de receptores esteroides

Obtención de antígenos recombinantes

Se expresaron en *E. coli JM109* las proteínas de fusión antigénica GST-SMRT y GST-SRC-3. Las mismas se purificaron por cromatografía de afinidad obteniéndose un alto grado de pureza (Figura 56).

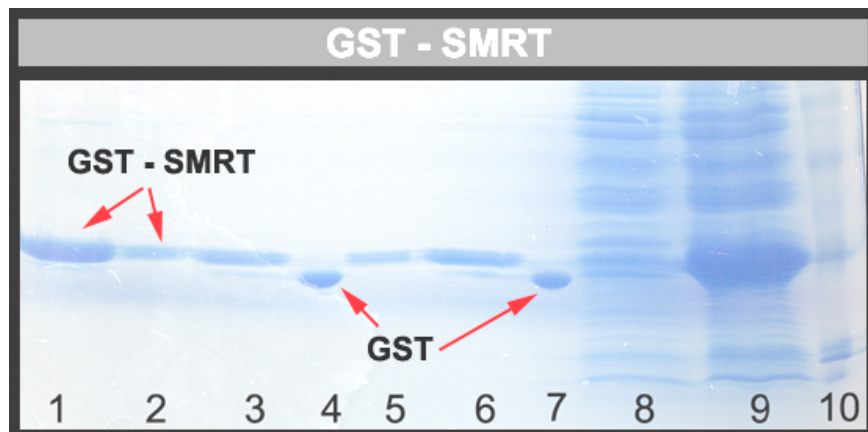


Figura 56: Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína de fusión GST-SMRT. Gel en gradiente de poliacrilamida de 5-20% que muestra bandas teñidas con coomassie blue, pertenecientes a la proteína purificada. Calles: 1-3 y 5-6: fracciones de elusión donde se puede observar que la proteína de interés se expresa mayoritariamente, 4 y 7: muestras controles de GST, calle 8: fracción no retenida en la cromatografía de afinidad, calle 9: lisado celular antes del proceso de purificación (observe que se expresa en gran medida nuestra proteína de interés), calle 10: patrón de peso molecular.

Los resultados obtenidos para la purificación de la proteína GST-SRC-3 fueron similares a los descritos para GST-SMRT. Se obtuvieron masas de proteína recombinante de $13 \pm 1,6$ mg (GST-SRC-3) y $15 \pm 0,4$ mg (GST-SMRT) cada 200 ml de cultivo en forma completamente soluble.

Caracterización de los anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales anti-SMRT y anti-SRC-3 fueron adecuados para la detección por IHQ de la expresión de SMRT y SRC-3 en diferentes tejidos (próstata, mama, útero y cerebro) incluidos en parafina. Los ensayos de IHQ usando el anticuerpo primario anti-SMRT demostraron tinción citoplasmática en las células epiteliales (Figura 57 A-C), mientras que la inmunomarcación en las células estromales uterinas y en las neuronas presentó una localización citoplasmática perinuclear y nuclear débil (Figura 57 C y D). Cuando el anticuerpo primario fue preincubado con el péptido que se usó como inmunógeno no se observó tinción específica (Figura 57 E y F).

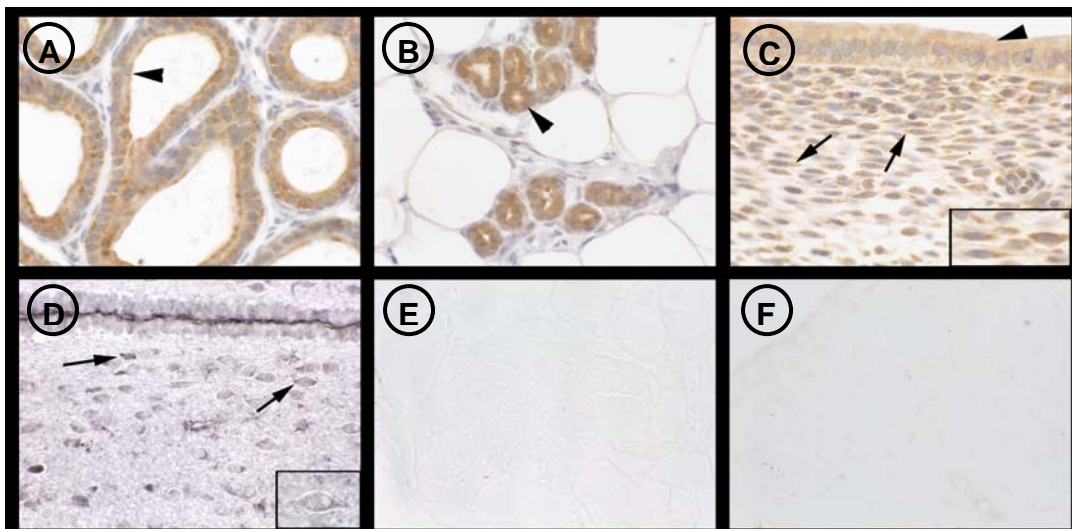


Figura 57: Caracterización por IHQ del anticuerpo anti-SMRT. **(A)** Próstata, **(B)** mama, **(C)** útero y **(D)** cerebro (área preóptica) de rata. Los ensayos de próstata, mama y útero fueron revelados con diaminobencidina (DAB) y contracolorados con hematoxilina. La biopsia de cerebro fue revelada con DAB intensificada con níquel. **(E)** y **(F)** son controles negativos para mama y útero respectivamente, en los cuales el anticuerpo primario fue preabsorbido con el péptido usado como inmunógeno en la generación del anticuerpo específico. Las puntas de flechas indican células epiteliales positiva y las flechas señalan marcación perinuclear positiva para anti-SMRT. Cada inserción muestra a mayor magnificación fotomicrografías de la inmunoreactividad positiva. Magnificación de las imágenes X600 y de los instes X1000.

Las evaluaciones de las reacciones inmunohistoquímicas realizadas en biopsias incluidas en parafina de los tejidos antes mencionados revelaron que el anticuerpo anti-SRC-3 presentó una clara tinción nuclear (Figura 58). Cuando el anticuerpo primario fue preincubado con el péptido que se usó como inmunógeno no se observó tinción específica (Figura 58 E y F).

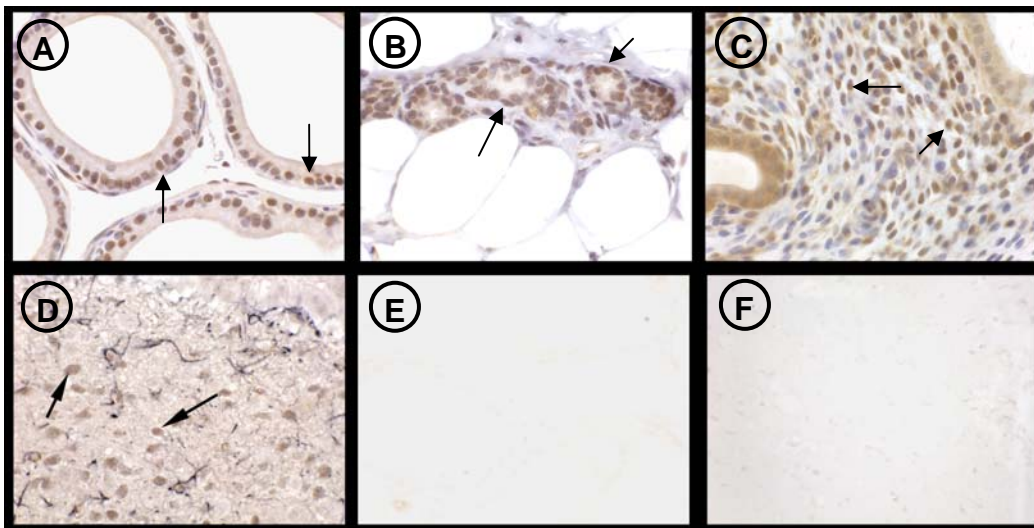


Figura 58: Caracterización por IHQ del anticuerpo anti-SRC-3. **(A)** Próstata, **(B)** mama, **(C)** útero y **(D)** cerebro (área preóptica) de rata. Los ensayos fueron revelados con DAB y contracolorados con hematoxilina. **(E)** y **(F)** son controles negativos para próstata y cerebro respectivamente, en los cuales el anticuerpo primario fue preabsorbido con el péptido usado como inmunógeno en la generación del anticuerpo específico. Las flechas señalan núcleos positivos para SRC-3. Magnificación de las imágenes X600.

4.6.1- Expresión de coreguladores de la acción de receptores esteroides

Para obtener más información sobre los factores que podrían explicar las modificaciones en respuesta al tratamiento con Pg y Eg que presentaron las hembras expuestas neonatalmente a xenoestrógenos, estudiamos la expresión de coreguladores de receptores nucleares. SRC-3 y SMRT se eligieron como miembros representativos de las familias de coactivadores y corepresores, respectivamente. La expresión de ambos coreguladores fue evaluada por IHQ.

En condiciones control, SRC-3 fue expresado en el núcleo de las células estromales subepiteliales, mientras que la inmunomarcación para SMRT fue citoplasmática (perinuclear) y nuclear débil (Figura 59 A y C).

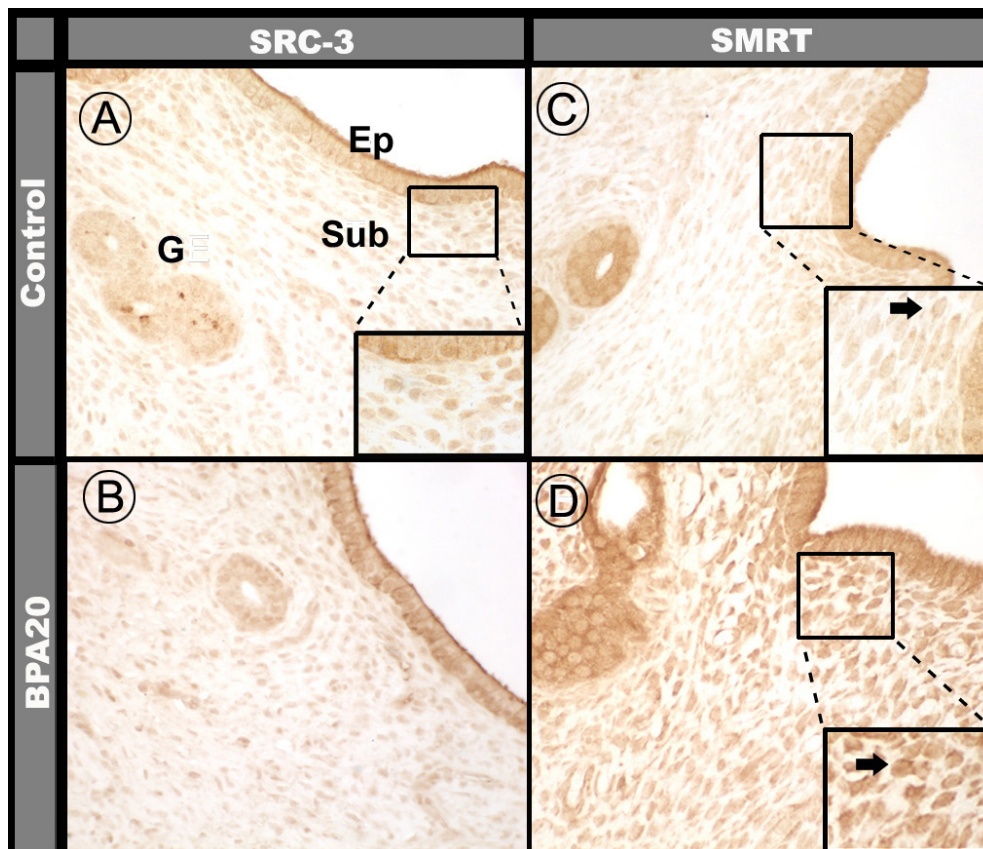


Figura 59: Localización inmunohistoquímica de coreguladores de receptores esteroideos en ratas expuestas neonatalmente a xenoestrógenos y luego sometidas al protocolo con Pg y Eg. Imágenes representativas de SRC-3 y SMRT en animales controles (A y C respectivamente) y en ratas expuestas durante la vida neonatal a BPA20 (B y D). Cada inserción muestra a mayor magnificación fotomicrográficas de la inmunoreactividad en el compartimiento subepitelial: las flechas están indicando marcación nuclear para SRC-3 y tinción nuclear/perinuclear (citoplasmática). Ep: epitelio luminal, Sub: compartimiento subepitelial, G: glándulas. Magnificación de las imágenes X400 y de los insets 1000X.

El patrón de distribución de la inmunomarcación de SMRT en el estroma subepitelial del útero no fue afectado por el tratamiento, pero sí se observó una mayor intensidad en la inmunomarcación en los animales expuestos neonatalmente a BPA.05 y BPA20 ($p < 0,05$) (Figura 59 y 60). Con

relación a la expresión de SRC-3 no se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales (Figura 59 y 60).

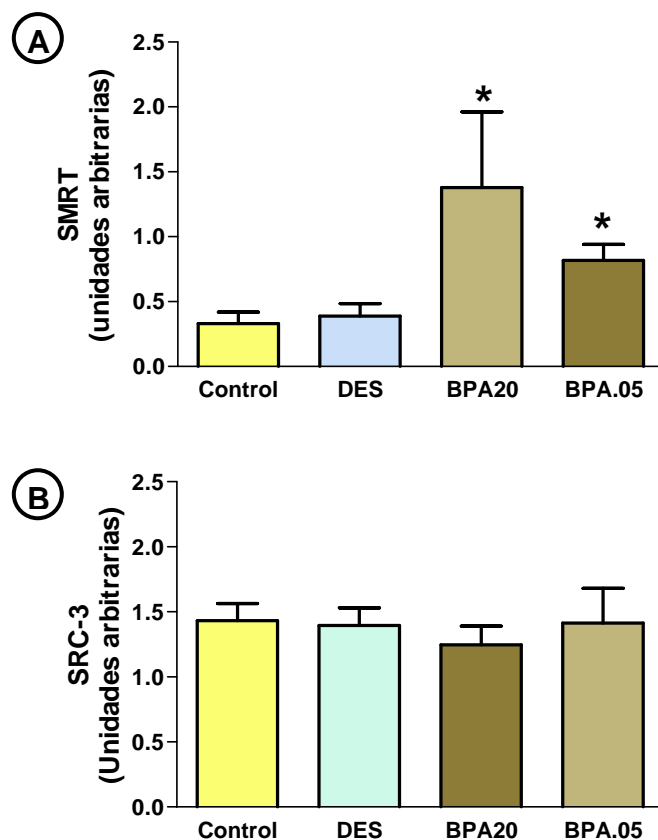


Figura 60: Cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de SMRT **(A)** y SRC-3 **(B)** en el compartimiento subepitelial del útero de ratas OVX tratadas con Pg más Eg y expuestas neonatalmente a xenoestrógenos. Un aumento significativo en la expresión del SMRT fue observada en las ratas expuestas a BPA20 y BPA.05. La expresión de SRC-3 no fue diferente entre los animales expuestos a xenoestrógenos. Las barras representan los valores promedios \pm el error estándar de 8-10 animales por grupo. Los asteriscos sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas comparada con el grupo control ($p < 0,05$).

5- Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la fertilidad de la hembra.

En base a los resultados obtenidos con el modelo de rata OVX-P+E expuesta neonatalmente a xenoestrógenos y reconociendo que el desarrollo del tracto reproductivo es sensible a perturbaciones endocrinas, a continuación estudiamos si la exposición a xenoestrógenos durante las etapas críticas de la diferenciación del tracto genital femenino afectaba la fertilidad de la hembra. Para evaluar esta hipótesis se utilizaron crías de

ratas hembras expuestas durante los primeros días de vida a los xenoestrógenos previamente estudiados: BPA en las dos dosis (BPA.05 y BPA20) y DES. Cuando fueron adultas los animales controles y los expuestos a xenoestrógenos se alojaron con machos de fertilidad comprobada durante 2 semanas para luego se evaluar una serie de parámetros relacionados con la eficiencia reproductiva.

Tabla 12. Parámetros relacionados con la preñez en hembras expuestas neonatalmente a xenoestrógenos

	Control	DES	BPA20	BPA.05
Número total de hembras	10	10	13	10
Número de hembras preñadas	10	7	10	9
Falla de preñez (%)	0	30	23	10

En las ratas expuestas neonatalmente a DES y a BPA20 se observó que un mayor porcentaje de hembras no quedaron preñadas (comprobado por la ausencia de sitios de implantación) (Tabla 12). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa posiblemente debido al bajo número de animales para este tipo de estudio. Además del porcentaje de hembras que quedaron preñadas también se evaluaron otra serie de parámetros relacionados con la eficiencia reproductiva: número de cuerpos lúteos, sitios de implatación, sitios de reabsorción y fetos en desarrollo.

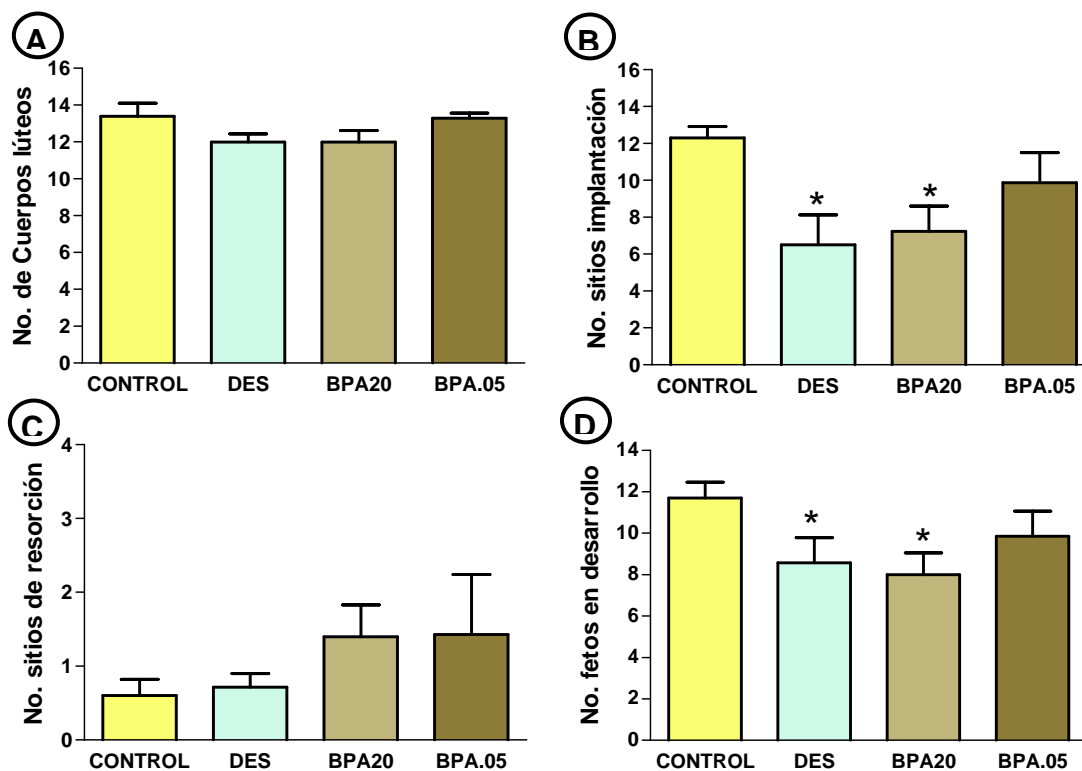


Figura 61: Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre parámetros relacionados con la fertilidad de la rata. **(A)** Número de cuerpos lúteos por hembra, **(B)** número de sitios de implantación en ambos cuernos uterinos, **(C)** número de sitios de implantación que presentan signos de reabsorción, y **(D)** número de fetos en desarrollo. Las barras representan valores promedios \pm error estándar, los asteriscos indican que los valores de los grupos tratados son diferentes significativamente respecto de los animales controles ($p < 0,05$).

Con relación al número de cuerpos lúteos no hubo cambios como resultado de la exposición neonatal a xenoestrógenos (Figura 61), esto indicaría que el tratamiento no afectó significativamente el número de ovulaciones. El otro resultado significativo fue que la exposición neonatal a xenoestrógenos disminuyó el número de sitios de implantación (independientemente de la viabilidad del embrión) en las ratas expuestas con la mayor dosis de BPA ($7,2 \pm 1,4$) y DES ($6,5 \pm 1,6$) comparado con el control ($12,4 \pm 0,6$) (Figuras 61 y 62). Esto permite sugerir que se estaría

produciendo una falla a nivel uterino que estaría afectando la implantación de los embriones. El número de fetos en desarrollo resultó ser menor en los animales expuestos a DES y BPA20 (DES: $8,6 \pm 1,2$; BPA20: 8 ± 1 ; control $11,7 \pm 0,7$) (Figura 61 y 62). También pudimos observar un aumento en el número de sitios de reabsorción en las ratas expuestas a ambas dosis de BPA (BPA20: $1,4 \pm 0,43$; BPA.05: $1,43 \pm 0,81$; control $0,6 \pm 0,22$), aunque esto fue una tendencia que no alcanzó a ser estadísticamente significativa (Figura 61 y 62).

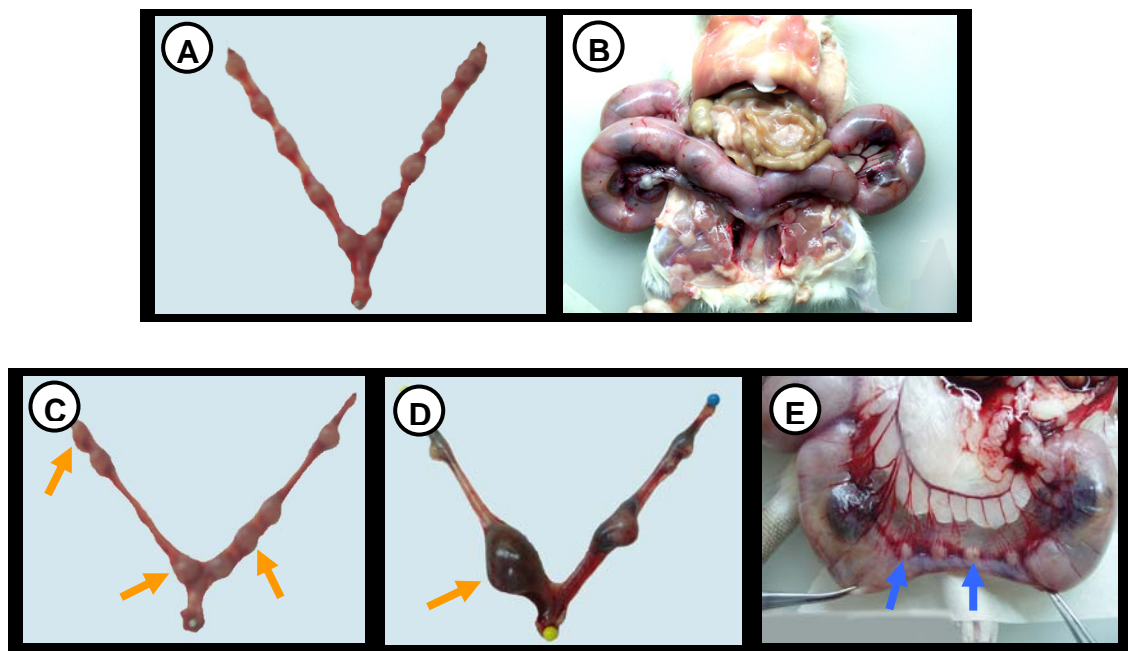


Figura 62: Efecto de la exposición neonatal a xenoestrógenos con relación al número de sitios de implantación y al desarrollo embrionario. **(A)** y **(B)** corresponden a úteros de animales controles en D14 y D22 de gestación. En las imágenes **(C-E)** se pueden observar los efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre el número de sitios de implantación y el desarrollo fetal. Útero de 14 **(C)** y 18 **(D)** días de gestación de hembras expuestas neonatalmente a BPA20. En ambos casos se observan pocos sitios de implantación (las flechas anaranjadas indican sitios normales de implantación) y un desarrollo embrionario asimétrico. **(E)** Hembras expuesta neonatalmente a la menor dosis de BPA en el cual se observa un alto número de sitios de reabsorción (4 sitios, flechas azules).

Los resultados presentados demuestran que la exposición neonatal a xenoestrógenos altera la eficiencia reproductiva de las hembras adultas a distintos niveles. Mientras que algunas hembras presentan un menor número de sitios de implantación otras fueron afectadas con la ausencia directamente de la preñez. Esta subfertilidad resultado de la exposición de las hembras a xenoestrógenos alerta sobre los riesgos de la exposición a perturbadores endocrinos.

V- DISCUSSION

Los mecanismos que controlan la gestación y el parto se caracterizan por una compleja serie de interacciones entre factores de origen materno y fetal, comprendiendo principalmente la nutrición del feto en crecimiento y las adaptaciones maternas para tal fin. En nuestro laboratorio, el estudio de las adaptaciones maternas para un parto normal, es una de las líneas de trabajo que se está desarrollando desde hace más de 15 años. Desde el año 1999 se ha incorporado una nueva línea de investigación relacionada con el estudio de los efectos de los perturbadores endocrinos sobre diferentes procesos fisiológicos, entre ellos los asociados al control de la preñez. Los resultados que presentamos en esta tesis se enmarcaron dentro de estas dos líneas de investigación. El estudio del proceso de angiogénesis y su regulación permite dilucidar los mecanismos fisiológicos que controlan los pronunciados cambios vasculares que ocurren durante la implantación, preñez y parto. El conocimiento actual indica que la cascada de eventos angiogénicos es un proceso complejo que incluye interacciones célula-célula, diferentes caminos de señalización intracelular y un microambiente extracelular y hormonal apropiado. Estos mecanismos pueden verse afectados por la exposición a químicos con acción hormonal (s.: perturbadores endocrinos, xenoestrógenos, estrógenos ambientales) y finalmente traducirse en alteraciones del tracto reproductor femenino afectando la eficiencia reproductiva.

1- La angiogénesis del cérvix uterino como adaptación fisiológica durante la preñez

La gestación es una condición fisiológica durante la cual el organismo materno presenta adaptaciones con el propósito de brindarle al embrión las condiciones óptimas para su normal desarrollo. Durante este periodo se inducen en la madre notorias modificaciones sin afectar la salud materna. Entre las adaptaciones del tracto reproductor el cérvix uterino posee un papel importante tanto en el mantenimiento de la preñez como en la iniciación y desarrollo del parto (Clark y col. 2006).

La interpretación de los complejos mecanismos moleculares relacionados con la función dinámica del cérvix uterino, es un problema básico en la fisiología de la gestación y el parto. Durante la preñez, una

extensa remodelación tisular involucra tanto a la matriz extracelular como a las células del tejido cervical. Los compartimientos extracelulares y celulares deben adaptarse durante periodos cortos a las nuevas demandas funcionales impuestas por la gestación y el parto, para luego reorganizarse rápidamente durante el periodo del postparto. La matriz extracelular es susceptible a profundas modificaciones, tales como una amplia remodelación del colágeno,

cambios en el metabolismo de proteoglicanos, infiltración de polimorfonucleares y edema (Luque y col. 1998, Ludmir y Sehdev 2000, Ramos y col. 2000). Previamente demostramos una respuesta diferencial a señales que modulan la proliferación y apoptosis en el cérvix uterino durante la gestación de acuerdo al compartimiento celular evaluado. Si bien, el epitelio del cérvix es la región con mayor recambio celular, el estroma fibroblástico y muscular son dos regiones activas que tienen su propio patrón de comportamiento. Los receptores de esteroides ováricos ($RE\alpha$ y RP) en el cérvix uterino también poseen patrones de expresión que son característicos de cada situación fisiológica (Ramos y col. 2002). Estas modificaciones son parte de las adaptaciones maternas que permiten que el cérvix uterino pueda dilatarse para permitir un parto normal.

En su mayoría, las modificaciones anteriormente comentadas son muy demandantes de nutrientes y energía. A pesar de esto último, el conocimiento del compartimiento vascular del cérvix uterino durante la gestación y el parto es aún incipiente. Es por ello que parte del trabajo de esta tesis consistió en estudiar dicho compartimiento cervical describiendo en detalle los cambios experimentados durante la preñez. Los resultados que obtuvimos demostraron que el área vascular absoluta del cérvix uterino mostró un incremento sostenido durante la segunda mitad de la preñez, alcanzando valores más altos alrededor del parto. Sin embargo, cuando se evaluó el área vascular relativa del cérvix uterino no hubo modificaciones durante la gestación. La ausencia de cambios en éste último parámetro podría explicarse por el aumento significativo en el volumen cervical durante la preñez, debido principalmente a la formación de edema, desorganización de las fibras de colágeno y proliferación de células fibroblásticas (Sherwood 1994, Leppert 1998, Ramos y col. 2002), y a que

el aumento del área vascular acompaña al rápido crecimiento del cérvix durante la preñez.

La formación de nuevos vasos comienza con la degradación de la membrana basal por proteasas celulares, permitiendo que la célula endotelial penetre y migre dentro de la matriz extracelular para luego proliferar (Griffioen y Molema 2000). La proliferación de las células endoteliales la evaluamos durante la gestación demostrando que, en asociación con el aumento del área vascular, el compartimiento endotelial de la región subepitelial y de la región muscular del cérvix uterino presentó un alto índice de proliferación. Además, conociendo que el desarrollo de un sistema vascular funcional necesita que las células endoteliales adquieran una configuración tubular de vasos maduros estructuralmente estables y funcionalmente adaptables, se determinó la expresión de alfa actina de músculo liso como marcador de las células que componen la pared de los vasos sanguíneos (pericitos o células musculares lisas vasculares) (Jain 2003). Los resultados demostraron que el índice de maduración vascular disminuyó significativamente durante los días 14 y 15 de gestación. Posteriormente desde el día 18 hasta el parto se observó una alta proporción de vasos maduros. En relación a estas modificaciones es interesante destacar que la disminución de la proporción de vasos maduros en el día 14-15 de gestación coincide temporalmente con el aumento en la proliferación de las células endoteliales y con el aumento del área vascular en el cérvix uterino, sugiriendo que en este momento ocurre un proceso activo de angiogénesis.

Los resultados presentados describen un proceso de adaptación materna de un órgano que es fundamental durante la gestación. Además, considerando que en el adulto la angiogénesis ocurre infrecuentemente en situaciones fisiológicas y que el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población de células extremadamente estable, con un bajo índice mitótico (Reynolds y col. 2002), el cérvix uterino de la rata durante la gestación constituye un tejido con una excepcionalmente alta dinámica vascular.

La expresión del ARNm del VEGF se asocia con los cambios vasculares del cérvix uterino durante la preñez

Entre los muchos factores angiogénicos que regularían la función y el crecimiento vascular en el tracto reproductor femenino, el VEGF es considerado como uno de los principales del sistema vascular uterino (Pavelock y col. 2001). El rol central que tiene este factor sobre la angiogénesis, tanto fisiológica como patológica, abrió un amplio campo de investigación centrado en la regulación de su expresión y/o mecanismo de acción, principalmente en la búsqueda de factores que lo inhiban de manera tal de poder limitar el crecimiento y metástasis de los tumores (Zilberberg y col. 2003). Desde un enfoque fisiológico, en este trabajo de tesis se evaluó si el VEGF se asociaba con la angiogénesis observada en el cérvix uterino durante la gestación. Para ello, la expresión del ARNm del VEGF se cuantificó por PCR competitiva y se observó que los niveles de expresión cambiaron significativamente durante la gestación alcanzando su mayor expresión en el D14 y D18 de preñez con relación a la de los D12 y D22. Estas modificaciones se correlacionaron positivamente con la incorporación de BrdU en las células endoteliales del cérvix uterino. En el mismo sentido, otros autores (Phillips y col. 1990, Shweiki y col. 1993) han demostrado una asociación temporal similar entre la expresión del ARNm del VEGF y la formación de vasos sanguíneos en el sistema reproductor. Nuestros hallazgos aportan evidencias que nos permiten sugerir que el VEGF sería un importante mediador de la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación modulando la mitogénesis de las células endoteliales.

El VEGF involucra la traducción de señales a través de receptores de alta afinidad con actividad tirosina quinasa (VEGFR), los cuales inducen la síntesis y liberación de proteasas e integrinas específicas necesarias para la proliferación y migración de las células endoteliales (Neufeld y col. 1999). Consistente con el patrón de expresión del ARNm del VEGF que observamos en nuestro experimento, Mowa y col. (2004) demostraron que los niveles de expresión de los receptores (VEGFR-1 y VEGFR-2) aumentaron en el cérvix uterino de la rata preñada hacia el final de la gestación, lo que permite concluir que serían los mediadores a través de los cuales el VEGF ejerce su acción angiogénica en el cérvix uterino. La importancia fisiológica del

sistema VEGF-receptor en la formación de nuevos vasos sanguíneos está basada en varios estudios que han demostrado que: 1) la expresión espaciotemporal del VEGF y sus receptores se correlaciona estrechamente con la angiogénesis en varios sistemas; 2) anticuerpos contra VEGF o VEGFR-1, o la administración de la forma soluble (truncada) del VEGFR-1 a ratas bloquea la angiogénesis; 3) el silenciamiento del gen del VEGF en ratones resultó en una vasculogénesis anormal provocando la muerte del embrión (Albrecht y Pepe 2003).

En los últimos años las investigaciones acerca del VEGF se han incrementado considerablemente, sin embargo, el conocimiento de su procesamiento transcripcional aún es escaso. Se sabe que el VEGF en la rata es expresado como múltiples formas que incluyen las variantes constituidas de 120, 164 y 188 aminoácidos (Stoner y col. 2004). En el cérvix uterino de ratas preñada Mowa y col. (2004) describieron por RT-PCR que claramente se expresaban dos variantes de empalme alternativo (VEGF₁₂₀ y VEGF₁₆₄) e identificaron una banda fina y clara que se corresponde con el peso molecular esperado para la variante VEGF₁₈₈. Trabajos previos, usando muestras de cuernos uterinos de rata describieron 3 variantes de empalme del ARNm del VEGF (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈) (Cullinan-Bove y Koos 1993, Long y col. 2001). En acuerdo con estos resultados nosotros identificamos las mismas tres variantes en el cérvix uterino de ratas preñadas. Es interesante destacar que independientemente del órgano y del momento fisiológico estudiado la variante VEGF₁₆₄ se expresa de forma predominante respecto de las otras (Cullinan-Bove y Koos 1993, Halder y col. 2000, Mowa y col. 2004). En este sentido, se observó en ratones que carecían del VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈ evidencias de que la variante VEGF₁₂₀ no era competente para sostener la angiogénesis normal y el desarrollo cardíaco, sugiriendo que VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈ tendrían roles críticos (Carmeliet y col. 1999). Debido a que VEGF₁₆₄, y no VEGF₁₈₈, es la principal variante expresada se podría asumir que esta variante es crítica para los cambios vasculares que ocurren en el cérvix uterino. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder dilucidar las funciones y regulación de cada una de las formas de expresión del VEGF.

La expresión del ARNm del VEGF y los niveles de E₂ se asocian positivamente en el cérvix uterino de la rata durante la gestación.

La expresión del VEGF es inducida por una amplia variedad de estímulos incluyendo, entre otros, hipoxia, citoquinas, factores de crecimiento mitogénicos y hormonas (Stoner y col. 2004). Si bien la regulación hormonal del VEGF ha sido reportada en múltiples tejidos, un aumento o disminución de su expresión son principalmente dependientes del contexto celular. En este sentido, la transcripción del VEGF puede verse afectada en función de la expresión diferencial de coactivadores, corepresores, factores nucleares o la interacción de estas proteínas con elementos reguladores en la región del promotor del gen que son claves para su transcripción (Stoner y col. 2004).

En este trabajo de tesis se observó en el cérvix uterino durante la preñez que la expresión del ARNm total del VEGF y los niveles séricos de E₂ fueron positivamente correlacionados, sugiriendo que el camino estrogénico podría jugar un rol importante en el control de la expresión del VEGF. En acuerdo con esta hipótesis, previamente se demostró que el E₂ rápidamente induce un aumento en la expresión del VEGF en el útero de la rata (Cullinan-Bove y Koos 1993). Recientemente, Kazi y Koos (2007) aportaron información acerca del mecanismo por el cual esto ocurre, demostrando que la inducción es mediada por la activación de la vía PI3K/Akt (fosfatidilinositol-3-quinasa y Akt es una serina-treonina quinasa) y el posterior reclutamiento de HIF-1 y ER α sobre distintos sitios del promotor del gen del VEGF. También, apoyando nuestros resultados, Karuri y col. (1998) demostraron variaciones fisiológicas del contenido del ARNm del VEGF en el útero de la rata durante el ciclo estral con una positiva correlación con los niveles séricos endógenos de E₂.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que la expresión del ARNm del VEGF es regulada por E₂ y que el VEGF es un mediador de la proliferación endotelial, sugerimos que un camino E₂-VEGF-VEGFR podría regular la formación de nuevos vasos sanguíneos en el cérvix uterino de la rata durante la preñez. Además, conociendo que los cambios observados en la expresión del ARNm del VEGF representan cambios en los transcritos

codificados por al menos 3 variantes; VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈, sugerimos que la inducción del VEGF por el E₂, es al menos en parte, una respuesta transcripcional directa; sin embargo, son necesarios más experimentos para poder demostrar definitivamente este concepto.

Otra hormona que está presente en altos niveles en la circulación periférica durante la segunda mitad de la preñez de la rata, es la relaxina que juega un rol clave en la promoción del crecimiento y la dilatación del cérvix uterino (Sherwood 1994). La relaxina está involucrada en la formación de vasos sanguíneos en el cérvix uterino durante la preñez (Burger y Sherwood 1998) y estimula la expresión de VEGF en el tracto genital (Unemori y col. 1999). Basados en estos datos, no podemos descartar que la relaxina esté cumpliendo algún rol sobre la angiogénesis cervical durante la segunda mitad de la preñez.

2- La angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación es regulada, en parte, por la degranulación de MC

Se han identificado muchas citoquinas y factores de crecimiento derivados de los leucocitos que pueden inducir angiogénesis otorgándole al sistema inmune un rol importante en la regulación de dicho proceso (Griffioen y Molema 2000). Entre los leucocitos, los MC han sido implicados debido a su localización principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y sitios de ramificación del nuevo sistema vascular. Sumado a su particular localización, muchos mediadores derivados de los MC tales como histamina, quinasas, VEGF, bFGF son angiogénicos y regulan la función y proliferación de las células endoteliales (Hiromatsu y Toda 2003). En el cérvix uterino de ratas preñadas, los MC están generalmente localizados en las proximidades de los vasos sanguíneos. Un gran número de estas células durante la mitad de la gestación mostraron evidencias de degranulación, tales como halos citoplasmáticos y presencia de gránulos en el espacio pericelular. Asimismo, durante este periodo de la preñez, observamos cambios significativos en la proliferación endotelial y en el área total ocupada por vasos sanguíneos, los que podrían ser mediados por la degranulación de MC.

Para estudiar si los MC presentes en el cérvix uterino se encuentran asociados al proceso de angiogénesis durante la gestación, usamos un inhibidor de la degranulación de MC, *cromoglicato de sodio*, que es un compuesto estabilizador de los MC que bloquearía la secreción de sus gránulos (Tainsh y col. 1991, Shin y col. 2004). Los resultados de este experimento mostraron que en el cérvix uterino de ratas preñadas no hubo diferencias en la densidad de volumen de los MC entre los grupos tratados con el estabilizador de MC y sus respectivos controles; sin embargo, en las ratas tratadas se observaron MC grandes, redondeados y con gránulos densamente empaquetados. En este grupo de animales se observó una disminución significativa de la proporción de MC degranulados que reflejaron la efectividad del tratamiento. En cuanto a los parámetros vasculares se observaron cambios substanciales en las ratas tratadas con el estabilizador de MC. La proliferación endotelial y el área vascular relativa mostró una disminución significativa comparada con los controles y una mayor proporción de vasos maduros pudieron ser observados en ratas tratadas, sugiriendo una fuerte reducción en la formación de nuevos vasos. Además, los efectos del estabilizador de MC sobre estos parámetros vasculares fueron sostenidos una vez finalizado el tratamiento, dado que los animales sacrificados el D22 de preñez (4 días después de concluido el tratamiento) aún mostraban una menor proliferación endotelial y una mayor proporción de vasos maduros.

La matriz extracelular del cérvix uterino está compuesta principalmente de colágeno, fibras elásticas y proteoglicanos (Minamoto y col. 1987, Luque y col. 1998). Durante la angiogénesis, la degradación controlada y local del tejido conectivo es esencial para la ramificación y elongación de los nuevos vasos (Kahari y Saarialho-Kere 1997). Los MC podrían mediar este proceso estimulando la producción de MMPs por las células estromales endometriales (Zhang y col. 1998). También, la histamina y la heparina son potentes efectores angiogénicos derivados de los MC. La histamina estimula la formación de nuevos vasos actuando a través de los receptores H1 y H2. En un modelo *in vivo* de granuloma subcutáneo la histamina incrementó la angiogénesis aumentando los niveles de expresión del VEGF (Puxeddu y col. 2005). Por su parte, la heparina

estimula la quimiotaxis y proliferación de las células endoteliales y una bFGF, manteniendo su forma activa biológicamente y protegida de la proteólisis (Levi-Schaffer y Pe'er 2001). Además, los MC del tejido de rata contienen bFGF en sus gránulos citoplasmáticos los que pueden ser liberados a través de la degranulación estimulando la formación de nuevos vasos (Qu y col. 1998). A pesar de esta amplia diversidad de mediadores son necesarios más estudios para conocer específicamente a través de qué moléculas los MC controlan la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación.

Trabajos previos vincularon la activación de MC con las propiedades contráctiles y biomecánicas del cérvix (Spanggaard y col. 1997, Bytautiene y col. 2002). Nuestros resultados serían las primeras evidencias de que la degranulación de MC podría ser un proceso necesario para la angiogénesis normal del cérvix uterino de la rata durante la preñez.

La inhibición de la degranulación de MC disminuye la angiogénesis del cérvix uterino modulando la expresión del VEGF

Con la intención de conocer más acerca de la participación de los MC en el proceso de angiogénesis, se investigó si mediadores químicos contenidos en los gránulos secretorios de los MC podrían regular la expresión del VEGF en el cérvix uterino de la rata. Se usó el modelo experimental previamente descrito de ratas preñadas sometidas a un tratamiento con un estabilizador de la degranulación de MC. En estos animales se observó una disminución significativa en la expresión del ARNm del VEGF en asociación con una disminución de la proliferación de células endoteliales. Al mismo tiempo, cuando las ratas tratadas con el estabilizador de MC fueron comparadas con los animales controles, no se observaron cambios en el procesamiento del ARNm de las variantes de empalme del VEGF, sugiriendo que los MC regulan la expresión del VEGF a nivel del transcrito primario. Y si bien no se observó expresión inmunohistoquímica de la proteína del VEGF en los MC, este factor de crecimiento se expresó positivamente en el epitelio, endotelio y células del estroma muscular del cérvix uterino. En los animales tratados con el

estabilizador de MC se observó una disminución en la expresión de la proteína del VEGF en el compartimiento epitelial.

Previamente comentamos que la expresión del ARNm del VEGF en el cérvix uterino se correlacionó positivamente con los niveles circulantes de E_2 durante los D12 a D22 de preñez. Un resultado que consideramos interesante es que los animales tratados con el estabilizador de MC redujeron la expresión del ARNm del VEGF sin ocurrir cambios en los niveles circulantes de E_2 . Por lo cual podríamos concluir que los cambios en la expresión del ARNm del VEGF en los animales que tenían inhibida la degranulación de MC no fue debida a una disminución de los niveles séricos de E_2 . Por lo tanto, sugerimos que en el cérvix uterino durante la gestación, tanto la expresión del VEGF como la proliferación de células endoteliales, pueden estar reguladas por mecanismos controlados por los niveles endógenos de E_2 y por mediadores químicos liberados de los MC.

Es sabido que los Eg promueven la degranulación de MC, la liberación de histamina y la activación de MC dependiente de IgE (Cocchiara y col. 1992). Teniendo en cuenta que ha sido demostrado que los MC poseen RE y que el E_2 estimula la degranulación de MC (Zaitso y col. 2006) no podemos descartar que la degranulación de MC y el consecuente aumento del VEGF podrían ser eventos regulados por el E_2 . Más investigaciones son necesarias para esclarecer esta hipótesis.

Los MC pueden producir y liberar muchos mediadores químicos involucrados en el control de la angiogénesis (e.g: VEGF, bFGF) o en la regulación de la expresión del VEGF (e.g.: $TNF\alpha$, $TGF-\beta$, IL-6) (Neufeld y col. 1999, Taylor y col. 2001, Xie y col. 2004, Puxeddu y col. 2005). En esta tesis, usando un modelo fisiológico pudimos demostrar que la degranulación de MC controla la expresión del VEGF en el cérvix uterino de la rata preñada. Basados en los conocimientos actuales, podemos sugerir que esta regulación podría ser ejercida a través de 2 caminos de señalización diferentes: (1) *camino directo (autocrino)*: Los MC podrían modular su propia síntesis y liberación de VEGF o (2) *camino indirecto (paracrino)*: Los MC podrían producir un mediador (tal como las citoquinas) que regule la

expresión del VEGF por otras células. Por otro lado, Mowa y col. (2004) propusieron que factores angiogénicos y nervios sensoriales pueden ser importantes en la regulación del sistema vascular dinámico en el cérvix uterino y ellos observaron que el VEGF disminuyó en el cérvix uterino de la rata preñada después de la neurectomía del nervio pélvico. Por lo tanto, un posible efecto de neuropéptidos vasoactivos sobre la regulación por los MC del proceso angiogénico en el cérvix uterino no puede ser descartada.

Finalmente, debido a que la farmacología y los mecanismos de acción de los agentes estabilizadores de MC no son totalmente conocidos una acción directa del cromoglicato de sodio sobre la proliferación endotelial y demás parámetros vasculares no puede ser descartada.

En resumen, los resultados de esta parte del trabajo sugieren que la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación puede estar regulada por un mecanismo dual que involucra un control de la expresión del VEGF por los niveles endógenos de E_2 y un camino dependiente de la degranulación de MC que implica la acción de mediadores químicos liberados por éstas células. Estos datos proveen la base para futuros estudios, los cuales examinen el impacto de la inhibición de la degranulación de MC y la disminución de la expresión de VEGF sobre la maduración cervical y el parto.

La densidad de macrófagos en el cérvix uterino de la rata es modulada por la degranulación de MC

En esta tesis proporcionamos un mapeo detallado de la densidad de macrófagos y MC en el cérvix uterino de la rata durante el ciclo estral, la preñez y el periodo postparto. Durante las dos etapas del ciclo estral evaluadas (estro y diestro II) no se observaron cambios en las densidades de macrófagos y MC presentes en el cérvix uterino de la rata. Con respecto a la densidad de macrófagos en el ciclo estral, nuestros resultados son coincidentes con reportes previos en ratón (Mackler y col. 1999). Ratas y ratones presentan ciclos estrales de 4–5 días con patrones similares de niveles hormonales de Eg y Pg (Freeman 1988). Dado que ambas especies no poseen una fase lútea verdadera, los perfiles de hormonas esteroides

muestran bajos niveles de Pg durante el ciclo estral (Freeman 1988). Por esta razón, los cambios observados en los tejidos blancos de los esteroides sexuales en ratas y ratones ciclando estarían en mayor medida bajo el estímulo de los Eg (Montes y Luque 1988). Debido a que no se observaron cambios en las densidades de macrófagos y MC en ratas ciclando, sugerimos que los Eg no serían moduladores críticos en la migración de macrófagos y MC en el cérvix uterino. Sin embargo, no podemos descartar un control estrogénico sobre su función secretoria.

En el D9 de gestación, la densidad de macrófagos en el cérvix uterino es baja, siendo la mitad de la densidad observada en el ciclo estral. Mor y Abrahams (2003) describieron una densa infiltración de macrófagos en el sitio de decidualización sugiriendo que estas células podrían estar involucradas en la apoptosis y remoción celular durante la preñez. Esta mayor migración de macrófagos en el útero durante la gestación temprana podrían explicar los bajos valores obtenidos en el cérvix uterino en este mismo período. Durante la segunda mitad de preñez, se observó un incremento en la densidad de macrófagos en el cérvix uterino con valores más altos antes del parto. Un aumento similar en el número de macrófagos previo al parto fue observado en ratones, y fue sugerido que estas células migran desde el endometrio uterino hacia el cérvix para facilitar su relajación (Mackler y col. 1999). Varios estudios (Buhimschi y col. 1996, Ali y col. 1997) demostraron que la maduración cervical estaría mediada por el óxido nítrico, el cual es sintetizado a través de una reacción enzimática mediada por la enzima óxido nítrico sintetasa. Los macrófagos producen una forma inducible de esta enzima y es la principal isoforma en el cérvix uterino de la rata durante la preñez y el parto (Buhimschi y col. 1996). Si bien la función de los macrófagos en el cérvix permanece desconocida, nuestros resultados acerca del reclutamiento de macrófagos en el estroma cervical al final de la preñez y el parto sugieren su participación en los procesos requeridos para una correcta dilatación y así facilitar un parto exitoso.

En el periodo posparto, el número de macrófagos en el cérvix cae a valores similares a los obtenidos durante la primera mitad de la gestación,

mientras que -al mismo tiempo- los niveles de infiltración de MC presentaron un notable incremento. Debido a que los macrófagos y MC juegan un rol crítico en la cicatrización de tejidos, fibrosis y remodelación tisular (Gillitzer y Goebeler 2001), el aumento del número de MC en asociación con los macrófagos descritos en el posparto, sugieren que estas células podrían estar involucradas en la reorganización tisular que ocurre en el cérvix uterino después del parto.

También observamos que existe una asociación inversa entre MC y macrófagos en el cérvix uterino, sugiriendo que ambas células podrían estar actuando de forma coordinada. Apoyando esta hipótesis, demostramos que la densidad de macrófagos en el cérvix de la rata es modulada por la degranulación de MC. Los animales que fueron sometidos al tratamiento con el estabilizador de la degranulación de MC presentaron un mayor número de macrófagos en el cérvix uterino comparado con los animales controles que no recibieron la droga, siendo este efecto sostenido una vez finalizado el tratamiento. Teniendo en cuenta que la inhibición de la degranulación de MC disminuyó el proceso de angiogénesis en el cérvix uterino de la rata durante la preñez podemos sugerir que se ha generado un microambiente hipóxico. La hipoxia puede inducir la activación de macrófagos alterando su perfil de expresión génica y actividad metabólica (Crowther y col. 2001). Estos macrófagos activados estimularían la liberación de citoquinas y factores de crecimiento angiogénicos (e.g.: VEGF) junto con enzimas proteolíticas que podrían inducir la formación de nuevos vasos. Este aumento de la densidad de macrófagos (en los animales tratados con el estabilizador de MC) y del potencial de actividad angiogénica, podrían constituir un mecanismo compensatorio para garantizar la formación de nuevos vasos sanguíneos en el cérvix. En nuestro experimento no detectamos inmunomarcación positiva para el VEGF en los macrófagos cervicales; sin embargo, no podemos descartar un posible mecanismo de activación angiogénico a través de esta misma u otras moléculas.

La maduración cervical imita un proceso inflamatorio siendo un hecho importante el tráfico de células inmunocompetentes. El mapeo detallado de los macrófagos y MC, y las evidencias presentadas respecto a que la

densidad de macrófagos es modulada por la degranulación de MC son pasos esenciales para el mejor conocimiento del mecanismo por el cual estos tipos celulares interdependientes funcionan como un todo en el cérvix uterino.

3- La exposición neonatal a xenoestrógenos modifica parámetros relacionados con la angiogénesis uterina

Las dos primeras semanas de vida postnatal en la rata se corresponden con el tiempo de máxima diferenciación del tracto reproductor femenino. Esta diferenciación ocurre siguiendo una serie compleja de interacciones entre los receptores hormonales clásicos y las moléculas de señalización que en última instancia preparan a las células blanco para responder apropiadamente al medio hormonal más tarde en la vida (Daftary y Taylor 2006). El organismo en desarrollo es sensible a las perturbaciones por químicos con actividad endócrina, los cuales pueden resultar en una respuesta hormonal anormal afectándose varios procesos fisiológicos.

En el segundo capítulo de este trabajo de tesis investigamos los efectos a largo plazo de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre el compartimiento vascular del útero. Debido que el verdadero impacto de los perturbadores endocrinos sobre la salud humana es difícil de evaluar, es importante examinar su efecto sobre condiciones de exposición controlada en modelos animales (Maffini y col. 2006). El modelo de malformaciones del tracto reproductivo y cánceres inducido por exposición perinatal a DES sirven como un nuevo paradigma para estudiar las consecuencias patológicas que se producen en adultos expuestos tempranamente en la vida a sustancias activas hormonalmente (Mericskay y col. 2005).

Nosotros utilizamos un modelo animal que imita los efectos uterinos mediados por Eg y Pg previo a la implantación del embrión. En roedores, el primer signo de inicio de la implantación es un aumento de la permeabilidad vascular uterina en el sitio de unión del blastocisto y, específicamente, en la región periluminal del estroma uterino ocurre un crecimiento diferencial de vasos sanguíneos durante la decidualización (Paria y col. 2001). Los mecanismos moleculares por los cuales ocurren el aumento de la

permeabilidad vascular localizada y angiogénesis en el sitio de implantación son pobremente conocidos.

La caracterización del modelo utilizado (OVX-P+E) reveló claramente un aumento del área ocupada por vasos sanguíneos inmunomarcados para la expresión de nestina en la región subepitelial del útero. Hasta la fecha los factores y mecanismos que controlan la expresión de nestina permanecen desconocidos. En un trabajo recientemente publicado (Takahashi y col. 2007) se demostró que las células endoteliales de folículos ováricos en desarrollo de ratas adultas expresan nestina y que la administración de gonadotrofina coriónica humana indujo la expresión de este filamento en las células endoteliales de la teca interna. Estos autores sugirieron que la nestina es expresada en células con actividad proliferativa o en células que están en una fase de desarrollo dinámico, necesitando en ambos casos un alto grado de plasticidad citoplasmática (Takahashi y col. 2007). Además de estos hallazgos, nuestros resultados aportan evidencias de que la expresión de nestina en el útero de la rata es regulada por las hormonas esteroides sexuales (Eg y Pg) y esto apoya lo sugerido por otros autores (Mokry y col. 2004) que la nestina es un marcador de angiogénesis debido a que es un filamento expresado en las células endoteliales de vasos sanguíneos nuevos.

Por otra parte, la incorporación de BrdU en los animales OVX tratados con vehículo demostró ausencia de proliferación en las células endoteliales, mientras que luego del tratamiento con Pg más Eg hubo un aumento significativo en el porcentaje de células endoteliales proliferando. En asociación con el aumento de proliferación de las células endoteliales los niveles de expresión del VEGF también aumentaron notablemente en la región subepitelial del útero luego del tratamiento con los esteroides ováricos. Esto último apoya la importancia del VEGF como mediador de las modificaciones vasculares del útero previo a la implantación. En el mismo sentido, se conoce que la proliferación de las células endoteliales endometriales en la rata aumenta significativamente previo a la implantación cuando las concentraciones plasmáticas de Pg están aumentando (Walter y col. 2005). Además, estudios previos han demostrado que la administración de un anticuerpo anti-VEGF redujo la

permeabilidad vascular conduciendo a fallas completas en la implantación (Rabbani y Rogers 2001, Rockwell y col. 2002).

En función de los resultados obtenidos podemos afirmar que el modelo utilizado refleja cambios hormonodependientes relacionados al compartimiento vascular del útero que nos permiten emplearlo para investigar los efectos a largo plazo de la exposición temprana a xenoestrógenos.

La exposición neonatal a xenoestrógenos altera parámetros relacionados con la angiogénesis uterina en la rata adulta

Nuestros resultados demuestran que las ratas expuestas neonatalmente a xenoestrógenos presentaron una respuesta alterada a la inducción de la proliferación de células endoteliales por los esteroides ováricos. Las hembras que habían sido expuestas a DES o BPA presentaron una disminución significativa en el índice de proliferación endotelial en relación a las controles. No obstante, no se observaron diferencias en el área vascular ocupada por marcación positiva de nestina entre los diferentes grupos experimentales. Sugerimos que la población de células endoteliales con plasticidad citoplasmática potencial para la proliferación (aquellas que son nestina positivas; Takahashi y col. 2007) no se modificó por la exposición neonatal a xenoestrógenos y que la exposición a DES o BPA alteró la respuesta proliferativa de las células endoteliales, sugiriendo que el efecto de estos perturbadores endocrinos ocurriría a nivel del control de la proliferación celular. Apoyando esto último en un trabajo previo demostramos que la exposición neonatal a estos xenoestrógenos disminuyó la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células del estroma subepitelial del útero (Varayoud y col. *enviado*). Además, Ramos y col. (2007) demostraron una correlación inversa entre la proliferación y la expresión de p27^{kip1} (inhibidor del ciclo celular) en células precursoras neuronales tipo 2 en ratas expuestas a DES, sugiriendo un rol crítico de este inhibidor en el estado quiescente de estas células inducido por xenoestrógenos.

En asociación con la menor proliferación de las células endoteliales observamos que los grupos de DES, BPA.05 y BPA20 tenían una menor inducción del ARNm del VEGF en comparación a los animales controles. Cabe destacar que las modificaciones inducidas en la expresión del VEGF en estos animales fueron a nivel del transcripto primario debido a que no se observaron cambios en la expresión relativa de cada una de las variantes de empalme del VEGF, siendo predominante la variante VEGF₁₆₄. En el útero del ratón durante el periodo peri-implantatorio la expresión de VEGF₁₆₄ fue la variante preponderante e interactúa con el VEGFR-2 y NRP-1 expresado en las células endoteliales uterinas, sugiriendo que el VEGF₁₆₄ es uno de los mediadores primarios de la señalización del VEGF en los cambios vasculares durante la implantación (Halder y col 2000).

Respecto a la proteína del VEGF se observó una menor inducción en los animales que habían sido expuestos a DES y a la dosis más baja de BPA (BPA.05), sugiriendo que la falla en la expresión de este factor podría ser el responsable de la menor proliferación de las células endoteliales. La expresión de la proteína del VEGF no presentó diferencias en los animales expuestos a BPA20 *versus* los controles, lo que indicaría que la falla observada en la proliferación endotelial en este grupo de animales ocurriría por un camino independiente del VEGF, como podría ser una alteración en moléculas que intervienen en el control del ciclo celular (Ramos y col. 2007, Zhuang y col. 2001). Las modificaciones observadas en la expresión del VEGF por la exposición a las dos dosis de BPA coinciden con trabajos previos que describen una curva dosis-respuesta con forma de U invertida para la acción del BPA (Monje y col. 2007, vom Saal y Hughes 2005). Además, es interesante resaltar que las dos dosis de BPA afectaron la proliferación de células endoteliales posiblemente por vías diferentes.

Teniendo en cuenta que el estímulo previo de la Pg es necesario para los eventos celulares que ocurren antes de la implantación en respuesta a los E₂ y que estos eventos requieren la presencia de receptores esteroides, evaluamos si la exposición neonatal a BPA o DES afectaba la expresión normal de RE α y RP en el útero del animal adulto. Con respecto a la expresión del RE α en el compartimiento subepitelial, los resultados

demonstraron una inducción disminuida en respuesta a los esteroides ováricos en los grupos de animales expuestos neonatalmente a DES y a la menor dosis de BPA (BPA.05); mientras que la dosis de BPA20 no fue diferente comparada con el grupo control. Los animales expuestos a BPA.05 también presentaron una menor expresión del RE α en el compartimiento endotelial. Semejante a lo observado para la expresión de la proteína del VEGF, la expresión de RE α también se comportó en forma diferencial para las dos dosis de BPA. El análisis de los resultados nos permite destacar que hay una asociación positiva entre la expresión del RE α y del VEGF en los animales expuestos a DES y BPA.05. Teniendo en cuenta trabajos previos que describen un control transcripcional del VEGF por unión del RE α a secuencias específicas de la región del promotor de dicho gen (Kazi y Koos 2007, Kazi y col 2005), sugerimos que las alteraciones observadas en la expresión del VEGF podrían deberse a la menor expresión del RE α y consecuentemente menor interacción con la región del promotor del VEGF.

Mientras que las ratas expuestas a DES fallaron para inducir RP en el estroma subepitelial del útero después del tratamiento con Pg y Eg, los grupos de ratas expuestas a BPA.05 y BPA20 aumentaron la expresión del RP de manera similar al de los controles. Con relación a la expresión del RP en el endotelio vascular no hubo cambios entre los diferentes grupos experimentales. Estos resultados indican que cada xenoestrógeno afectaría el camino de señalización del RP por mecanismos diferentes y específicos para cada tipo celular. Sugerimos que el BPA afectaría la actividad transcripcional del RP como resultado de cambios en la expresión de proteínas reguladoras del receptor. Ha sido demostrado que el RP y el RE exhiben baja unión a corepresores en ausencia de hormona pero ganan en capacidad para unir a corepresores en presencia de moduladores selectivos de receptores hormonales, de cofactores de transcripción ubicuos y dependiendo del promotor al que se unan (Privalsky 2004). La exposición neonatal a BPA afectó la expresión de SMRT en respuesta al tratamiento con Pg y Eg, exhibiendo un claro aumento en el compartimiento subepitelial del útero. Debido a que el SMRT es un factor limitante que inhibe la actividad transcripcional de receptores esteroides por reclutamiento de histonas deacetilasas y alterando las interacciones dímero-receptor

(Privalsky 2004), la expresión aumentada de SMRT sin cambios en la expresión de los receptores esteroides puede proveer una posible explicación para la respuesta reducida al estímulo hormonal.

En resumen, en este segundo capítulo del trabajo de tesis demostramos que la exposición a los xenoestrógenos DES y BPA durante el desarrollo uterino neonatal modificó la respuesta a esteroides ováricos de células blanco conduciendo a una desregulación del control de la proliferación de las células endoteliales y de la expresión del gen del VEGF. Específicamente, detectamos que el tratamiento con Pg y Eg no incrementó la expresión de la proteína del VEGF en el útero de la rata de animales expuestos a DES y BPA.05, conjuntamente con una falla en la inducción del RE α . Mientras que en los animales que habían sido expuestos a BPA20 la alteración en la proliferación de las células endoteliales se asoció con una sobreexpresión anormal del corepresor SMRT en la región subepitelial uterina. Una hipótesis atractiva para proponer es que la exposición a perturbadores químicos endocrinos durante periodos críticos de la vida postnatal cambia la respuesta hormonal uterina durante la adultez por una perturbación en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción basal de genes dependientes de RE y RP.

4- Los animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos son subfértiles

La preñez temprana en los mamíferos está asociada con cambios morfológicos y funcionales en las células uterinas, acompañadas por remodelación vascular. Los resultados que describimos empleando el modelo de rata ovariectomizada y sometida a terapia hormonal de reemplazo con Pg y Eg claramente demostraron que la exposición neonatal a xenoestrógenos alteró la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células endoteliales y la expresión del VEGF en el útero. Estudios previos han demostrado que la inmunoneutralización del VEGF inhibe la implantación del embrión en el útero de roedores (Rabbani y Rogers 2001, Rockwell y col. 2002). Por otra parte, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio se observó que la exposición neonatal a xenoestrógenos disminuye la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células del

estroma subepitelial del endometrio y que este efecto sería mediado a través del silenciamiento del gen homeótico *Hoxa10*, siendo ambos procesos esenciales para una normal implantación (Varayoud y col. *enviado*).

En base a los antecedentes mencionados formulamos la hipótesis que propone que las modificaciones presentadas como resultado de la exposición neonatal a xenoestrógenos podrían ser responsables de alterar el mecanismo de implantación y de promover una muerte embrionaria temprana. En primer lugar observamos que un mayor número de hembras expuestas a DES y BPA20 no quedaron preñadas, sin embargo, esta tendencia en los resultados no alcanzó a ser estadísticamente significativa. Por otro parte, entre los animales que quedaron preñados en los diferentes grupos experimentales no se observaron diferencias con relación al número de CL de preñez, sugiriendo que el número de ovulaciones no fue afectado por el tratamiento neonatal. Lo que sí se afectó de manera altamente significativa fue el número de sitios de implantación que fue menor en los animales expuestos a DES y BPA20. Esto último permite sugerir que los xenoestrógenos estarían provocando defectos a nivel del útero que alteran la implantación del embrión (pérdidas pre-implantatorias). De esta forma las hembras expuestas neonatalmente a DES y BPA20 exhibieron un menor número de fetos en desarrollo. También es interesante destacar que los animales expuestos a BPA (BPA20 y BPA.05) presentaron una tendencia a ser menos capaces de mantener el desarrollo embrionario evidenciado por un mayor número de reabsorciones (pérdidas post-implantatorias). En conjunto, estas evidencias indican que una corta exposición neonatal a BPA o DES utilizando dosis bajas (conocidas como "dosis ambientalmente relevantes") provocó una alteración en la respuesta a los esteroides ováricos durante la adultez conduciendo a una menor fertilidad de las hembras.

Una asociación entre exposición neonatal a perturbadores endocrinos e infertilidad ha sido demostrada para fitoestrógenos (e.g.: genisteína) y para DES en animales experimentales. Se observó que la presencia de folículos con mucho oocitos (folículos poliovulares) en los ovarios de

animales expuestos neonatalmente a DES y genisteína se asocia con una menor fertilidad de la hembra (Iguchi y col. 1986, Jefferson y Newbold 2000). Además, una serie de estudios previos han demostrado diversos efectos de perturbación sobre órganos reproductivos luego de la exposición perinatal a BPA. Se han observado alteraciones en el inicio de la pubertad, la regularidad de los ciclos estrales (Markey y col. 2003, Kato y col. 2003, Muñoz-de-Toro y col. 2006) cambios en la abundancia de transcritos del RE α en el hipotálamo (Monje y col. 2007), modificaciones del desarrollo del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Khurana y col. 2000, Ramos y col. 2003) y cambios histofuncionales en tejidos hormonodependientes como la próstata y glándula mamaria (Ramos y col. 2001, Durando y col. 2007, Muñoz-de-Toro y col. 2006). Respecto a los efectos de la exposición a perturbadores en la vida adulta, Al-Hiyasat y col. (2004) usando un modelo de ratón expuesto a BPA (en una dosis de 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$, durante 28 días) observaron un mayor número de reabsorciones respecto de los controles. En un trabajo reciente, se observó que la administración de BPA (10 mg/kg/día) a ratonas preñadas durante los días 1 a 4 de gestación redujo notablemente el porcentaje de preñez (Berger y col. 2007). Consecuentemente, los efectos de los perturbadores endocrinos sobre la fertilidad de la hembra varían de acuerdo al modelo animal, la edad, dosis de exposición y tipo de xenoestrógeno.

Por su parte, la Agencia de Protección del Medioambiente de Estados Unidos (www.epa.gov) estableció la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día de BPA (nuestra dosis de BPA.05) como "dosis segura". Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis y en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Stoker y col. 2003, Markey y col 2001, Ramos y col 2001 y 2003, Muñoz-de-Toro y col. 2006, Durando y col. 2007, Varayoud y col. *enviado*, Monje y col. 2007) donde se utilizan "bajas dosis" de BPA indicarían que es necesario realizar un replanteo con relación a las dosis consideradas "seguras" de este compuesto. Además, hay que tener en cuenta que probablemente muchos efectos de los perturbadores endocrinos permanecen desconocidos u "ocultos" hasta la madurez sexual o hasta que se enfrentan con situaciones endocrinas diferentes tal como puede ser la preñez.

Por último, es necesario tomar conciencia de que la exposición a xenoestrógenos puede generar consecuencias adversas sobre nuestra salud y, fundamentalmente, sobre la de nuestros hijos. La necesidad del desarrollo de políticas de prevención que eviten los efectos perjudiciales sobre la salud es altamente recomendable.

VI - CONCLUSIONES

Finalizando el desarrollo de este trabajo de tesis y luego de presentados los resultados podemos elaborar las siguientes conclusiones:

- 1) El cérvix uterino de la rata durante la gestación presenta cambios vasculares que describen la presencia de un proceso de angiogénesis caracterizado por:
 - a) aumento de la proliferación de las células endoteliales
 - b) incremento del área vascular
 - c) disminución de la maduración vascular
 - d) aumento de la expresión del VEGF

- 2) Los perfiles de densidades de MC y macrófagos siguen patrones característicos, demostrando una correlación negativa.

- 3) La degranulación de los MC regula la angiogénesis del cérvix uterino durante la gestación modulando la expresión del VEGF.

- 4) La densidad de macrófagos en el cérvix uterino durante la gestación es modulada por la degranulación de MC, pudiendo ejercer una acción coordinada en el control de la angiogénesis.

- 5) La exposición neonatal a xenoestrógenos (BPA y DES) produjo importantes alteraciones en el útero de hembras adultas:
 - a) disminuyó la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células endoteliales y la expresión del VEGF
 - b) modificó la expresión de receptores hormonales (RE α y RP) y coreguladores (SMRT)

- 6) Las hembras expuestas neonatalmente a BPA y DES fueron subfértiles, presentando un menor número de sitios de implantación y mayor porcentaje de reabsorciones fetales. Este efecto fue debido a una falla a nivel del útero por la exposición a los xenoestrógenos.

Los resultados obtenidos en esta tesis intentan contribuir al mejor conocimiento de la angiogénesis como un proceso fisiológico necesario para una adecuada transformación del cuello uterino a lo largo de la gestación y durante el parto. Esto último será necesario para alcanzar un parto exitoso. En la segunda parte de la tesis se presentaron evidencias experimentales acerca de los efectos adversos de la exposición a xenoestrógenos sobre la salud reproductiva de la hembra. Esto último contribuirá en la toma de conciencia para promover la elaboración de normas que regulen/eviten la exposición a químicos clasificados como perturbadores endocrinos que contaminan el medio ambiente y que afectan la salud animal y de los humanos.

VII - RESUMEN

La morfogénesis del tracto reproductor de la hembra está controlada por una interacción coordinada entre diversos mecanismos endocrinos, celulares y moleculares. Las perturbaciones del desarrollo uterino durante la vida fetal o neonatal por defectos genéticos o por exposición a perturbadores endocrinos (PE) pueden reprogramar la función del útero en el adulto y conducir a infertilidad, cáncer y aún la muerte. La principal función de este órgano es aceptar al ovocito fertilizado que se implantará en el endometrio. Después de la implantación, los vasos sanguíneos del útero deben desarrollarse para proveer de los nutrientes necesarios. La diferenciación del útero para sostener el desarrollo y la implantación del embrión es coordinada por progesterona (Pg) y estrógenos (Eg) actuando de manera temporal y específica en relación al tipo celular.

Dos eventos vasculares caracterizan la etapa temprana de implantación del embrión en la rata: un aumento localizado en la permeabilidad vascular endometrial y una significativa proliferación de las células endoteliales. Estos eventos podrían estar mediados por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), expresado en el útero al tiempo de la implantación. El sistema vascular es típicamente inactivo en el adulto excepto en situaciones patológicas y durante procesos fisiológicos específicos del tracto reproductor femenino, tales como preñez y parto. Se sabe que el sistema inmune cumple un rol importante en la regulación de la angiogénesis. Los mastocitos (MC) están ampliamente distribuidos en el tejido conectivo y son frecuentemente localizados en las proximidades de los vasos sanguíneos. La degranulación de MC por una variedad de secretagogos produce la liberación de factores angiogénicos potentes, e.g. VEGF, factor de crecimiento fibroblástico básico y varias interleuquinas. Por otro lado, los macrófagos no son angiogénicos *per se* pero cuando reciben un estímulo adecuado podrían ejercer un rol angiogénico cambiando o modificando el patrón de expresión de sus productos secretorios. Estudios *in vitro* demostraron que la hipoxia induce la activación de macrófagos estimulando la liberación de citoquinas y factores de crecimiento angiogénicos (e.g.: VEGF), junto con enzimas proteolíticas que podrían jugar un rol en la formación de nuevos vasos.

Durante el ciclo estral y la preñez temprana se observó una íntima asociación entre la función endocrina y la angiogénesis. La angiogénesis hormonalmente controlada es fundamental para la diferenciación endometrial necesaria para la implantación, como así también para los cambios uterinos asociados con la preñez. En el útero de ratas en proestro se observó un aumento en el contenido del ARNm del VEGF coincidiendo con los niveles más altos de 17β -estradiol (E_2). La angiogénesis del útero de roedores es también regulada por Pg a través de la estimulación de la proliferación de las células endoteliales y la expresión del VEGF. La expresión uterina del VEGF, regulada por Eg, involucra un rápido reclutamiento del receptor de Eg alfa ($ER\alpha$) a la región promotora del gen e interacciones con proteínas específicas (SP). Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para entender la regulación transcripcional del VEGF y la regulación endocrina de la angiogénesis en el tracto reproductor en condiciones fisiológicas.

Los PE son sustancias químicas, exógenas al organismo animal o humano que tienen actividad hormonal o antihormonal y que, actuando como agonistas o antagonistas, pueden alterar la homeostasis del sistema endocrino. Algunos de estos compuestos han demostrado tener una potente actividad estrogénica (xenoestrógenos). Los primeros días postnatales son críticos para el normal desarrollo del útero, siendo este período de alta sensibilidad a la exposición a xenoestrógenos. Las consecuencias de una exposición temprana pueden manifestarse durante la vida adulta, cuando el útero presenta adaptaciones para su normal funcionalidad reproductiva. Desde 1940 a 1970, el xenoestrógeno dietilstilbestrol (DES) fue utilizado en mujeres embarazadas para prevenir abortos espontáneos. Luego, se observó que las hijas de estas mujeres presentaban anomalías del tracto genital cuando fueron adultas. La exposición perinatal de roedores de laboratorio a DES produce un espectro de lesiones en el tracto reproductor femenino similar a las observadas en humanos. El Bisfenol A (BPA) es un xenoestrógeno empleado en la fabricación de policarbonatos plásticos y resinas epoxi y además está presente en un gran número de productos de uso habitual: cubriendo el interior de las latas de conserva, mamaderas, selladores dentales, etc. Estudios *in vivo* en roedores de laboratorios y

animales silvestres establecieron que el BPA puede inducir alteraciones en las funciones reproductivas. Usando diferentes modelos animales, se demostró que la exposición perinatal a BPA afectó parámetros reproductivos en el animal adulto, tales como desarrollo del eje neuroendocrino, morfología de la próstata y glándula mamaria, patrones de ciclicidad estral y comportamiento sexual.

Objetivos

Evaluar en el cérvix y útero de la rata durante la gestación el proceso de angiogénesis y los posibles mecanismos involucrados en su regulación. Investigar la repercusión de la exposición neonatal a sustancias xenoestrogénicas sobre el desarrollo del compartimiento vascular uterino y su potencial influencia en la eficiencia reproductiva.

1- En el cérvix uterino de ratas preñadas intactas evaluar cualitativa y cuantitativamente parámetros que caracterizan la angiogénesis (proliferación endotelial, densidad y maduración vascular y expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular).

2- Evaluar la participación de células inmunes en el proceso de angiogénesis: a) determinando la densidad de mastocitos y macrófagos en el cérvix uterino durante el ciclo estral, gestación y postparto, b) investigando la función de los mastocitos en el proceso de angiogénesis cervical durante la gestación.

3- Evaluar si la exposición neonatal a estrógenos ambientales, tales como bisfenol A y dietilstilbestrol, está asociada con: a) modificar los parámetros relacionados con la angiogénesis uterina en la vida adulta, b) afectar algunos parámetros relacionados con la eficiencia reproductiva: número de cuerpos lúteos, sitios de implantación, pérdidas pre- y post-implantatorias.

Materiales y métodos

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar. Para la obtención de animales preñados, hembras en proestro fueron alojadas en jaulas con machos de fertilidad comprobada. Las ratas fueron asignadas al azar a cada uno de los grupos experimentales y 2 hs antes del sacrificio los animales recibieron bromodeoxyuridina (BrdU). Para evaluar la angiogénesis durante

la preñez, los cérvix uterinos fueron obtenidos desde el día 12 (D12) hasta el D23 de gestación. Las muestras fueron fijadas y luego incluidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos de los cérvix uterinos para ser usados en ensayos de inmunohistoquímica (IHQ). Se evaluó el *área vascular absoluta y relativa* en secciones inmunoteñidas con el anticuerpo anti-von Willebrand factor (vWF) combinado con una técnica de análisis de imágenes. La suma de todas las áreas vasculares individuales en cada sección de cérvix uterino fue considerada como el área vascular absoluta. El área vascular relativa se determinó dividiendo el área vascular absoluta por el área total ocupada por el estroma cervical. La *proliferación de células endoteliales* se evaluó por incorporación de BrdU, determinando el porcentaje de células endoteliales proliferando en el estroma subepitelial y muscular. El *índice de maduración vascular* se determinó usando la inmunodetección de alfa actina de músculo liso (α -SMA) para identificar pericitos y células musculares lisas vasculares. Este índice se calculó dividiendo el área ocupada por vasos sanguíneos positivos para α -SMA y el área vascular relativa. Utilizando muestras de cérvix uterino congeladas se determinó la expresión total del ARNm del VEGF y la abundancia relativa de sus variantes de empalme alternativo (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈). Se realizó la extracción del ARN total y luego se procedió a evaluar cuantitativamente la expresión del ARNm total del VEGF mediante la reacción de PCR competitiva. Las variantes de empalme alternativo se cuantificaron a través de PCR múltiple en un solo tubo. Para evaluar los niveles séricos de E₂ por RIA, se recolectó sangre periférica desde D3 hasta D23 de gestación.

Para determinar el número de macrófagos y MC se obtuvieron muestras de cérvix uterino de: a) hembras vírgenes con ciclo estral regular (en estro y diestro II), b) hembras preñadas (D9-D23) y c) hembras en postparto, sacrificadas 24, 48 y 72 hs después del parto (PP1-PP3). La evaluación de MC se realizó por IHQ utilizando un anticuerpo policlonal que detecta el componente principal de sus gránulos: la enzima proteinasa I (RMCP I, *rat mast cell proteinase I*). Los macrófagos fueron identificados usando un anticuerpo monoclonal que reconoce una glicoproteína sobre la membrana lisosomal.

Para investigar el rol de los MC en la angiogénesis cervical, un grupo de animales preñados fueron tratados con *cromoglicato de sodio* (inhibidor de la degranulación de MC). Los animales preñados fueron asignados al azar a cada uno de los siguientes grupos experimentales: (a) T14: tratadas con estabilizador de MC desde D12 a D14, sacrificadas D14 de preñez; (b) T18: tratadas con estabilizador de MC desde D12 a D18, sacrificadas D18 de preñez; (c) T22: tratadas con estabilizador de MC desde D12 a D18, sacrificadas D22 de preñez; o los grupos controles C14, C18 y C22: inyectadas con solución salina y sacrificadas el D14, D18 o D22 respectivamente. Para evaluar el efecto del tratamiento con el estabilizador de MC, se comparó el porcentaje de MC degranulados entre ratas controles y tratadas con el estabilizador. También se determinó por IHQ la proliferación de células endoteliales, el área ocupada por vasos y el índice de maduración vascular. La expresión del ARNm del VEGF y la abundancia relativa de sus variantes de empalme se evaluaron por RT-PCR y la expresión de la proteína del VEGF se determinó por IHQ. Además se midieron los niveles séricos de E₂ por RIA. Para investigar un posible rol de la degranulación de MC sobre la distribución de macrófagos se evaluó esta célula inmune por IHQ.

Para investigar los efectos a largo plazo de la exposición a xenoestrógenos, usamos un modelo de rata adulta ovariectomizada (OVX) con tratamiento de reemplazo hormonal que consistió en 2 dosis de Pg seguida por una dosis de Pg y Eg (grupo OVX-P+E). Otro grupo de ratas recibieron dosis diarias de vehículo (grupo OVX). Dieciséis horas después de la última inyección, a cada rata se le administró una dosis de BrdU, siendo sacrificados los animales 4 hs posteriores. Uno de los cuernos uterinos se procesó para extracción de ARN, mientras que el otro se fijó e incluyó en parafina para ensayos de IHQ. Primero se caracterizó este modelo evaluando por IHQ el área vascular positiva para nestina, la proliferación de células endoteliales y la expresión del VEGF. También determinamos los niveles de expresión del ARNm del VEGF por RT-PCR en tiempo real. Seguidamente las crías hembras fueron expuestas el día postnatal 1, 3, 5 y 7 a DES (0,2 µg/kg/día), BPA.05 (0,05 mg/kg/día), BPA20 (20 mg/kg/día) o vehículo (aceite de maíz). A los 80 días de edad, los animales fueron OVX y

sometidos al tratamiento de reemplazo con esteroides descrito anteriormente. En estos animales evaluamos los mismos parámetros considerados en la caracterización del modelo experimental y, además, determinamos por IHQ en el estroma subepitelial del útero la expresión de receptores esteroides ($ER\alpha$ y PR) y coreguladores de receptores nucleares (*SMRT*: silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor; *SRC-3*: steroid receptor coactivator 3).

A los 80 días de edad otro grupo de hembras tratadas neonatalmente con xenoestrógenos fueron colocadas en jaulas con machos de fertilidad comprobada durante 2 semanas consecutivas para determinar parámetros relacionados con la fertilidad. Se calculó el porcentaje de preñez, siendo sacrificadas las hembras preñadas el D18 de gestación. Se determinó el número de cuerpos lúteos (CL) y el número de sitios de implantación los cuales fueron clasificados como fetos viables o sitios de reabsorción.

Resultados

Los resultados demostraron que el área vascular absoluta del cérvix uterino se incrementó significativamente durante la preñez, alcanzando valores más altos alrededor del parto; mientras que el área vascular relativa no presentó modificaciones durante la gestación. Estos resultados sugieren que el crecimiento de vasos sanguíneos acompaña al rápido crecimiento del cérvix durante la preñez. Además, el compartimiento endotelial de la región subepitelial y de la región muscular del cérvix uterino presentó un alto índice de proliferación hacia el final de la gestación. El índice de maduración vascular disminuyó significativamente durante los días 14 y 15 de gestación. Luego, desde el D18 hasta el parto se observó una alta proporción de vasos maduros. Los niveles de expresión del ARNm del VEGF cambiaron significativamente durante la gestación alcanzando su mayor expresión en el D14 y D18 de preñez con relación a la de los D12 y D22. La expresión del ARNm del VEGF se correlacionó positivamente con la proliferación de células endoteliales y los niveles circulantes de E_2 . Observamos que el cérvix uterino expresó las variantes $VEGF_{120}$, $VEGF_{164}$ y $VEGF_{188}$ y que la contribución relativa de cada una de las variantes a la expresión total del ARNm VEGF no presentó cambios, sugiriendo que el

mecanismo de empalme del ARNm del VEGF no se modificó durante la gestación.

En cuanto al estudio de las células inmune, no se observaron diferencias significativas en las densidades de MC entre el diestro II y el estro. Se observó una mayor densidad de MC durante la primera mitad de la gestación (D9 y D12), mientras que durante la segunda mitad de la preñez (D14-D22) la cantidad de MC disminuyó significativamente. Después del parto, la densidad de MC aumentó y permaneció elevada hasta el PP3. El anticuerpo empleado para detectar los MC fue usado satisfactoriamente para identificar MC degranulados y no degranulados. Todos los animales que recibieron el estabilizador de MC presentaron más del 40% de MC no degranulados. En relación al proceso de angiogénesis, las ratas tratadas demostraron una disminución en la proliferación de células endoteliales y en el área vascular relativa, sumado a una mayor proporción de vasos sanguíneos maduros, lo que sugiere una menor formación de vasos nuevos. Los efectos observados con el estabilizador de MC se mantuvieron una vez finalizado el tratamiento. Además, los resultados demostraron que cuando se inhibió la degranulación de MC la expresión del ARNm del VEGF disminuyó significativamente, mientras que no se observaron cambios en el proceso de empalme alternativo del VEGF. Los niveles séricos de E₂ no presentaron diferencia entre los grupos experimentales, lo que permitió sugerir que el tratamiento con el estabilizador de MC no afectó la síntesis de estrógenos.

Con respecto a la evaluación de macrófagos, no observamos cambios en las densidades de macrófagos entre diestro II y estro. La cantidad de macrófagos aumentó en el cérvix uterino hacia el final de la gestación, alcanzando los valores más altos antes del parto (D20 y D21) y disminuyendo en el postparto. Se observó un patrón de cambio inverso entre macrófagos y MC a medida que nos acercamos al momento del parto. Interesantemente, las ratas tratadas con el estabilizador de MC presentaron un mayor número de macrófagos. En el cérvix uterino la inmunoreactividad para la proteína del VEGF fue detectada en el epitelio luminal, endotelio y músculo liso, sin observarse expresión en macrófagos. Sin embargo, no

podemos descartar una acción coordinada entre MC y macrófagos sobre la angiogénesis.

Por otra parte, estudiamos si la exposición neonatal a BPA o DES afecta la respuesta uterina al estímulo de los esteroides ováricos en ratas adultas. Los resultados del estudio realizado para caracterizar el modelo de ratas OVX reveló que los animales tratados con Pg y Eg (OVX-P+E group) presentaron: 1) un aumento en la expresión de nestina en el compartimiento endotelial, 2) un incremento en la incorporación de BrdU por las células endoteliales, y 3) una inducción de la expresión del VEGF comparado a las ratas adultas OVX inyectadas con vehículo. En relación a los animales expuestos neonatalmente a xenoestrógenos no obtuvimos diferencias en la expresión de nestina. La proporción de células endoteliales que incorporaron BrdU en los grupos de DES y las dos dosis de BPA fue significativamente menor que en los animales controles. Notablemente, se observó que la inducción de la expresión del ARNm del VEGF por los esteroides ováricos fue atenuada en los animales expuestos a BPA o DES comparado con los expuestos al vehículo; sin embargo la expresión de la proteína del VEGF disminuyó en los animales expuestos a DES o BPA.05, mientras que la exposición a la mayor dosis de BPA (BPA20) no presentó diferencias respecto al control. Las ratas tratadas con DES demostraron una disminución en la expresión del RP y RE α en el estroma subepitelial. Además, en las ratas expuestas a BPA.05 se observó una menor expresión del ER α en las células endoteliales. Los animales expuestos a BPA no demostraron diferencias en la expresión del RP, observándose un aumento en la expresión del corepresor SMRT. La expresión de SRC-3 no fue diferente entre los grupos experimentales.

En este experimento, se observó una asociación entre la exposición neonatal a xenoestrógenos y subfertilidad. Aunque no se demostraron diferencias en el porcentaje de ratas preñadas y el número de CL, se observó una disminución en el número de sitios de implantación en los animales expuestos a DES y BPA20. Este menor número de sitios de implantación podría explicar el menor desarrollo de fetos observado en

estos grupos. No se observaron diferencias en el número de reabsorciones en las hembras tratadas.

Conclusiones

1) El cérvix uterino de la rata durante la gestación presenta cambios vasculares que describen la presencia de un proceso de angiogénesis caracterizado por importantes cambios en el área vascular, la proliferación de células endoteliales y la maduración vascular. Estas modificaciones fueron asociadas con cambios en la expresión del VEGF.

2) La degranulación de MC sería un proceso necesario para controlar la angiogénesis normal del cérvix uterino de la rata durante la gestación y sugerimos que el efecto ocurre a través de un camino dependiente del VEGF.

3) Demostramos una asociación entre macrófagos y MC a lo largo de la preñez. Además, presentamos evidencias de que la densidad de macrófagos en el cérvix de la rata es modulada por la degranulación de MC, sugiriendo una posible acción coordinada sobre el control de la angiogénesis.

4) La exposición neonatal a xenoestrógenos alteró la respuesta normal a esteroides ováricos en el útero de las ratas hembras adultas, con fallas en la activación del gen del VEGF y una menor proliferación de células endoteliales. En paralelo, observamos cambios en la expresión del $RE\alpha$ y RP asociados a una sobre-expresión anormal del corepresor SMRT, sugiriendo que la exposición neonatal a xenoestrógenos altera la maquinaria transcripcional de genes dependientes de esteroides.

5) Finalmente, sumado a los efectos mencionados, las hembras intactas expuestas a xenoestrógenos fueron subfértiles.

Los resultados obtenidos en esta tesis intentan contribuir al mejor conocimiento de la angiogénesis como un proceso fisiológico necesario para una adecuada transformación del cuello uterino a lo largo de la gestación y durante el parto. Esto último sería necesario para alcanzar un parto exitoso. En la segunda parte de la tesis se presentaron evidencias experimentales acerca de los efectos adversos de la exposición a xenoestrógenos sobre la salud reproductiva de la hembra. Esto último contribuirá en la toma de

conciencia para promover la elaboración de normas que regulen/eviten la exposición a químicos clasificados como perturbadores endocrinos que contaminan el medio ambiente y que afectan la salud animal y de los humanos.

VIII - ABSTRACT

The morphogenesis of the female reproductive tract is governed by the coordinate interaction among a variety of endocrine, cellular, and molecular mechanisms. Disruption of uterine development in the fetus and neonate by genetic defects or exposure to endocrine disruptors can reprogram the function of the uterus in the adult and lead to infertility, cancer, and even death. The main function of this organ is to accept a fertilized ovum which will be implanted into the endometrium. After the implantation occurs, the uterus derives nourishment from blood vessels which develop exclusively for this purpose. The differentiation of the uterus to support the development and implantation of the embryo is coordinated by progesterone (Pg) and estrogen (Eg) in a temporal and cell type-specific manner.

Two endometrial vascular events characterize the early stages of embryo implantation: localized increase in endometrial vascular permeability and endothelial cell proliferation. These events could be mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF), expressed in the uterus at the time of implantation. The vascular system is typically quiescent in the adult except for pathological situations and during specific physiological processes of the female reproductive system such as pregnancy and labor. It is well established that the immune system plays an important role in regulating angiogenesis. Mast cells (MC), which are widely distributed in the connective tissue, are frequently located in close proximity to blood vessels. Degranulation of MC by a variety of secretagogues causes the release of potent angiogenic factors, e.g. VEGF, basic fibroblast growth factor and several interleukins. On the other hand, macrophages are not angiogenic per se but, when they receive an adequate stimulation, they could exert angiogenic activity by modifying the expression patterns of their secretory products. *In vitro* studies showed that hypoxia induces macrophage activation, stimulating the release of angiogenic cytokines and growth factors (e.g. VEGF), along with proteolytic enzymes, which might play a role in the promotion of neovessel formation.

A close relationship between endocrine function and angiogenesis has been observed during estrous cycle and early pregnancy. Hormonally

controlled angiogenesis is fundamental for endometrial development and the differentiation necessary for implantation, as well as uterine changes associated with pregnancy. In rats, an increase in VEGF mRNA content in the uterine tissue at proestrous is exhibited, coincident with the highest 17 β -estradiol (E₂) levels. The angiogenesis of the rodent uterus is also regulated by Pg through stimulation of endothelial cell proliferation and VEGF expression. VEGF expression in the rat uterus, regulated by E₂, involves rapid recruitment of estrogen receptor alpha (ER α) to the VEGF promoter and interaction with specific proteins (SP). However, additional studies are needed to understand VEGF transcriptional regulation and endocrine regulation of angiogenesis in the reproductive tract under physiological conditions.

Endocrine disruptors are exogenous substances that act like hormones in the endocrine system and disrupt the physiologic function of endogenous hormones; these ones with estrogenic effects are named xenoestrogens. Perinatal female reproductive tract development represents a critical differentiation period, since exposure to endocrine disruptors can have long-term negative consequences for adult uterine function and reproductive health. From the 1940s to the 1970s, the xenoestrogen diethylstilbestrol (DES) was extensively prescribed to pregnant women to prevent miscarriage. Women exposed to DES *in utero* (DES daughters) exhibit genital tract abnormalities later in life. In this sense, perinatal exposure of laboratory rodents to DES generates a spectrum of reproductive tract lesions similar to those observed in humans. Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen employed in the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins, and thus it is present in a myriad of products: interior coating of tins, milk containers, baby formula bottles, dental materials, etc. *In vivo* studies in laboratory rodents and wildlife, it has been established that BPA can induce alterations in the reproductive functions. Using different animal models, was demonstrated that perinatal BPA exposure affects reproductive parameters in adult animals, such as neuroendocrine axis development, mammary gland and prostate morphology, estrous cyclicity patterns and sexual behavior.

Objectives

Evaluate the angiogenic process and its possible mechanism of regulation in the pregnant rat uterus and cervix. In addition, investigate the influence of neonatal exposure to xenoestrogenic substances on the development of the uterine vascular compartment and in the female reproductive performance.

- 1- Evaluate, qualitative and quantitatively, parameters that characterize angiogenesis (endothelial proliferation, vascular density and maturation, and VEGF expression) in intact pregnant rat uterine cervix.
- 2- Evaluate the participation of the immune system in the angiogenic process by: a) determining MCs and macrophages densities in the uterine cervix during estrous cycle, pregnancy and postpartum, b) investigating MC function in cervical angiogenesis during gestation.
- 3- Evaluate whether neonatal exposure to environmental estrogens, such as, BPA and DES modifies parameters related with: a) uterine angiogenesis in adults, and b) reproductive performance (corpora lutea numbers, implantation sites, pre- and post- implantation loss).

Materials and methods

Female adult rats of a Wistar-derived strain were used. To obtain pregnant specimens, proestrous females were caged overnight with males of proven fertility. Rats were randomly assigned to each of the different experimental groups. The rats were injected i.p. with bromodeoxyuridine (BrdU) 2 h before they were killed. In order to evaluate angiogenesis during pregnancy, whole cervixes were dissected from day 12 (D12) up to D23. Tissue samples were fixed and then embedded in paraffin. Sections of whole cervixes were taken along the cervical canal and used for immunohistochemistry (IHC) assays. Evaluation of the *absolute and relative vascular areas* was done on sections immunostained with the anti-von Willebrand factor (vWF) antibody and calculated using an image analysis technique. The sum of all individual vascular areas in each section on uterine cervix was considered as the absolute vascular area. The relative vascular area was determined by dividing the absolute vascular area by the total area occupied by the cervical stroma. *Endothelial cell proliferation* was evaluated by BrdU incorporation. The percentage of proliferating endothelial

cells was determined on the subepithelial and muscular stroma. *Vascular maturation* index was determined using the α -smooth muscle actin (α -SMA) immunodetection in order to identify pericytes and vascular smooth muscle cells. This index was calculated by dividing the area occupied by α -SMA-positive vessels by the relative vascular area. Total VEGF mRNA expression and the relative abundance of VEGF splice variants (120, 164, and 188) were determined using uterine cervix samples that were snap frozen in liquid nitrogen. RNA extraction was performed and then competitive PCR was employed to analyze the expression levels of VEGF mRNA transcripts. Detection of the VEGF mRNA splice variants was carried out by multiplex PCR. To determine serum E₂ levels by RIA, peripheral blood was collected from jugular vein from D3 up to D23 of gestation.

In order to evaluate macrophage and MC numbers, rat uterine cervixes were dissected from: (a) normal cycling virgin females at noon of estrus and diestrus II, (b) pregnant females at D9, and D12 to D23 and (c) postpartum females, killed 24, 48 and 72 h after delivery (PP1, 2 and 3, respectively). MC evaluation was performed in sections immunostained for *rat mast cell proteinase-1* (RMCP-I). Macrophages were identified using a monoclonal antibody that recognizes a glycoprotein on the lysosomal membrane of rat tissue macrophages.

To investigate the role of MCs on cervical angiogenesis, a set of pregnant animals were treated with an MC stabilizer (disodium cromoglycate) to inhibit MC degranulation. Each experimental rat was allocated to one of three (a–c) experimental groups: (a) T14, treated with the MC stabilizer daily from D12 to D14 and killed on D14; (b) T18, treated with MC stabilizer from D12 to D18 and killed on D18; (c) T22, treated with MC stabilizer from D12 to D18 and killed on D22; or equivalent control groups injected with saline solution (C14, C18 and C22). In order to evaluate the effect of MC stabilizing treatment, the percentage of degranulated MCs was compared between MC stabilizer-treated and control rats. Also, endothelial cell proliferation, vascular areas (absolute and relative) and vascular maturation indices were assessed by quantitative IHC. In addition, total VEGF mRNA expression and the relative abundance of

VEGF splice variants were determined by RT-PCR and VEGF protein expression was evaluated by IHC. Furthermore, E₂ serum levels were established by RIA. To investigate a possible role of MC degranulation on macrophage distribution, this immune cell was also evaluated.

In order to evaluate the long-term effects of neonatal xenoestrogen exposure, we used a model of adult ovariectomized (OVX) rats with hormonal replacement treatment that consisted in two daily doses of Pg followed by single doses of both Pg and Eg (OVX-P+E group). Other set of rats received daily doses of vehicle (OVX group). Sixteen hours after the last treatment, each rat was injected with BrdU. Uterine tissues were harvested 4 h after the BrdU injection. One uterine horn from each rat was placed immediately in liquid nitrogen and stored at -80 C for RNA extraction. The other uterine horn was fixed and embedded in paraffin for IHC staining. First, we characterized this model evaluating by IHC the positive nestin vascular area, endothelial cell proliferation, and VEGF expression. Also we determined the VEGF mRNA levels by reverse transcription and real time PCR. Second, newborn females were treated on postnatal days 1, 3, 5, 7 with vehicle, BPA.05 (0.05 mg/kg/day), BPA20 (20 mg/kg/day), or DES (0.2 µg/kg/day). At 80 days of age, the animals were OVX and treated with the above-described steroid replacement treatment. In addition to the characterization of the experimental model, we determined the expression of steroid receptors (ER α and PR) and nuclear receptor coregulators (*SMRT*: silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor; *SRC-3*: steroid receptor coactivator 3) on subepithelial stroma by IHC and images analysis.

At 80 days of age, other set of control and xenoestrogen-treated female rats were housed with males for 2 consecutive weeks to allow the maximal possibility of pregnancy. Coitus was ascertained daily by vaginal smears, the day in which spermatozoa were found in the smear was considered day 1 of pregnancy. The pregnancy rates were calculated and pregnant females were sacrificed under ether anaesthesia on D18 of pregnancy. The number of corpora lutea (CL) was determined and the number of implantation sites were identified and classified as viable and non-viable fetuses (resorption sites).

Results

The evaluation of angiogenic parameters showed that the absolute vascular area in the uterine cervix increased significantly during pregnancy with higher values before parturition; however, the relative vascular area did not show significant differences. These results suggest that blood vessel growth was in parallel with the dramatic size increase that occurs in the uterine cervix towards the end of gestation. Moreover, in the subepithelial stroma and in the muscular region of the uterine cervix an increase in endothelial proliferation towards the end of gestation was found. The vascular maturation index was high on D12 of pregnancy, and thereafter decreased on D14–D15. From D18 to the time of parturition, there were a high proportion of mature vessels. The VEGF mRNA levels changed significantly during pregnancy showing higher expression on D14 and D18 of gestation compared with D12 and D22. VEGF mRNA expression was positively correlated with endothelial cell proliferation and circulating E_2 levels. Three different splice variants of VEGF mRNA (VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄, and VEGF₁₈₈) were detected and the relative contribution of each other to the total expression did not show any change, clearly suggesting that the splicing mechanism of the VEGF mRNA was not modified throughout gestation.

No significant differences were found in MC density between diestrus II and estrus. The relative presence of MCs in the uterine cervix throughout pregnancy was higher during the first half of pregnancy (D9 and D12) with a significant decrease during the second half (D14–D22). After parturition, the density of MC was significantly increased and remained elevated until PP3. The MCs were usually observed in the perivascular zones. The antibody employed to detect MCs was successfully used to identify both non-degranulated and degranulated MCs. All animals that received MC stabilizer showed more than 40% of non-degranulated MCs. In relation to the angiogenic process, treated rats exhibited a decrease in endothelial proliferation and in relative vascular area; in addition, a large proportion of mature blood vessels was observed, suggesting a diminished level of new vessel formation. The effects of the MC stabilizer were sustained beyond the end of treatment. Moreover, animals treated with disodium cromoglycate

showed a decrease in VEGF mRNA expression compared with controls. Relative abundance of VEGF mRNA splice variants and E₂ serum levels showed no differences between these experimental groups.

Regarding macrophages evaluation no differences were found in macrophage density during estrous cycle. Macrophages density was increased in the uterine cervix towards the end of pregnancy, reaching maximum values just before parturition (D20 and D21) and decreasing in the postpartum. An inverse pattern of temporal changes in macrophage and MC distribution along pregnancy was observed. Interestingly, disodium cromoglycate-treated rats showed an increased number of macrophages. In the uterine cervix from either controls or disodium cromoglycate treated rats, immunoreactive VEGF protein was detected in luminal epithelium, endothelium and smooth muscle. VEGF expression in macrophages was detected neither in control nor in treated animals; however, a coordinated action between MC and macrophages on angiogenesis could not be excluded.

In addition, we studied whether neonatal BPA or DES exposure affects the long-term uterine response to hormonal steroid stimuli in adult rats. Results from the study performed to characterize the model of OVX rats revealed that animals treated with Pg plus Eg (OVX-P+E group) exhibited: 1) an up-regulation of nestin expression specifically in the endothelial compartment, 2) a increase of BrdU incorporation in endothelial cells, and 3) an induction of VEGF expression compared to OVX adult rats injected with oil (OVX group). In the contrary, females neonatally exposed to xenoestrogens showed no differences in nestin expression. The proportion of endothelial cells that incorporated BrdU in DES and both doses of BPA groups was significantly lower than in control animals. Notably, the ovarian steroid induction of VEGF mRNA expression was significantly attenuated in neonatally xenoestrogen-exposed rats compared with controls; however, VEGF protein expression in rats exposed to BPA₂₀ showed no differences compared with controls, whereas in DES and BPA_{0.5} animals a significant down regulation was observed. DES treated rats showed a decrease in PR and ER α expression in the subepithelial stroma. In addition, in rats exposed to BPA_{0.05} a lower ER α expression was observed in

endothelial cells. BPA-exposed animals showed no differences in PR expression in this histological compartment; however, a clear up regulation of SMRT was detected. No differences were observed in the SRC-3 expression between experimental groups.

An association between neonatal xenoestrogen exposure and subfertility was observed in this experiment. Although no differences were found in pregnant rat's rate and numbers of corpora lutea, there was a significant decrease in the number of implantations sites in animals exposed to DES and BPA20. The decrease in the number of implantation sites can explain the fewer developing fetus found in these groups. There were no significant differences in the number of resorptions in treated females.

Conclusions

1) Using intact pregnant rats, we have demonstrated that the vascular tree of the uterine cervix is an active cellular compartment showing striking changes in the relative area occupied by vessels, endothelial proliferation and vascular maturation. These modifications were associated with changes in VEGF expression. Together, these cellular events reflect an active angiogenic process throughout gestation in the uterine cervix.

2) The MC degranulation could be a necessary process to control the normal angiogenesis of the rat cervix during pregnancy and we suggest that the effect occur via a VEGF dependent pathway.

3) An association between macrophages and MC along pregnancy is shown in the rat uterine cervix. Also, it was found that macrophage density in the rat cervix is modulated by MC degranulation, suggesting a possible coordinated action on angiogenesis control.

4) Neonatal exposure to xenoestrogen altered the normal steroid hormone-responsiveness in the uterus of adult female rats, showing a fail in VEGF gene activation and a decrease in endothelial cell proliferation. In parallel, changes in ER α and PR expression were found at a time where an abnormal overexpression of the corepressor SMRT was showed, suggesting that neonatal xenoestrogen exposure alters the transcriptional machinery of steroid-dependent genes.

5) Finally, in addition to mentioned effects, females exposed to xenoestrogens were subfertile.

The results obtained with this Thesis aspire to contribute to the understanding of angiogenesis as a necessary physiological process for a successful labor. In addition, provide experimental evidences about the effects of xenoestrogen exposure on reproductive health that can be used as a base to elaborate future norms that will regulate the degree of human and wild life exposition to these chemicals.

IX- BIBLIOGRAFÍA

Akbas; G.E.; Song; J.; Taylor; H.S. (2004). A HOXA10 estrogen response element (ERE) is differentially regulated by 17 beta-estradiol and diethylstilbestrol (DES). *J Mol Biol* 340: 1013-1023.

Albrecht; E.D.; Pepe; G.J. (2003). Steroid hormone regulation of angiogenesis in the primate endometrium. *Front Biosci* 8: 416-429.

Albrecht; K.H.; Eicher; E.M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240: 92-107.

Al-Hiyasat, A.S.; Darmani, H.; Elbetieha, A.M. (2004). Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *Eur J Oral Sci* 112: 267-272.

Ali, M.; Buhimschi, I.; Chawlisz, K.; Garfield, R.E. (1997). Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 3: 995-1003.

Bazer, F. (1999). Maintenance of Pregnancy. En: Encyclopedia of Reproduction. Eds. Knobil, E.; Neill, J.D, Academic Press, New York, USA, 1002-1006.

Beato, M.; Sánchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17: 587-609.

Benítez-Bribiesca, L.; Wong, A.; Utrera, D.; Castellanos, E. (2001). The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem* 49: 1061-1062.

Berger, R.G.; Hancock, T.; deCatanzaro, D. (2007). Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reprod Toxicol* 23: 138-144.

Block, K.; Kardana, A.; Igarashi, P.; Taylor, H.S. (2000). In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing müllerian system. *FASEB J* 14: 1101-1108.

Bridges, R.S.; Byrnes, E.M. (2006). Reproductive experience reduces circulating 17 beta-estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology* 147: 2575-2582.

Brotons, J.A.; Olea-Serrano, M.F.; Villalobos, M.; Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environ Health Perspect* 103: 608-612.

Buhimschi, I.; Ali, M.; Jain, V.; Chawlisz, K.; Garfield, R.E. (1996). Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod* 11: 1755-1766.

Burger, L.L.; Sherwood, O.D. (1998). Relaxin increases the accumulation of new epithelial and stromal cells in the rat cervix during the second half of pregnancy. *Endocrinology* 139: 3984-3995.

Burow, M.E.; Tang, Y.; Collins-Burow, B.M.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; McLachlan, J.A.; Beckman, B.S. (1999). Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 20: 2057-2061.

Byrne, A.M.; Bouchier-Hayes, D.J.; Harmey, J.H. (2005). Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9: 777-794.

Bytautiene, E.; Vedernikov, Y.P.; Saade, G.R.; Romero, R.; Garfield, R.E. (2002). Endogenous mast cell degranulation modulates cervical contractility in the guinea pig. *Am J Obstet Gynecol* 186: 438-445.

Calafat, A.M.; Kuklennyik, Z.; Reidy, J.A.; Caudill, S.P.; Ekong, J.; Needham, L.L. (2005). Urinary concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113: 391-395.

Carmeliet, P.; Ng, Y.S.; Nuyens, D.; Theilmeier, G.; Brusselmans, K.; Cornelissen, I.; Ehler, E.; Kakkar, V.V.; Stalmans, I.; Mattot, V.; Perriard, J.C.; Dewerchin, M.; Flameng, W.; Nagy, A.; Lupu, F.; Moons, L.; Collen, D.; D'Amore, P.A.; Shima, D.T. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5: 495-502.

Chan, Y.L.; Lin, A.; McNally, J.; Peleg, D.; Meyuhas, O.; Wool, I.G. (1987). The primary structure of rat ribosomal protein L19. A determination from the

sequence of nucleotides in a cDNA and from the sequence of amino acids in the protein. *J Biol Chem* 262: 1111-1115.

Chau, C.H.; Chen, K.Y.; Deng, H.T.; Kim, K.J.; Hosoya, K.; Terasaki, T.; Shih, H.M.; Ann, D.K. (2002). Coordinating Etk/Bmx activation and VEGF upregulation to promote cell survival and proliferation. *Oncogene* 21: 8817-8829.

Chien, E.K.; Ji, H.; Feltovich, H.; Clark, K. (2005). Expression of matrix metalloproteinase-3 in the rat cervix during pregnancy and in response to prostaglandin E2. *Am J Obstet Gynecol* 192: 309-317.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Clark, K.; Ji, H.; Feltovich, H.; Janowski, J.; Carroll, C.; Chien, E.K. (2006). Mifepristone induced cervical ripening: structural; biomechanical; and molecular events. *Am J Obstet Gynecol* 194: 1391-1398.

Cocchiara, R.; Albeggiani, G.; Di Trapani, G.; Azzolina, A.; Lampiasi, N.; Rizzo, F.; Diotallevi, L.; Gianaroli, L.; Geraci, D. (1992) Oestradiol enhances in vitro the histamine release induced by embryonic histamine-releasing factor (EHRF) from uterine mast cells. *Hum Reprod* 7: 1036-1041.

Colborn, T.; Clement, C. (1992). Statement from the work session on chemically-induced alteration in sexual and functional development: the wildlife/human connection: *Advances in Modern Environmental Toxicology*; Princetown Scientific Publishers. Vol XXI.

Connolly, D.T.; Heuvelman, D.M.; Nelson, R.; Olander, J.V.; Eppley, B.L.; Delfino, J.J.; Siegel, N.R.; Leimgruber, R.M.; Feder, J. (1989b). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478.

Connolly, D.T.; Olander, J.V.; Heuvelman, D.; Nelson, R.; Monsell, R.; Siegel, N.; Haymore, B.L.; Leimgruber, R.; Feder, J. (1989). Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 264: 20017-20024.

Cooke, P.S.; Buchanan, D.L.; Young, P.; Setiawan, T.; Brody, J.; Korach, K.S.; Taylor, J.; Lubahn, D.B.; Cunha, G.R. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6535-6540.

Couse, J.F.; Korach, K.S. (1999). Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol* 60: 143-148.

Crowther, M.; Brown, N.J.; Bishop, E.T.; Lewis, C.E. (2001). Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 70: 478-490.

Cullinan-Bove, K.; Koos, R.D. (1993). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 133: 829-837.

Daftary, G.S.; Taylor, H.S. (2006). Endocrine regulation of HOX genes. *Endocrine Reviews* 27: 331-355.

Danforth, D.R.; Arbogast, L.K.; Ghosh, S.; Dickerman, A.; Rofagha, R.; Friedman, C.I. (2003). Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod* 68: 1736-1741.

Dey, S.K.; Lim, H.; Das, S.K.; Reese, J.; Paria, B.C.; Daikoku, T.; Wang, H. (2004). Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25: 341-373.

Ding, Y.H.; Li, J.; Zhou, Y.; Rafols, J.A.; Clark, J.C.; Ding, Y. (2006). Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res* 3: 15-23.

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

Dodds, E.C.; Lawson, W. (1936). Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137: 996.

Dubey, R.K.; Rosselli, M.; Imthurn, B.; Keller, P.J.; Jackson, E.K. (2000). Vascular effects of environmental oestrogens: implications for reproductive and vascular health. *Hum Reprod Update* 6: 351-363.

Duboule, D.; Dollé, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J.* 8: 1497-1505.

Duchesne, M.J.; Badia, E. (1992). Immunohistochemical localization of the eosinophil major basic protein in the uterus horn and cervix of the rat at term and after parturition. *Cell Tissue Res* 270: 79-86.

Durando, M.; Kass, L.; Piva, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Luque, E.H.; Muñoz-De-Toro, M. (2007). Prenatal Bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 115: 80-86.

Dvorak, H.F. (2000). VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin Perinatol* 24: 75-78.

Dvorak, H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20: 4368-4380.

Eckhart, L.; Ban, J.; Ballaun, C.; Weninger, W.; Tschachler, E. (1999). Reverse transcription-polymerase chain reaction products of alternatively spliced mRNAs form DNA heteroduplexes and heteroduplex complexes. *The J Biol Chem* 274: 2613-2615.

El-Banna, A.A.; Hafez, E.S. (1972). The uterine cervix in mammals. *Am J Obstet Gynecol* 112: 145-164.

Ferrara, N.; Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858.

Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Review* 18: 4-25.

Ferrara, N. (1999). Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56: 794-814.

Ferrara, N.; Gerber, H.P.; LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676.

Finkenzeller, G.; Sparacio, A.; Technau, A.; Marmé, D.; Siemeister, G. (1997). Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 15: 669-676.

Folkman, J. (1982). Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci* 401: 212-27.

Fong, G.H.; Rossant, J.; Gertsenstein, M.; Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70.

Freeman, M.E. (1988). The ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds: Knobil, E.; Neill, J.D., et al. ,Raven Press Ltd., New York, pp. 1893-1928.

Fukushima, N.; Satoh, T.; Sano, M.; Tokunaga, O. (2001). Angiogenesis and mast cells in non-hodgkin's lymphoma: a strong correlation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 42: 709-720.

Funk, C.R.; DeMayo, F.J. (1999). Progesterone actions on reproductive tract. En: *Encyclopedia of Reproduction*. 6-16. Eds: Knobil, E.; Neill, J.D.; Academic Press, New York, USA.

Garfield, R.E.; Saade, G.; Buhimschi, C.; Buhimschi, I.; Shi, L.; Shi, S.Q.; Chwalisz, K. (1998). Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod Update* 4: 673-695.

Geneser, F. (2000). Organos de la reproducción, En: *Histología, Sobre Bases Biomoleculares*. 3era edición. Ed: Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp 613-637.

- Gibson, S.; Miller, H.R.P. (1986). Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases. *Immunology* 58: 101-104.
- Gille, J.; Swerlick, R.A.; Caughman, S.W. (1997). Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J* 16: 750-749.
- Gillitzer, R.; Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69: 513-521.
- Gluzman-Poltorak, Z.; Cohen, T.; Herzog, Y.; Neufeld, G. (2000). Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem* 275: 18040-18045.
- Goodger, A.M.; Rogers, P.A. (1993). Uterine endothelial cell proliferation before and after embryo implantation in rats. *J Reprod Fertil* 99: 451-457.
- Goth, M.I.; Hubina, E.; Raptis, S.; Nagy, G.M.; Toth, B.E. (2003). Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. *Micros Res Tech* 60: 98-106.
- Graham, J.D.; Clarke, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18: 502-519.
- Gray, C.A.; Bartol, F.F.; Tarleton, B.J.; Wiley, A.A.; Johnson, G.A.; Bazer, F.W.; Spencer, T.E. (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65: 1311-1323.
- Griffioen, A.W.; Molema, G. (2000). Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer; cardiovascular diseases; and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52: 237-26.
- Gundersen, H.J.G.; Bendtsen, T.F.; Korbo, L.; Marcussen, N.; Moller, A.; Nielsen, K.; Nyengaard, J.R.; Pakkenberg, B.; Sorensen, F.B.; Vesterby, A.; West, M.J. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 379-394.

- Gunin, A.G.; Sharov, A.A. (1998). Role of mast cells in oestradiol effects on the uterus of ovariectomized rats. *J Reprod Fertil* 112: 61-68.
- Halder, J.B.; Zhao, X.; Soker, S.; Paria, B.C.; Klagsbrun, M.; Das, S.K.; Dey, S.K. (2000). Differential expression of VEGF isoforms and VEGF (164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis* 26: 213-224.
- Hall, J.M.; McDonnell, D.P. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 5: 343-357.
- Haqq, C.M.; Donahoe, P.K. (1998). Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol Rev* 78: 1-33.
- Harlow, E.; Lane, D. (1998). Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. EE.UU.
- Hastings, J.M.; Licence, D.R.; Burton, G.J.; Charnock-Jones, D.S.; Smith, S.K. (2003). Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17beta-estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology* 144: 326-334.
- Heery, D.M.; Kalkhoven, E.; Hoare, S.; Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733-736.
- Herbst, A.L.; Ulfelder, H.; Poskanzer, D.C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 284: 878-881.
- Heryanto, B.; Rogers, P.A. (2002). Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. *Reproduction* 123: 107-113.
- Heryanto, B.; Lipson, K.E.; Rogers, P.A. (2003). Effect of angiogenesis inhibitors on oestrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. *Reproduction* 125: 337-346.

- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11: 1026-1030.
- Hiromatsu, Y.; Toda, S. (2003). Mast cells and angiogenesis. *Micros Res Tech* 60: 64-69.
- Honma, S.; Suzuki, A.; Buchanan, D.L.; Katsu, Y.; Watanabe, H.; Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* 16: 117-122.
- Houck, K.A.; Ferrara, N.; Winer, J.; Cachianes, G.; Li, B.; Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814.
- Howdeshell, K.L.; Hotchkiss, A.K.; Thayer, K.A.; Vandenberg, J.G.; vom Saal, F.S. (1999). Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764.
- Howe, S.R.; Borodinsky, L. (1998). Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of polycarbonate resins. *Food Addit Contam* 15: 370-375.
- Hyder, S.M.; Stancel, G.M.; Chiappetta, C.; Murthy, L.; Boettger-Tong, H.L.; Makela, S. (1996). Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res* 56: 3954-3960.
- Hyder, S.M.; Stancel, G.M. (2000). Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones. *Histol Histopathol* 15: 325-334.
- Iguchi, T.; Takasugi, N.; Bern, H.A.; Mills, K.T. (1986). Frequent occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Teratology* 34: 29-35.
- Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693.
- Jefferson, W.N.; Newbold, R.R. (2000). Potential endocrine-modulating effects of various phytoestrogens in the diet. *Nutrition* 16: 658-662.
- Jensen, E.; Jacobsen, H. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18: 387-414.

- Jost, A. (1947). Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morph Exp* 36: 271-315.
- Junqueira, L.C.U.; Junqueira L.M. (1983). Técnicas básicas de citología e histología. Ed. Livraria Santos Com. Imp. Ltda. Sao Paulo, Brasil.
- Kahari, V.M.; Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6: 199-213.
- Karuri, A.R.; Kumar, A.M.; Mukhopadhyay, D. (1998) Differential expression and selective localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in the rat uterus during the estrous cycle. *J Endocrinol* 159: 489-499.
- Kashida, S.; Sugino, N.; Takiguchi, S.; Karube, A.; Takayama, H.; Yamagata, Y.; Nakamura, Y.; Kato, H. (2001). Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol Reprod* 64: 317-323.
- Kass, L.; Varayoud, J.; Ortega, H.; Muñoz de Toro, M.; Luque, E.H. (2000). Detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissue. DNA denaturation following microwave or enzymatic digestion pretreatment is required. *Eur J Histochem* 44: 185-191.
- Kass, L.; Durando, M.; Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Powell, C.E.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M. (2004). Association of increased estrogen receptor β 2 expression with parity-induced alterations in the rat mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91: 29-39.
- Katayama, S.; Ashizawa, K.; Fukuhara, T.; Hiroyasu, M.; Tsuzuki, Y.; Tatemoto, H.; Nakada, T.; Nagai, K. (2006). Differential expression patterns of Wnt and beta-catenin/TCF target genes in the uterus of immature female rats exposed to 17alpha-ethynyl estradiol. *Toxico Sci* 91: 419-430.
- Kato, H.; Ota, T.; Furuhashi, T.; Ohta, Y.; Iguchi, T. (2003). Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 17: 283-288.
- Kazi, A.A.; Jones, J.M.; Koos, R.D. (2005). Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced

recruitment of both estrogen receptor α and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. *Mol Endocrinol* 19: 2006-2019.

Kazi, A.A.; Koos, R.D. (2007). Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* 148: 2363-2374.

Keck, P.J.; Hauser, S.D.; Krivi, G.; Sanzo, K.; Warren, T.; Feder, J.; Connolly, D.T. (1989). Vascular permeability factor; an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312.

Khurana, S.; Ranmal, S.; Ben-Jonathan, N. (2000). Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 141: 4512-4517.

Kitsukawa, T.; Shimizu, M.; Sanbo, M.; Hirata, T.; Taniguchi, M.; Bekku, Y.; Yagi, T.; Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19: 995-1005.

Kressler, D.; Hock, M.B.; Kralli, A. (2007). Coactivators PGC-1 β and SRC-1 interact functionally to promote the agonist activity of the selective estrogen receptor modulator tamoxifen. *J Biol Chem* 282: 26897-16907.

Kuiper, G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci* 93: 5925-5930.

Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Häggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-870.

Kurita, T.; Lee, K.; Cooke, P.S.; Taylor, J.A.; Lubahn, D.B.; Cunha, G.R. (2000). Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod* 62: 821-830.

- Kurita, T.; Cunha, G.R. (2001). Roles of p63 in differentiation of Müllerian duct epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 948: 9-12.
- Kushner, P.J.; Agard, D.A.; Greene, G.L.; Scanlan, T.S.; Shiau, A.K.; Uht, R.M.; Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 311-317.
- Lacau-Mengido, I.M.; Mejía, M.E.; Díaz-Torga, G.S.; Gonzalez Iglesias, A.; Formía, N.; Libertun, C.; Becú-Villalobos, D. (2000). Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *J Anim Sci* 78: 817-824.
- Lawson, P.T. (2001). Genetics and breeding. In: Laboratory animal technician: training manual. Ed: Lawson PT. American Association for Laboratory Animal Science, Memphis; Tenn, pp. 27-37.
- Lee, H.Y.; Sherwood, O.D. (2005). The effects of blocking the actions of estrogen and progesterone on the rates of proliferation and apoptosis of cervical epithelial and stromal cells during the second half of pregnancy in rats. *Biol Reprod* 73: 790-797.
- Lefebvre, V.; Dumitriu, B.; Penzo-Méndez, A.; Han, Y.; Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2195-214.
- Leppert, P.C. (1998). The biochemistry and physiology of the uterine cervix during gestation and parturition. *Prenat Neonatal Med* 3: 103-105.
- Leung, D.W.; Cachianes, G.; Kuang, W.J.; Goeddel, D.V.; Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309.
- Levi-Schaffer, F.; Pe'er, J. (2001). Mast cells and angiogenesis. *Clin Exp Allergy* 31: 521-524.
- Liggins GC. (1981). Cervical ripening as an inflammatory reaction. En: The Cervix in Pregnancy and Labour; Clinical and Biochemical Investigations. 1-9. Eds: Ellwood D.A.; Anderson A.B.M., Churchill Livingstone, Edinburgh, Escosia.

- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.W.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4ta edición. Eds: Freeman; W.H. Media Connected, New York, USA.
- Lohmiller, J.J.; Swing, S.P. (2006). Reproduction and breeding. In: *The laboratory rat*. Eds: Suckow, M.A.; Weisbroth, S.H.; Franklin, C.L. American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, pp 147-165.
- Lonard, D.M.; O'Malley, B.W. (2006). The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* 125: 411-414.
- Long, X.; Burke, K.A.; Bigsby, R.M.; Nephew, K.P. (2001) Effects of the xenoestrogen bisphenol A on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 477-483.
- Ludmir, J.; Sehdev, H.M. (2000). Anatomy and physiology of the uterine cervix. *Clin Obstet Gynecol* 43: 433-439.
- Luo, Y.; Raible, D.; Raper, J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75: 217-227.
- Luque, E.H.; Montes, G.S. (1989). Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by the eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. *Anat Rec* 223: 257-265.
- Luque, E.H.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.A.; Muñoz-de-Toro, M. (1996). Dissociation in the control of cervical eosinophilic infiltration and collagenolysis at the end of pregnancy or after pseudopregnancy in ovariectomized steroid-treated rats. *Biol Reprod* 55: 1206-1212.
- Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.A.; Sherwood, O.D. (1998). Role of relaxin and estrogen in the control of eosinophilic invasion and collagen remodelling in rat cervical tissue at term. *Biol Reprod* 59: 795-800.
- Ma, L.; Benson, G.V.; Lim, H.; Dey, S.K.; Maas, R.L. (1998). Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in müllerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* 197: 141-154.

Ma, W.; Tan, J.; Matsumoto, H.; Robert, B.; Abrahamson, D.R.; Das, S.K.; Dey, S.K. (2001). Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol* 15: 1983-1992.

Mackler, A.M.; Iezza, G.; Akin, M.R.; McMillan, P.; Yellon, S.M. (1999). Macrophage trafficking in the uterus and cervix precedes parturition in the mouse. *Biol Reprod* 61: 879-883.

Maeda, K.I.; Ohkura, S.; Tsukamura, H. (2000) Physiology of reproduction. In: The laboratory rat. Ed: Krinke, G.J. Academic Press; San Diego; Calif. pp. 145-176.

Maffini, M.V.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol* 254-255: 179-186.

Markey, C.M.; Luque, E.H.; Muñoz-de-Toro, M.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2001). In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65: 1215-1223

Markey, C.M.; Coombs, M.A.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2003). Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev* 5: 67-75.

Markey, C.M.; Wadia, P.R.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2005). Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 72: 1344-1351.

Marti, H.H.; Risau, W. (1998). Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 15809-15814.

Martini, P.G.; Delage-Mourroux, R.; Kraichely, D.M.; Katzenellenbogen, B.S. (2000). Prothymosin alpha selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity. *Mol Cell Biol* 20: 6224-6232.

- Mericskay, M.; Carta, L.; Sassoon, D. (2005). Diethylstilbestrol exposure in utero: a paradigm for mechanisms leading to adult disease. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73: 133-135.
- Milgrom, E.; Baulieu, E.E. (1970). Progesterone in uterus and plasma. I. Binding in rat uterus 105000 g supernatant. *Endocrinology* 87: 276-286.
- Miller, C.; Pavlova, A.; Sassoon, D.A. (1998). Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mech Dev* 76: 91-99.
- Minamoto, T.; Arai, K.; Hirakawa, S.; Nagai, Y. (1987) Immunohistochemical studies on collagen types in the uterine cervix in pregnant and nonpregnant states. *Am J Obstet Gynecol* 156: 138-144.
- Mokry, J.; Cízková, D.; Filip, S.; Ehrmann, J.; Osterreicher, J.; Kolár, Z.; English, D. (2004). Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 13: 658-664.
- Molenda, H.A.; Kilts, C.P.; Allen, R.L.; Tetel, M.J. (2003). Nuclear receptor coactivator function in reproductive physiology and behavior. *Biol Reprod* 69: 1449-1457.
- Monje, L.; Varayoud, J.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. (2007). Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor {alpha} transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol* 194: 201-212
- Montes, G.S.; Luque, E.H. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat* 133: 192-199.
- Mor, G.; Abrahams, V.M. (2003). Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 119-126.
- Mowa, C.N.; Jesmin, S.; Sakuma, I.; Usip, S.; Togashi, H.; Yoshioka, M.; Hattori, Y.; Papka, R. (2004). Characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the uterine cervix over pregnancy: effects of denervation and implications for cervical ripening. *J Histochem Cytochem* 52: 1665-1674.

- Muller, Y.A.; Li, B.; Christinger, H.W.; Wells, J.A.; Cunningham, B.C.; de Vos, A.M. (1997). Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7192-7197.
- Muñoz-de-Toro, M.; Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Rodríguez, H.; Luque, E.H. (2003). Collagen remodeling during cervical ripening is a key event for successful vaginal delivery. *Braz J Morphol Sci* 20: 75-84.
- Muñoz-de-Toro, M.; Markey, C.M.; Wadia, P.R.; Luque, E.H.; Rubin, B.S.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters eripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146: 4138-4147.
- Muñoz-de-Toro, M.; Durando, M.; Beldoménico, P.M.; Beldoménico, H.R.; Kass, L.; García, S.R.; Luque, E.H. (2006). Estrogenic microenvironment generated by organochlorine residues in adipose mammary tissue modulates biomarker expression in ERalpha-positive breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 8: R47.
- Nalbandov, A.V. (1969). La estructura de los sistemas reproductores. En: Fisiología de la Reproducción. Ed. Nalbandov; AV; Acribia; Zaragoza; España; pp 26-62.
- National Research Council; USA. (1999). Hormonally Active agents in the Environment. National Academy Press, New York, USA.
- Neufeld, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.
- Neufeld, G.; Kessler, O.; Herzog, Y. (2002). The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol* 515: 81-90.
- Newbold, R.R.; Jefferson, W.N.; Grissom, S.F.; Padilla-Banks, E.; Snyder, R.J.; Lobenhofer, E.K. (2007). Developmental exposure to diethylstilbestrol alters uterine gene expression that may be associated with uterine neoplasia later in life. *Mol Carcinog* 46: 783-796.
- Norrby, K. (2002). Mast cells and angiogenesis. *AMPIS* 110: 355-371.

- Olea, N.; Pulgar, R.; Pérez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A.M.; Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104: 298-305.
- Olea, N.; Fernández, M.F.; Araque, P.; Olea-Serrano, F. (2002). Perspectives on endocrine disruption. *Gac Sanit* 16: 250-256.
- Oñate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J.; O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357.
- Painter, T. (1923). Further observations on the sex chromosomes of mammals. *Science* 58: 247-248.
- Palmer, J.R.; Wise, L.A.; Hatch, E.E.; Troisi, R.; Titus-Ernstoff, L.; Strohsnitter, W.; Kaufman, R.; Herbst, A.L.; Noller, K.L.; Hyer, M.; Hoover, R.N. (2006). Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1509-1514.
- Paria, B.C.; Song, H.; Dey, S.K. (2001). Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int J Dev Biol* 45: 597-605.
- Pavao, M.; Traish, A.M. (2001). Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection; localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* 66: 1-16.
- Pavelock, K.; Braas, K.M.; Ouafik, L.; Osol, G.; May, V. (2001). Differential expression and regulation of the vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and neuropilin-2 in rat uterus. *Endocrinology* 142: 613-622.
- Pavlova, A.; Boutin, E.; Cunha, G.; Sassoon, D. (1994). Msx1 (Hox-7.1) in the adult mouse uterus: cellular interactions underlying regulation of expression. *Development* 120: 335-346.
- Perez Martinez M.; Romano Pardo M.C. (1996). Interacción neuroendócrina en el útero: papel de las hormonas esteroides sexuales. Ciencia veterinaria. Ed. Ricardo Moreno Chan. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Perissi, V.; Staszewski, L.M.; McInerney, E.M.; Kurokawa, R.; Kronen, A.; Rose, D.W.; Lambert, M.H.; Milburn, M.V.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13: 3198-3208.
- Phillips, H.S.; Hains, J.; Leung, D.W.; Ferrara, N. (1990) Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 127: 965-967.
- Plouët, J.; Moro, F.; Bertagnolli, S.; Coldeboeuf, N.; Mazarguil, H.; Clamens, S.; Bayard, F. (1997). Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 272: 13390-13396.
- Polverini, P.J.; Cotran, P.S.; Gimbrone, M.A.Jr.; Unanue, E.R. (1977). Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269: 804-806.
- Privalsky, M.L. (2004). The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 66: 315-360.
- Ptashne, M.; Gann, A.A. (1990). Activators and targets. *Nature*. 346: 329-331.
- Puxeddu, I.; Ribatti, D.; Crivellato, E.; Levi-Schaffer, F. (2005). Mast cells and eosinophils: A novellink between inflammation and angiogenesis in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116: 531-536.
- Qu, Z.; Kayton, R.J.; Ahmadi, P.; Liebler, J.M.; Powers, M.R.; Planck, S.R.; Rosenbaum, J.T. (1998). Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in mast cell secretory granules: morphological evidence for bFGF release through degranulation. *J Histochem Cytochem* 46: 1119-1128.
- Rabbani, M.L.; Rogers, P.A. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 122: 85-90.
- Ramakrishnan, R.; Zell, J.A.; Malavé, A.; Rathinavelu, A. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in GI-101A and HL-60 cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 709-713.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodriguez, H.; Muñoz-de-Toro, M.; Montes, G.S.; Luque, E.H. (2000). Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. *Steroids* 65: 409-414.

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

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

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodríguez, H.; Costabel, L.; Muñoz-De-Toro, M.M.; Luque, E.H. (2003). Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 144: 3206-3215.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Monje, L.; Moreno-Piovano, G.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. (2007). Diethylstilbestrol alters the population dynamic of neural precursor cells in the neonatal male rat dentate gyrus. *Brain Res Bull* 71: 619-627.

Reynolds, L.P.; Grazul-Bilska, A.T.; Redmer, D.A. (2002). Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int J Exp Pathol* 83: 151-163.

Ribatti, D.; Crivellato, E.; Candussio, L.; Nico, B.; Vacca, A.; Roncali, L.; Dammacco, F. (2001). Mast cells and their secretory granules are angiogenic in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Clin Exp Allergy* 31: 602-608.

Rider, V.; Thomson, E.; Seifert, C. (2003). Transit of rat uterine stromal cells through G1 phase of the cell cycle requires temporal and cell-specific hormone-dependent changes on cell cycle regulators. *Endocrinology* 144: 5450-5458.

Rockwell, L.C.; Pillai, S.; Olson, C.E.; Koos, R.D. (2002). Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biol Reprod* 67: 1804-1810.

- Roy, H.; Bhardwaj, S.; Ylä-Herttuala, S. (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters* 580: 2879-2887.
- Rubin, B.S.; Murria, M.K.; Damaza, D.A.; King, J.C.; Soto, A.M. (2001). Perinatal exposure to low doses of Bisphenol A affects body weight; patterns of cyclicity; and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109: 675-680.
- Rudolph, M.I.; Reinicke, K.; Cruz, M.A.; Gallardo, V.; Gonzalez, C.; Bardisa, L. (1993). Distribution of mast cells and the effect of their mediators on contractility in human myometrium. *Brit J Obstet Gynecol* 100: 1125-1130.
- Salimath, B.; Marmé, D.; Finkenzeller, G. (2000). Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* 19: 3470-3476.
- Sambrook, J.; Russell, D.V. (2001) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Third Edition.
- Sassoon, D. (1999). Wnt genes and endocrine disruption of the female reproductive tract: a genetic approach. *Mol Cell Endocrinol* 158: 1-5.
- Schepers, G.; Wilson, M.; Wilhelm, D.; Koopman, P. (2003). SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J Biol Chem* 278: 28101-28108.
- Schönfelder, G.; Friedrich, K.; Paul, M.; Chahoud, I. (2004). Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia* 6: 584-594.
- Senger, D.R.; Galli, S.J.; Dvorak, A.M.; Perruzzi, C.A.; Harvey, V.S.; Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.
- Sennström, M.K.B.; Brauner, A.; Lu, Y.; Granström, L.M.M.; Malmström, A.L.; Ekman, G.E. (1997). Interleukin-8 is a mediator of the final cervical ripening in humans. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 74: 89-92.
- Shalaby, F.; Rossant, J.; Yamaguchi, T.P.; Gertsenstein, M.; Wu, X.F.; Breitman, M.L.; Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66.

- Sharp, P.A.; Sugden, B.; Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
- Sherwood, O.D. (1994). Relaxin. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds: E Knobil, E.; Nelly, J.D. New York: Raven Press, pp 861–1009.
- Shimizu, T.; Sugawara, K.; Tosaka, M.; Imai, H.; Hoya, K.; Takeuchi, T.; Sasaki, T.; Saito, N. (2006). Nestin expression in vascular malformations: a novel marker for proliferative endothelium. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 46: 111-117.
- Shin, H.Y.; Kim, J.S.; An, N.H.; Park, R.K.; Kim, H.M. (2004). Effect of disodium cromoglycate on mast cell-mediated immediate type allergic reactions. *Life Sci* 74: 2877–2887.
- Shweiki, D.; Itin, A.; Neufeld, G.; Gitay-Goren, H.; Keshet, E. (1993). Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 91: 2235–2243.
- Siegel, S. (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill.
- Smith, C.L.; O'Malley, B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25: 45-71.
- Smith, M.S.; Freeman, M.E.; Neill, J.D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin; gonadotrophin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226.
- Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H.Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735-745.
- Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 143-150.

- Spangaard, H.; Knudsen, U.; Uldbjerg, N.; Jeziorska, M.; Woolley, D.; Danielsen, C. (1997). Mast cells in cervical ripening- an immunohistochemical and biomechanical study in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 73: 91-97.
- Stoker, C.; Rey, F.; Rodriguez, H.; Ramos, J.G.; Sirosky, P.; Larriera, A.; Luque, E.H.; Muñoz-De-Toro, M.M. (2003). Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol* 133: 287-296.
- Stoner, M.; Wormke, M.; Saville, B.; Samudio, I.; Qin, C.; Abdelrahim, M.; Safe, S. (2004). Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins. *Oncogene* 23: 1052-1063.
- Sugihara, T.; Wadhwa, R.; Kaul, S.C.; Mitsui, Y. (1998). A novel alternatively spliced form of murine vascular endothelial growth factor; VEGF 115. *J Biol Chemist* 273: 3033-3038.
- Sunderkötter, C.; Steinbrink, K.; Goebeler, M.; Bhardwaj, R.; Sorg, C. (1994). Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410-422.
- Tainsh, K.R.; Lau, H.Y.; Liu, W.L.; Pearse, F.L. (1991) The human skin mast cells: a comparison with the human lung cell and a novel mast cell type, the uterine mast cell. *Agents Actions Suppl* 33: 16-19.
- Takahashi, O.; Oishi, S. (2000). Disposition of orally administered 2;2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect* 108:931-935.
- Takahashi, H.; Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 109: 227-241.
- Takahashi, N.; Itoh, M.T.; Ishizuka, B. (2007). Human chorionic gonadotropin induces nestin expression in endothelial cells of the ovary via vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology* Oct 4
- Taylor, H.S.; Vanden Heuvel, G.B.; Igarashi, P. (1997). A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and

persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 57: 1338-1345.

Taylor, R.N.; Lebovic, D.I.; Hornung, D.; Mueller, M.D. (2001). Endocrine and paracrine regulation of endometrial angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 943: 109-121.

Thomas, K.; Wu, J.; Sung, D.Y.; Thompson, W.; Powell, M.; McCarrey, J.; Gibbs, R.; Walker, W. (2007). SP1 transcription factors in male germ cell development and differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 270: 1-7.

Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J.C.; Abraham, J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266: 11947-11954.

Toft, D.; Gorski, J. (1996). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 1574-1581.

Tonini, T.; Rossi, F.; Claudio, P.P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 22: 6549-6556.

Turner, H.E.; Harris, A.L.; Melmed, S.; Wass, J.A. (2003). Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 24: 600-632.

Unemori, E.N.; Ericsson, M.E., Rocco, S.E.; Sutherland, K.M.; Parsell, D.A.; Mak, J.; Grove, B.H. (1999). Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells *in Vitro* and is associated with menometrorrhagia in women. *Hum Reprod* 14: 800-806.

Vaitukaitis, J.; Robbins, J.B.; Nieschlag, E.; Ross G.T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol Metab* 33: 988-991.

Varayoud, J.; Ramos, J.G.; Joazeiro, P.P.; Montes, G.S.; Muñoz de Toro, M.; Luque, E.H. (2001). Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term. *Biol Reprod* 65: 375-383.

Varayoud, J. (2004). Control hormonal de las modificaciones histofisiológicas del cérvix uterino durante la preñez y el parto. Tesis presentada en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas (UNL).

Vigier, B.; Forest, M.G.; Eychenne, B.; Bézard, J.; Garrigou, O.; Robel, P.; Josso, N. (1989). Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3684-3688.

Vincenti, V.; Cassano, C.; Rocchi, M.; Persico, G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93: 1493-1495.

Völkel, W.; Colnot, T.; Csanády, G.A.; Filser, J.G.; Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15: 1281-1287.

vom Saal, F.S.; Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 113: 926-933.

vom Saal, F.S.; Welshons, W.V. (2006). Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ Res* 100: 50-76.

Walter, L.M.; Rogers, P.A.; Girling, J.E. (2005). The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomized mice. *Reproduction* 129: 765-777.

Wang, H.; Dey, S.K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 7: 185-199.

Weibel, E.R. (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 26: 235-302.

Weitlauf, H.M. (1994). The Biology of implantation. In: The Physiology of Reproduction. Eds. Knobil, E.; Neill J.D. Raven Press, New York, pp 391-440.

Wilhelm, D.; Martinson, F.; Bradford, S.; Wilson, M.J.; Combes, A.N.; Beverdam, A.; Bowles, J.; Mizusaki, H.; Koopman, P. (2005). Sertoli cell

differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* 287: 111-124.

Woolard, J.; Wang, W.Y.; Bevan, H.S.; Qiu, Y.; Morbidelli, L.; Pritchard-Jones, R.O.; Cui, T.G.; Sugiono, M.; Waine, E.; Perrin, R.; Foster, R.; Digby-Bell, J.; Shields, J.D.; Whittles, C.E.; Mushens, R.E.; Gillatt, D.A.; Ziche, M.; Harper, S.J.; Bates, D.O. (2004). VEGF165b; an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action; in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 64: 7822-7835.

Woosley, J.T. (1991). Measuring cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med* 115: 555-557

Wu, H.Y.; Hamamori, Y.; Xu, J.; Chang, S.C.; Saluna, T.; Chang, M.F.; O'Malley, B.W.; Kedes, L. (2005). Nuclear hormone receptor coregulator GRIP1 suppresses; whereas SRC1A and p/CIP coactivate; by domain-specific binding of MyoD. *J Biol Chem* 280: 3129-3137.

Xie, K.; Wei, D.; Shi, Q.; Huang, S. (2004). Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15: 297-324.

Young, A.; Thomson, A.J.; Ledingham, M.; Jordan, F.; Greer, I.A.; Norman, J.E. (2002). Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium; cervix; and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 66: 445-449.

Zaitsu, M.; Narita, S.; Lambert, K.C.; Grady, J.J.; Estes, D.M.; Curran, E.M.; Brooks, E.G.; Watson, C.S.; Goldblum, R.M.; Midoro-Horiuti, T. (2006). Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx. *Mol Immunol* 44: 1987-1995.

Zalko, D.; Soto, A.M.; Dolo, L.; Dorio, C.; Rathahao, E.; Debrauwer, L.; Faure, R.; Cravedi, J.P. (2003). Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111: 309-319.

Zhang, J.; Nie, G-Y.; Wang, J.; Woolley, D.E.; Salamonsen, L.A. (1998). Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation. *Biol Reprod* 59: 693–703.

Zhuang, Y.H.; Sarca, D.; Weisz, A.; Altucci, L.; Cicatiello, L.; Rollerova, E.; Tuohimaa, P.; Ylikomi, T. (2001). Cell type-specific induction of cyclin D and cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1) expression by estrogen in rat endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78: 193-199.

Zilberberg, L.; Shinkaruk, S.; Lequin, O.; Rousseau, B.; Hagedorn, M.; Costa, F.; Caronzolo, D.; Balke, M.; Carron, X.; Convert, O.; Lain, G.; Gionnet, K.; Goncalvès, M.; Bayle, M.; Bello, L.; Chassaing, G.; Deleris, G.; Bikfalvi, A. (2003). Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol Chem* 278: 35564-35573.

Páginas de internet

<http://e.hormone.tulane.edu/learning>

<http://www.angio.org>

<http://www.cdc.gov/des>

<http://www.angio.org/understanding>

<http://www.epa.gov>