

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



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

**FACTORES FISIOLÓGICOS QUE MODULAN LA
ESTEROIDOGÉNESIS HIPOCÁMPICA**

Lic. María Florencia Rossetti

Director de Tesis: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Co-Director de Tesis: Dra. Jorgelina Varayoud

**Instituto de Salud y Ambiente del Litoral
CONICET- Universidad Nacional del Litoral.
Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional del Litoral.**

Santa Fe

2016

A mi papá **Jorge** y mi hermano **Juan Pablo**, por su amor incondicional.

A mi mamá **Cecilia** y mi abuela **Lita**, mis estrellas en el cielo.

A **Fran**, mi compañero de vida.

“ Hay una fuerza motriz
más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica:

La Voluntad ”

Albert Einstein

Agradecimientos

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral**, por permitirme desarrollarme y crecer como profesional y como persona, no sólo a lo largo del Doctorado sino también en mi carrera de grado.

Al **CONICET**, por haberme otorgado la beca interna de posgrado que me permitió realizar el Doctorado y crecer profesionalmente.

Al **Dr. Jorge G. Ramos** y a la **Dra. Jorgelina Varayoud**, directores de esta Tesis Doctoral, por haberme guiado con sabiduría y amabilidad, brindándome todos los conocimientos necesarios para poder realizar este maravilloso trabajo de investigación.

Al **Dr. Enrique H. Luque** y **Dra. Mónica Muñoz de Toro**, por haber creado el espacio de investigación donde tuve la posibilidad de desarrollar parte de mi trabajo de investigación.

A todos mis **compañeros y amigos del ISAL y de Bioquímica Clínica**, Lu, Clari, Gabi, Flor, Chuli, Ale, Cami, Luisa, Adri, Lau, Vero, Silvi, Vir, Vero, Guillita, Nany, Pao, Mechi, Turco, Rami, Meli, Aye, Ger, Mile, Horacio, Juanca, Beti y Guillito por ayudarme cuando lo necesite, por cada mate, cada charla y cada momento compartido y por hacer de mi trabajo una tarea fácil y divertida.

A mis grandes **amigas de la vida** Flaca, Julia, Luli, Mechi, Ana, Lour, Bordi, Sol, Julieta y Angie por el cariño que siempre me demostraron, por todos los momentos que pasamos juntas, y por el apoyo que me brindaron.

A **mi familia**: mi Papá y mi Hermano y, mis estrellas en el cielo, mi Mamá y mi Abuela, por criarme y hacer de mí, la persona que hoy soy. Por preocuparse por mí, por aguantar mis malos días, por todo el amor que siempre me dieron y por entregarme todas las herramientas que necesito para seguir adelante. A María Luisa, Oscar, Ceci, Ema, Mariana, Lian, Eli y Agus (y los más pequeñitos, Nachi, Jose y Guille) por todo el cariño y el apoyo que siempre recibo.

A **Fran**, por ser todo lo que necesito en esta vida. Por su compañía y por sus consejos. Por su cariño, su respeto y su apoyo incondicional. Por darme las fuerzas que necesito para llevar a cabo todo lo que me propongo.

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.

Publicaciones

- **Rossetti M.F.**, Varayoud J., Moreno-Piovano, G.S., Luque E.H., Ramos J.G., 2015. Environmental enrichment attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes and reduces the methylation state of the steroid 5α -reductase type 1 gene in the rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol.* 412, 330-338.
- Hassouna I., Ott C., Dahm L., Offen N., Neher R., Mitkovski M., Winkler D., Sperling S., Fries L., Goebbels S., Vreja I., Hagemeyer N., Dittrich M., **Rossetti M.F.** y col. Revisiting adult neurogenesis and the role of erythropoietin for neuronal and oligodendroglial differentiation in the hippocampus. *Mol Psychiatry.* En Prensa.
- **Rossetti M.F.**, Varayoud J., Lazzarino, G.P., Luque E.H., Ramos J.G. Pregnancy and lactation differentially modify the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes through DNA methylation mechanisms in the hippocampus of aged rats. *Mol Cell Endocrinol* (En revision).

Presentaciones a Congresos

- **Rossetti, M.F.**; Varayoud, J.; Moreno-Piovano, G.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. La estimulación sensorial y la actividad física voluntaria modulan la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo. LVI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en *Revista de Medicina* Vol. 71; Supl III –2011. Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2011.
- **Rossetti, M.F.**; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. Modificaciones en la neuroesteroidogénesis podrían contribuir a la disminución de la plasticidad neuronal asociada a la edad. "Fronteras en BioCiencias". Simposio

Conjunto de la Sociedad Max Planck y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Buenos Aires, Argentina. Abril, 2012.

- **Rossetti, M.F.;** Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. Changes in neurosteroid biosynthesis may contribute to the decline in neuronal plasticity associated with aged. II Simposio Franco-Argentino de Neurociencias. Buenos Aires, Argentina. Abril, 2012.
- **Rossetti, M.F.;** Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. La experiencia materna como factor modulador de la esteroidogénesis hipocámpica. LVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en Revista de Medicina. Vol. 72; Supl II – 2012. Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2012.
- **Rossetti, M.F.;** Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. Modificaciones en la esteroidogénesis hipocámpica podrían contribuir a la disminución de la plasticidad neuronal en la adultez. LVIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en Revista de Medicina. Vol. 73; Supl III – 2013. Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2013.
- **Rossetti, M.F.;** Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. Dime como vives y te diré como envejeces: el ambiente sensorialmente enriquecido como modulador de la esteroidogénesis hipocámpica. LVIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en Revista de Medicina. Vol. 73; Supl III – 2013. Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2013.
- **Rossetti, M.F.;** Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. La experiencia materna como factor modulador de la esteroidogénesis hipocámpica en la adultez. LVIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en Revista de Medicina. Vol. 73; Supl III – 2013. Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2013.
- **Rossetti, M.F.;** Varayoud, J.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. Modificaciones en la esteroidogénesis hipocámpica podrían contribuir a la disminución de la plasticidad neuronal en las ratas hembras adultas. LIX Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en Revista de Medicina. Vol. 74; Supl III – 2014. Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2014.

- **Rossetti, M.F.;** Varayoud, J.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. La experiencia materna como factor modulador de la esteroidogénesis hipocámpica en la adultez. LIX Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Publicado en Revista de Medicina. Vol. 74; Supl III – 2014. Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2014.
- **Rossetti, M.F.;** Andreoli, M.F.; Stoker, C; Varayoud, J.; Luque, E.H.; Ramos, J.G. Maternal experience as a modulator of neurosteroid biosynthesis in the rat hippocampus. Young Investigator Award. International Workshop in Neuroendocrinology (IWNE). Mendoza, Argentina. Agosto, 2015.

INDICE GENERAL

| | |
|---|------|
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | i |
| INDICE DE TABLAS | iv |
| INDICE DE FIGURAS..... | v |
| RESUMEN | viii |
| ABSTRACT | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Neuroanatomía general del hipocampo..... | 2 |
| 1.1.1. Histoarquitectura del Hipocampo | 2 |
| 1.2. Los neuroesteroides como moduladores de las funciones cerebrales | 4 |
| 1.2.1. Pregnenolona | 5 |
| 1.2.2. Estrógenos | 5 |
| 1.2.3. Progestágenos..... | 6 |
| 1.2.4. Andrógenos | 8 |
| 1.3. Vías de síntesis de los neuroesteroides: principales enzimas y proteínas implicadas..... | 9 |
| 1.3.1. Proteína de la regulación esteroideogénica aguda..... | 10 |
| 1.3.2. Citocromo P450 _{scc} | 11 |
| 1.3.3. 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa | 12 |
| 1.3.4. Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa | 13 |
| 1.3.5. Esteroide 5 α -reductasa..... | 14 |
| 1.3.6. 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa | 15 |
| 1.3.7. Citocromo P450 aromatasa | 16 |
| 1.3.8. 17-oxido- reductasa/17-cetoesteroide reductasa..... | 17 |
| 1.3.9. Aldosterona sintasa..... | 18 |
| 1.4. Regulación transcripcional de las enzimas esteroideogénicas | 19 |
| 1.4.1. Citocromo P450 _{scc} | 19 |
| 1.4.2. Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa | 21 |
| 1.4.3. Citocromo P450 aromatasa | 22 |
| 1.4.4. Esteroide 5 α -reductasa..... | 22 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.4.5. | 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa | 23 |
| 1.4.6. | Aldosterona sintasa..... | 24 |
| 1.5. | Mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional..... | 26 |
| 1.5.1. | Mecanismos de metilación diferencial del ADN..... | 27 |
| 1.6. | Envejecimiento y esteroides..... | 28 |
| 1.6.1. | Las consecuencias del envejecimiento sobre las funciones neuronales | 28 |
| 1.6.2. | Genes neurotróficos y sinápticos como marcadores de disfunciones/funciones cerebrales | 29 |
| 1.6.3. | Niveles hormonales durante el envejecimiento y deterioro cognitivo..... | 30 |
| 1.6.4. | Proteínas neuroesteroídicas y neuroprotección..... | 31 |
| 1.7. | Los estímulos ambientales como activadores de las funciones neuronales durante la vejez..... | 33 |
| 1.7.1. | La exposición a ambientes enriquecidos..... | 34 |
| 1.7.2. | La experiencia materna como un modelo natural de neuroprotección | 35 |
| 1.8. | Hipótesis de Trabajo | 36 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 37 |
| 2.1. | Objetivo General..... | 38 |
| 2.2. | Objetivos Particulares | 38 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1. | Animales y modelos experimentales | 40 |
| 3.1.1. | Experimento 1 | 40 |
| 3.1.2. | Experimento 2 | 40 |
| 3.1.3. | Experimento 3 | 41 |
| 3.2. | Exposición a ambiente enriquecido o estándar | 41 |
| 3.3. | Enriquecimiento materno: preñez y lactancia. | 43 |
| 3.4. | Test de memoria episódica..... | 43 |
| 3.4.1. | Campo abierto | 43 |
| 3.4.2. | Objetos A y B..... | 44 |
| 3.4.3. | Procedimiento..... | 44 |
| 3.4.4. | Análisis de variables | 44 |
| 3.5. | Obtención de las muestras..... | 45 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.6. | Extracción de ARN total, transcripción reversa y análisis de la expresión de las moléculas de interés mediante PCR en tiempo real..... | 46 |
| 3.7. | Análisis bioinformático..... | 48 |
| 3.8. | Extracción de ADNg, digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y análisis del estado de metilación de las moléculas esteroideogénicas mediante PCR en tiempo real..... | 49 |
| 3.9. | Análisis estadístico..... | 51 |
| 4. | RESULTADOS..... | 53 |
| 4.1. | Experimento 1. Regulación transcripcional de las moléculas implicadas en la vía de síntesis de esteroides hipocámpales durante el envejecimiento en ratas hembra y macho..... | 54 |
| 4.1.1. | La edad y el sexo modifican la expresión de los genes implicados en la síntesis de esteroides en el hipocampo de rata..... | 54 |
| 4.1.2. | Análisis in silico de los genes de rata correspondientes a las enzimas P450scc, 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(11 β)-2, P450(17 α) y P450arom..... | 57 |
| 4.1.3. | El envejecimiento produce cambios en el estado de metilación de los promotores de enzimas implicadas en la síntesis de alopregnanolona en ratas hembra..... | 57 |
| 4.1.4. | La memoria episódica se ve afectada con el aumento progresivo de la edad en ratas..... | 59 |
| 4.2. | Experimento 2. Los ambientes enriquecidos como moduladores de la esteroideogénesis hipocámpica..... | 61 |
| 4.2.1. | La exposición breve a ambientes con estimulación sensorial y motora modifica la expresión de las moléculas esteroideogénicas en el hipocampo de la rata hembra joven..... | 61 |
| 4.2.2. | La exposición breve a ambientes enriquecidos modifica la expresión génica de los factores neurotróficos y proteínas sinápticas..... | 62 |
| 4.2.3. | La exposición breve a ambientes sensorialmente enriquecidos modifica el estado de metilación del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1 en el hipocampo de la rata joven..... | 65 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.2.4. | La exposición prolongada a un ambiente sensorialmente enriquecido atenúa la disminución de la expresión de las moléculas esteroideas asociada a la edad en el hipocampo..... | 65 |
| 4.2.5. | La estimulación sensorial prolongada no modifica la expresión génica de los factores neurotróficos y proteínas sinápticas | 67 |
| 4.2.6. | El ambiente sensorialmente enriquecido modifica el estado de metilación del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1 en el hipocampo de la rata adulta | 68 |
| 4.3. | Experimento 3. La experiencia materna como moduladora de la esteroideogénesis hipocámpica..... | 70 |
| 4.3.1. | La experiencia materna atenúa la disminución de la expresión génica de las enzimas neuroesteroideas asociada a la edad en el hipocampo..... | 70 |
| 4.3.2. | La experiencia materna modifica la expresión génica del BDNF y de las proteínas sinápticas | 71 |
| 4.3.3. | La preñez y la lactancia generan una modificación a largo plazo en el estado de metilación de los promotores hipocámpicos de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1 y P450arom..... | 72 |
| 5. | DISCUSIÓN..... | 75 |
| 5.1. | Experimento 1. Regulación transcripcional de las moléculas implicadas en la vía de síntesis de esteroides hipocámpicos durante el envejecimiento en ratas hembra y macho..... | 77 |
| 5.2. | Experimento 2. Los ambientes enriquecidos como moduladores de la esteroideogénesis hipocámpica | 83 |
| 5.3. | Experimento 3. La experiencia materna como moduladora de la esteroideogénesis hipocámpica..... | 88 |
| 6. | CONCLUSIONES | 94 |
| 7. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 97 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|--------------|---|
| μg | Microgramos |
| μl | Microlitros |
| 17β-HSD-3 | 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 |
| 3α-HSD | 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa |
| 3β-HSD | 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ ⁵ -Δ ⁴ isomerasa |
| 5α-reductasa | Eesteroide 5α-reductasa |
| AND | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico copia |
| ADNg | Ácido desoxirribonucleico genómico |
| AP- | Proteína activadora |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ATF- | Factor de activación transcripcional - |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado de cerebro |
| C | Citosina |
| cAMP | Adenosín monofosfato cíclico |
| Cebpb | Proteína beta de unión a los activadores CCAAT |
| CLS | Secuencia similar al elemento de respuesta a cAMP |
| Cm | Centímetros |
| CRE | Elemento de respuesta a cAMP |
| CREB | Proteína de unión a elemento de respuesta a cAMP |
| Ct | Ciclo umbral |
| DHEA | Dehidroepiandrosterona |
| DPN | Día post-natal |
| dNTPs | Trifosfatos de desoxinucleótidos |
| E2 | 17β-Estradiol |
| EA | Enfermedad de Alzheimer |
| G | Guanosina |
| GD | Giro dentado |

| | |
|---------------------|--|
| H | Horas |
| HSD | Hidroxiesteroide deshidrogenasa |
| IGF-1 | Factor de crecimiento insulínico 1 |
| kDa | Kilodaltons |
| Kg | Kilogramos |
| LH | Hormona luteinizante |
| LRH-1 | Receptor homólogo de hígado 1 |
| MBPs | Proteínas de unión a grupos metilo |
| Min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| MSRE-PCR | Digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y PCR en tiempo real |
| NF-1 | Factor nuclear 1 |
| Ng | Nanogramos |
| NGF | Factor de crecimiento nervioso |
| Nm | Nanómetros |
| NRE | Elemento de Receptor Nuclear |
| °C | Grados Celsius |
| OA | Objeto Antiguo |
| OAD | Objeto Antiguo Desplazado |
| Oct-1 | Factor de unión a octámeros 1 |
| OR | Objeto Reciente |
| ORD | Objeto Reciente Desplazado |
| P450(11 β)-1 | 11 β -hidroxilasa |
| P450(11 β)-2 | Aldosterona sintasa |
| P450(17 α) | Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa |
| P450arom | Citocromo P450 aromatasa |
| P450scc | Citocromo P450scc |
| Pb | Pares de bases |
| Pmoles | Picomoles |
| Re α | Receptor de Estrógenos α |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa luego de una |

| | |
|----------|--|
| | transcripción reversa |
| Sb | Subículo |
| S | Segundos |
| SEM | Error estándar de la media |
| SF-1 | Factor esteroideogénico 1 |
| Sp1 | Factor promotor selectivo 1 |
| SREBP- | Proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides |
| StAR | Proteína de la regulación esteroideogénica aguda |
| Syp | Sinaptofisina |
| TBI | Injuria traumática cerebral |
| TreP-132 | Proteína de activación transcripcional de 132 kDa |
| U-CRS | Secuencia de respuesta a cAMP |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| LBP | Proteínas de unión a terminaciones repetitivas largas |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real para estudios de expresión de las enzimas/proteínas esteroideogénicas a nivel del ARNm..... | 48 |
| Tabla 2. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real para el estudio del estado de metilación de las secuencias promotoras..... | 51 |
| Tabla 3. Coeficientes correspondientes a las “memoria cuándo” y “memoria dónde” obtenidos en el test de memoria episódica en ratas hembra y macho jóvenes adultas y adultas mayores..... | 61 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Esquema representativo de la organización tridimensional del sistema límbico en el cerebro de la rata..... | 3 |
| Figura 2 Tinción de Nissl del hipocampo dorsal de ratón..... | 4 |
| Figura 3 Pregnenolona..... | 5 |
| Figura 4 17 β -Estradiol..... | 6 |
| Figura 5 Progesterona y Alopregnanolona..... | 8 |
| Figura 6 Dehidroepiandrosterona y Testosterona | 9 |
| Figura 7 Esquema de las principales vías de síntesis de los neuroesteroides en el hipocampo..... | 10 |
| Figura 8 Representación de la proteína esteroidogénica de regulación aguda y la citocromo P450scc en la mitocondria..... | 12 |
| Figura 9 Reacciones esteroidogénicas catalizadas por las enzimas citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ^5 - Δ^4 isomerasa..... | 14 |
| Figura 10 Principales reacciones catalizadas por la enzima esteroide 5 α -reductasa..... | 15 |
| Figura 11 La conversión de la 5 α -Dihidroprogesterona a Alopregnanolona es llevada a cabo por la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa..... | 16 |
| Figura 12 Reacciones esteroidogénicas catalizadas por las enzimas citocromo P450 aromatasas y 17-oxido- reductasa/17-cetoesteroide reductasa..... | 18 |
| Figura 13 Las enzimas 11 β -hidroxilasa y aldosterona sintasa catalizan los pasos de síntesis de aldosterona, corticosterona y 18 hidroxicorticosterona..... | 19 |
| Figura 14 Región promotora del gen CYP11A1..... | 20 |
| Figura 15 Comparación de la secuencia correspondiente al promotor proximal del gen CYP17A1 de dos especies: rata y humano | 21 |
| Figura 16 Región promotora del gen 3 α - hidroxiesteroide deshidrogenasa en rata y humano..... | 24 |
| Figura 17 Comparación de la secuencia correspondiente al promotor del gen CYP11B2 en humanos y roedores..... | 25 |
| Figura 18 Regulación de la expresión génica mediante mecanismos de metilación de ADN..... | 26 |
| Figura 19 Modelo de un ambiente enriquecido estándar para roedores..... | 35 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 Ambientes estándar, con estimulación motora y con estimulación sensorial..... | 42 |
| Figura 21 Test de memoria episódica..... | 45 |
| Figura 22 Cortes coronales sobre el cerebro con la posición ventral hacia arriba..... | 46 |
| Figura 23 A) Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas jóvenes adultas y adultas mayores hembra y macho. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación | 55 |
| Figura 24 Esquema de los promotores de los genes correspondientes a las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, P450(11 β)-2, P450(17 α) y P450arom..... | 56 |
| Figura 25 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, P450(17 α), P450arom y P450(11 β)-2 mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas hembra jóvenes adultas y adultas mayores | 58 |
| Figura 26 Test de memoria episódica en ratas hembra y macho jóvenes adultas y adultas mayores. Coeficientes de las memorias “Cuándo” y “Dónde”..... | 60 |
| Figura 27 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas hembra expuestas durante 10 días a un ambiente enriquecido..... | 63 |
| Figura 28 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de los factores neurotróficos y proteínas sinápticas en el hipocampo de ratas hembra expuestas durante 10 días a un ambiente enriquecido..... | 64 |
| Figura 29 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de las enzimas 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, P450(17 α) y P450arom mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas hembra jóvenes adultas expuestas durante 10 días a un ambiente enriquecido | 66 |
| Figura 30 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas hembra jóvenes adultas y adultas mayores mantenidas en un ambiente estándar y ratas adultas mayores expuestas durante 105 días a un ambiente enriquecido..... | 67 |
| Figura 31 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas neurotróficas y sinápticas en el hipocampo de ratas hembra jóvenes y adultas | |

| | |
|--|----|
| mayores mantenidas en un ambiente estándar y ratas adultas mayores expuestas durante 105 días a un ambiente enriquecido..... | 68 |
| Figura 32 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de las enzimas 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD y P450(17 α) mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas hembra jóvenes y adultas mayores mantenidas en un ambiente estándar y ratas adultas mayores expuestas durante 105 días a un ambiente enriquecido | 69 |
| Figura 33 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas jóvenes adultas y adultas mayores vírgenes y ratas adultas mayores expuestas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias y sin ellas..... | 71 |
| Figura 34 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR de moléculas neurotróficas y sinápticas en el hipocampo de ratas jóvenes adultas y adultas mayores vírgenes y ratas adultas mayores expuestas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias y sin ellas..... | 72 |
| Figura 35 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1, P450(11 β)-2 y P450arom mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas jóvenes adultas y adultas mayores vírgenes y ratas adultas mayores expuestas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias y sin ellas..... | 74 |

RESUMEN

El hipocampo se ha asociado desde hace tiempo a la ejecución de funciones cognitivas (aprendizaje) y a los procesos de consolidación de la memoria, mientras que la pérdida de su funcionalidad se ha relacionado con la aparición de demencias y patologías neurodegenerativas. El envejecimiento es un proceso fisiológico que abarca distintas áreas del cerebro y tiene consecuencias importantes sobre mecanismos celulares, moleculares y neuronales que afectan directamente la plasticidad. Durante años, estos cambios han sido asociados a la disminución en los niveles de ciertos esteroides; dichos esteroides también pueden ser sintetizados de novo en el cerebro y son denominados neuroesteroides. Los neuroesteroides poseen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras y están involucrados en la diferenciación y plasticidad de las neuronas del hipocampo y otras funciones neurobiológicas. Al igual que los esteroides, los niveles de neuroesteroides disminuyen durante el desarrollo postnatal. En el mismo sentido, se ha demostrado que la expresión génica de ciertas moléculas implicadas en la síntesis de los mismos se ve modificada en el hipocampo durante los procesos neurodegenerativos y durante el envejecimiento. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares que podrían estar regulando los cambios en dicha expresión. Una posibilidad es que la transcripción génica este siendo controlada por mecanismos epigenéticos como la metilación diferencial del ADN.

Durante años se ha demostrado que la estimulación cognitiva y el ejercicio físico pueden proporcionar beneficios significativos para la salud humana en general. Para estos estudios en roedores, se utilizan condiciones de mantenimiento de los animales en ambientes enriquecidos. Estas condiciones experimentales incrementan la plasticidad neuronal a través de cambios en la morfología del cerebro que incluyen la neurogénesis, los contactos sinápticos y la arborización de las dendritas. Otro tipo de estímulo está dado por la experiencia materna. Algunos autores señalan que la misma contribuye a un mejoramiento de la memoria, del aprendizaje y de las funciones de neuroplasticidad asociadas al hipocampo.

Nuestra hipótesis propone que el envejecimiento, el ambiente enriquecido mediante estimulación sensorial/motora y la experiencia materna producen cambios en la expresión de las enzimas esteroideogénicas en el hipocampo. En particular pensamos que el aumento

progresivo de la edad produce una disminución de la expresión de dichas enzimas y esto podría estar asociado a cambios en los niveles de metilación de sitios regulatorios de la transcripción. Esto redundaría en cambios significativos en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo, trayendo consecuencias negativas en las capacidades mnemónicas y neuroprotectoras del individuo durante su adultez mayor. Por el contrario pensamos que la experiencia reproductiva y la estimulación sensorial y motora pueden atenuar la caída en la expresión de las enzimas esteroidogénicas en el hipocampo y esto estaría relacionado con una disminución en los patrones de metilación de los promotores/genes implicados.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar, mediante el uso de modelos in vivo, el efecto de la edad, la experiencia reproductiva y el ambiente enriquecido sobre la expresión de los genes que codifican las proteínas esteroidogénicas StAR (proteína reguladora aguda esteroidogénica), P450scc (citocromo P450scc), 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa), 3 α -HSD (3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa), 5 α -reductasa-1 (esteroide 5 α -reductasa tipo 1), P450(17 α) (citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa), P450(11 β)-2 (aldosterona sintasa), 17 β -HSD-3 (17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3) y P450arom (citocromo P450arom) en el hipocampo de la rata.

Para determinar el efecto de la edad sobre la neuroesteroidogénesis hipocámpica, se utilizaron ratas hembra y macho de la cepa Wistar en día post-natal (DPN) 90 (jóvenes adultas) y 450 (adultos mayores). Previo a su sacrificio, los animales fueron evaluados en el test de memoria episódica. Luego de ello, los hipocampos se disecaron y almacenaron a -80 °C. A un grupo de muestras se les realizó extracción de ARNm, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Mediante esta técnica se cuantificó la expresión génica de las enzimas neuroesteroidogénicas StAR, P450scc, 3 β -HSD, P450arom, P450(17 α), 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, P450(11 β)-2 y 17 β -HSD-3. En los genes en los que la expresión de ARNm se vio modificada, se comparó el estado de metilación de las regiones regulatorias presentes en las secuencias promotoras. Los genes de rata correspondientes a las enzimas P450scc, P450arom, P450(17 α), 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD y P450(11 β)-2 fueron analizados en busca de Islas CpG y luego se determinó si estas secuencias contenían sitios de reconocimiento para las enzimas BstUI y/o Mae II (secuencias de reconocimiento con dinucleótidos CpG). Para determinar el estado de metilación de los sitios estudiados, se realizó extracción de ADN genómico de las muestras de hipocampo correspondientes a los distintos grupos experimentales y posterior análisis

utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación y posterior PCR en tiempo real (MSRE-PCR). Según nuestros resultados, el aumento de la edad disminuyó significativamente la transcripción de las moléculas StAR, P450_{scc}, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa, P450(11 β)-2, P450(17 α), P450_{arom} y 17 β -HSD-3 y aumentó el estado de metilación de determinados sitios CpG de los promotores de P450_{scc}, 5 α -reductasa y 3 α -HSD en el hipocampo de las ratas hembra. Por otra parte, en las ratas macho solo se detectó una disminución en la expresión del ARNm correspondiente a las enzimas P450(11 β)-2 y P450_{arom}. El envejecimiento, además, afectó negativamente la performance de las ratas hembra y macho en el test de memoria episódica. En cuanto a las diferencias sexuales, cuando se compararon animales jóvenes se observó mayor expresión génica de StAR, P450_{scc}, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa, P450 (17 α) y 17 β -HSD-3 en las hembras comparadas con los machos. También se detectaron diferencias a nivel cognitivo en el test de memoria empleado.

En una segunda etapa, se pretendió evaluar el efecto del ambiente enriquecido sobre la regulación transcripcional de las enzimas neuroesteroidogénicas. Para ello, se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar en DPN 90 y 450 expuestas durante 10 y 105 días a ambientes con estimulación motora y estimulación sensorial. Los hipocampos se disecaron y almacenaron a -80 °C para posterior 1) extracción de ARNm, transcripción reversa y PCR en tiempo real y 2) análisis de metilación utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación y posterior PCR en tiempo real, tal como fue descrito previamente. En estos grupos además, se evaluaron los niveles de ARNm del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y las proteínas sinápticas sinaptofisina (Syp) y espinofilina. La exposición breve a ambientes estimulados sensorialmente generó en el hipocampo de las ratas jóvenes un aumento en la expresión del ARNm de las enzimas 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1 y P450 (17 α) y los factores BDNF, Syp y espinofilina y una disminución de P450_{arom}. Sumado a ello, disminuyó el estado de metilación de uno de los sitios CpG del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1. Por su parte, la exposición breve a ambientes con estimulación motora aumentó la expresión génica de las enzimas 3 α -HSD, P450 (17 α) y P450(11 β)-2. En el hipocampo de las ratas adultas, en cambio, sólo se verificó un aumento en la expresión génica de P450(11 β)-2 producido por la exposición breve a la estimulación motora. En cuanto a la estimulación sensorial prolongada, la misma fue capaz de atenuar la caída en la transcripción de ciertas enzimas neuroesteroidogénicas asociada a la edad, incrementando la expresión de ARNm de StAR,

3 α -HSD, 5 α -reductasa-1 y P450(17 α) en el hipocampo de ratas adultas. Sumado a ello, el ambiente enriquecido disminuyó el estado de metilación de uno de los sitios CpG del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1, lo que podría explicar los mayores niveles de ARNm encontrados.

En la última etapa, se estudió el efecto de la preñez y la lactancia sobre la expresión génica de las enzimas neuroesteroidogénicas y los mecanismos regulatorios intervinientes. Para ello, se compararon ratas adultas de 15 meses de edad sometidas a 3 preñeces completas con sus respectivas lactancias y sin ellas frente a ratas vírgenes de la misma edad. Los hipocampos se disecaron y almacenaron a -80 °C para extracción de ARNm, transcripción reversa y PCR en tiempo real y análisis de metilación utilizando la técnica MSRE-PCR, tal como fue descrito. En estos grupos también se evaluaron los niveles de ARNm de los factores neurotróficos y las proteínas sinápticas mencionadas previamente. Según nuestros resultados, la experiencia materna también generó cambios en la expresión de las enzimas neuroesteroidogénicas. Los sucesivos ciclos de preñez y lactancia incrementaron la transcripción de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1, P450arom y P450(11 β)-2) y los factores BDNF, Syp y espinofilina y disminuyeron el estado de metilación del promotor correspondiente al gen de la enzima 5 α -reductasa-1 en las ratas adultas. La preñez en ausencia de lactancia también incremento la expresión génica de las proteínas P450scc y 5 α -reductasa-1; sin embargo, disminuyó los niveles de ARNm de P450arom y P450 (β 11)-2. Sumado a ello, disminuyó el estado de metilación de los promotores de P450scc y 5 α -reductasa-1 y aumentó el del gen correspondiente a la enzima P450arom.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- ✓ El aumento progresivo de la edad afecta negativamente la performance cognitiva asociada a la memoria episódica y modifica la transcripción de los genes implicados en la síntesis de neuroesteroides, aumentando los niveles de metilación de los promotores P450scc, 5 α -reductasa-1 y 3 α -HSD. Sumado a ello, existen dimorfismos sexuales relacionados con la expresión génica de las proteínas neuroesteroidogénicas.
- ✓ La exposición breve a ambientes con estimulación sensorial y motora modifica de manera diferencial la expresión de las moléculas neuroesterodogénicas, los factores neurotróficos y las proteínas sinápticas en el hipocampo de ratas hembra jóvenes y adultas. Sumado a ello, la exposición prolongada a un ambiente sensorialmente enriquecido atenúa la disminución de la expresión de ciertas moléculas

esteroidogénicas en animales adultos. Tanto en ratas jóvenes como adultas, el ambiente sensorialmente enriquecido genera cambios en los patrones de metilación del gen correspondiente a la enzima 5 α -reductasa-1.

- ✓ La preñez y la lactancia afectan de manera diferencial la transcripción de las enzimas neuroesteroidogénicas, modificando el estado de metilación de los promotores correspondientes a P450scc, 5 α -reductasa-1 y P450arom, e incrementan la expresión de factores neurotróficos y sinápticos en las ratas adultas.

Estos hallazgos contribuyen con el estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos negativos asociados al envejecimiento y el rol de los tratamientos conductuales como factores atenuantes de dichos efectos.

ABSTRACT

The hippocampus has been associated with cognitive functions (learning) and memory consolidation; the loss of its functionality has been linked to the onset of dementia and neurodegenerative diseases. Aging is a physiological process that occurs in different areas of the brain and is associated with changes in various cellular, molecular and neural mechanisms that directly affect plasticity. For years, these changes have been associated with decreased levels of certain steroids; these steroids can also be synthesized de novo in the brain and are called neurosteroids. Neurosteroids have neurotrophic and neuroprotective properties and are involved in the differentiation and plasticity of hippocampal neurons and in other neurobiological functions. As steroids, neurosteroid levels decrease with progressive age. In fact, the expression of certain enzymes involved in neurosteroidogenesis has been shown to change during neurodegenerative diseases and during aging. However, little is known about the molecular mechanism underlying these changes. One possibility is that steroidogenic enzyme expression could be affected by epigenetic mechanisms, such as DNA methylation.

It has been shown that cognitive stimulation and physical activity can provide significant benefits to human health and cognitive functions. To study these stimuli in rodents, animals are housed in a kind of environment named as “enriched environments”. These experimental conditions are known to increase neural plasticity through changes in the morphology of the mammalian brain, such as neurogenesis, synaptic contacts and dendritic branching. Other kind of stimulus is maternal experience, which has been shown to have a long-lasting impact on learning and memory abilities, as well as on neuroplasticity functions associated with the hippocampus.

Our hypothesis proposes that aging, enriched environment (sensory/motor stimulation) and maternal experience produce changes in the expression of steroidogenic enzymes in the hippocampus through epigenetic mechanisms. In particular we suggest that aging causes a decrease in the expression of these enzymes and this could be associated with changes in methylation levels of CpG dinucleotides rich regions corresponding to transcription regulatory sites. This would result in significant changes in the synthesis of neurosteroids in the hippocampus, bringing negative consequences in mnemonics and neuroprotective capabilities during adulthood. Conversely, reproductive experience and sensory and motor

stimulation attenuate the decrease in the expression of steroidogenic enzymes in the hippocampus and this could be related to a decrease in methylation patterns of the promoters / genes involved.

The aim of this thesis was to determine the effects of age, reproductive experience and enriched environment on the gene expression of StAR (steroidogenic acute regulatory protein), P450scc (cytochrome P450scc), 3 β -HSD (3 β - hydroxysteroid dehydrogenase / Δ^5 - Δ^4 -isomerase), 3 α -HSD (3 α -hydroxysteroid dehydrogenase), 5 α -reductase-1 (steroid 5 α -reductase type 1), P450 (17 α) (cytochrome P450 17 α -hydroxylase / C 17,20-lyase), P450 (11 β) -2 (aldosterone synthase), 17 β -HSD-3 (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3) and P450arom (cytochrome P450arom) in the rat hippocampus.

To analyze the effects of aging on the hippocampal neurosteroidogenesis, Wistar male and female rats at post-natal day (DPN) 90 (young adult) and DPN 450 (aged) were used. Before their sacrifice, cognitive performance of the animals was evaluated in the episodic-like memory test. The hippocampi were microdissected, frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C. RNA isolation, reverse transcription and real-time quantitative PCR analysis was used to analyze the relative expression levels of the steroidogenic molecules StAR, P450scc, 3 β -HSD, P450arom, P450(17 α), 5 α -reductase-1, 3 α -HSD, P450(β 11)-2 y 17 β -HSD-3. Then, we investigated the methylation state of P450scc, P450arom, P450(17 α), 5 α -reductase-1, 3 α -HSD and P450(β 11)-2 promoters whose ARNm expression changes in the experimental groups. The P450scc, P450arom, P450(17 α), 5 α -reductase-1, 3 α -HSD and P450(β 11)-2 genes were analyzed for CpG islands and these regions were also checked for restriction sites for BstUI or Mae II enzymes to evaluate the number of methylation-sensitive sites. To analyze the methylation levels of these steroidogenic genes we isolated the hippocampal genomic DNA and we combined the digestions with methylation-sensitive restriction enzymes and subsequent real-time PCR analysis. Aging decreased the gene expression of StAR, P450scc, 3 β -HSD, P450arom, P450(17 α), 5 α -reductase-1, 3 α -HSD, P450(11 β)-2 and 17 β -HSD-3 enzymes and increased the methylation levels of P450scc, 5 α -reductase-1 and 3 α -HSD promoters in the hippocampus of female rats. In male rats, aging decreased the mRNA levels of P450(β 11)-2 and P450arom. In addition, aging has negative effects on episodic-like memory performance in female and male rats. In young animals, the transcription of StAR, P450scc, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductase, P450 (17 α) and 17 β -HSD-3 enzymes was higher in female than in male rats. Sexual dimorphisms were also found in episodic-like memory test.

In a second part, we evaluated the effects of environmental enrichment on the transcriptional regulation of hippocampal steroidogenic enzymes. For that, Wistar female rats at PND 90 and PND 450 were exposed during 10 and 105 days to environmental with sensory and motor stimulation. Hippocampi were microdissected, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for 1) mRNA analysis of steroidogenic molecules using real time PCR and 2) DNA methylation analysis of its promoters using a combination of digestions with methylation-sensitive restriction enzymes and subsequent real-time PCR. Moreover, the mRNA levels of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and synaptic proteins synaptophysin (Syp) and spinophilin were evaluated. Short-term sensory stimulation increased the mRNA expression of 3α -HSD, 5α -reductase-1 and P450 (17α) enzymes and BDNF, Syp and spinophilin factors and decreased the gene expression of P450arom in the hippocampus of young female rats. Moreover, a decrease in the methylation state of 5α -reductase-1 promoter was reported. Short-term motor stimulation increased the hippocampal transcription of 3α -HSD, P450 (17α) and P450(β 11)-2 in young rats and in adult rats increased only the expression of P450(β 11)-2. Interestingly, long-term sensory stimulation attenuated the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes in the hippocampus, increasing the transcription of StAR, 3α -HSD, 5α -reductase-1 and P450(17α) in aged female rats. However, the mRNA levels of these genes were still significantly lower than the levels in young animals. In addition, long-term environmental enrichment decreased the methylation state of the 5α -reductase-1 promoter and these changes could explain the increase in mRNA expression.

In the last part, we studied the effect of pregnancy and lactation on the expression of hippocampal steroidogenic enzymes and the transcriptional regulatory mechanisms that are involved. We compared middle-aged nulliparous rats and middle-aged multiparous rats subjected to three pregnancies with and without their respective lactation. Hippocampi were microdissected, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C . We analyzed the mRNA levels and the DNA methylation state for multiple genes involved in steroidogenesis in the hippocampus. We also studied the expression of neurotrophic and synaptic proteins. Based on our results, maternal experience also modified the expression of neurosteroidogenic enzymes. Pregnancy and lactation increased the transcription of P450scc, 5α -reductase-1 P450arom and P450(11β)-2 enzymes and BDNF, Syp and spinophilin factors and decreased the methylation state of 5α -reductase-1 promoter.

Pregnancy without lactation also increased the transcription of P450scc and 5 α -reductase-1 enzymes and reduced the methylation of its promoters; however, a decreased in the mRNA levels of P450arom and P450(11 β)-2 and an increased in the P450arom promoter methylation was found.

According to our results, we can conclude that:

- ✓ Aging has negative effects on episodic-like memory and modifies the transcription of the genes that are involved in the synthesis of neurosteroids, decreasing the methylation state of P450scc, 5 α -reductase-1 and 3 α -HSD promoters. Moreover, sexual dimorphism was found in the expression of steroidogenic proteins in young and aged animals.
- ✓ Short-term exposure to environments with sensory and motor stimulation modifies the expression of steroidogenic enzymes, neurotrophic factors and synaptic proteins in the hippocampus of young and aged rats. Moreover, long-term exposure to an environment with sensory stimulation attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes. In addition, short- and long-term exposure to environments with sensory stimulation decreased the methylation levels of the 5 α -reductase-1 promoter.
- ✓ Pregnancy and lactation differentially modifies the transcription of steroidogenic enzymes, changing the methylation state of P450scc, 5 α -reductase-1 and P450arom promoters, and increases the mRNA expression of neurotrophic factors and synaptic proteins in aged rats.

These findings contribute to the elucidation of the molecular mechanisms underlying the effects of aging on neurosteroid synthesis and the role of behavioral treatments as a mitigating factor.

1. INTRODUCCIÓN

“La creatividad simplemente consiste en conectar cosas”

Steve Jobs.-

1.1. Neuroanatomía general del hipocampo

El hipocampo se ha asociado desde hace tiempo a la ejecución de funciones cognitivas (aprendizaje) y a los procesos de consolidación de la memoria, mientras que la pérdida de su funcionalidad se ha relacionado con la aparición de demencias y patologías neurodegenerativas. La principal función del hipocampo es codificar la nueva memoria, creando patrones espacio-temporales en una memoria inicial (memoria de trabajo) que eventualmente se envía a la corteza cerebral para su almacenamiento a largo plazo. Según este concepto el hipocampo no actúa como una estructura de almacenamiento, sino que participa activamente en la construcción de nuevas memorias y en procesos cognitivos particulares tales como la toma de decisiones, planificación y aprendizaje (Addis y col., 2007; Battaglia y Pennartz, 2011; Maguire y col., 2000).

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

1.1.1. Histoarquitectura del Hipocampo

El GD comprende tres tipos de capas celulares bien diferenciadas. La más cercana a la fisura hipocampal es una capa, relativamente libre de células, denominada capa molecular (*stratum moleculare*). La segunda la constituyen las células granulares (*stratum granulosum*) ubicándose en la profundidad de la capa molecular y la tercera está formada primariamente por una población celular heterogénea y se denomina capa celular polimórfica (Fig. 2) (Amaral y Witter, 1995). En las regiones CA1, CA2 y CA3 la principal capa celular es la denominada capa de células piramidales (*stratum pyramidale*). Aunque

también presentan otras capas diferenciadas: el estrato oriens (*stratum oriens*), que es una zona estrecha relativamente libre de células; el estrato radiado (*stratum radiatum*), donde se encuentran las conexiones asociativas de CA3 a CA3 y las conexiones colaterales de Schaffer de CA3 a CA1; y el estrato lacunar-molecular (*stratum lacunosum-moleculare*), que es la capa más superficial y contiene fibras de la vía perforante. La región CA3 también presenta una capa libre de células ocupada por axones de las fibras musgosas originadas en el GD (*stratum lucidum*) (Amaral y Witter, 1995).

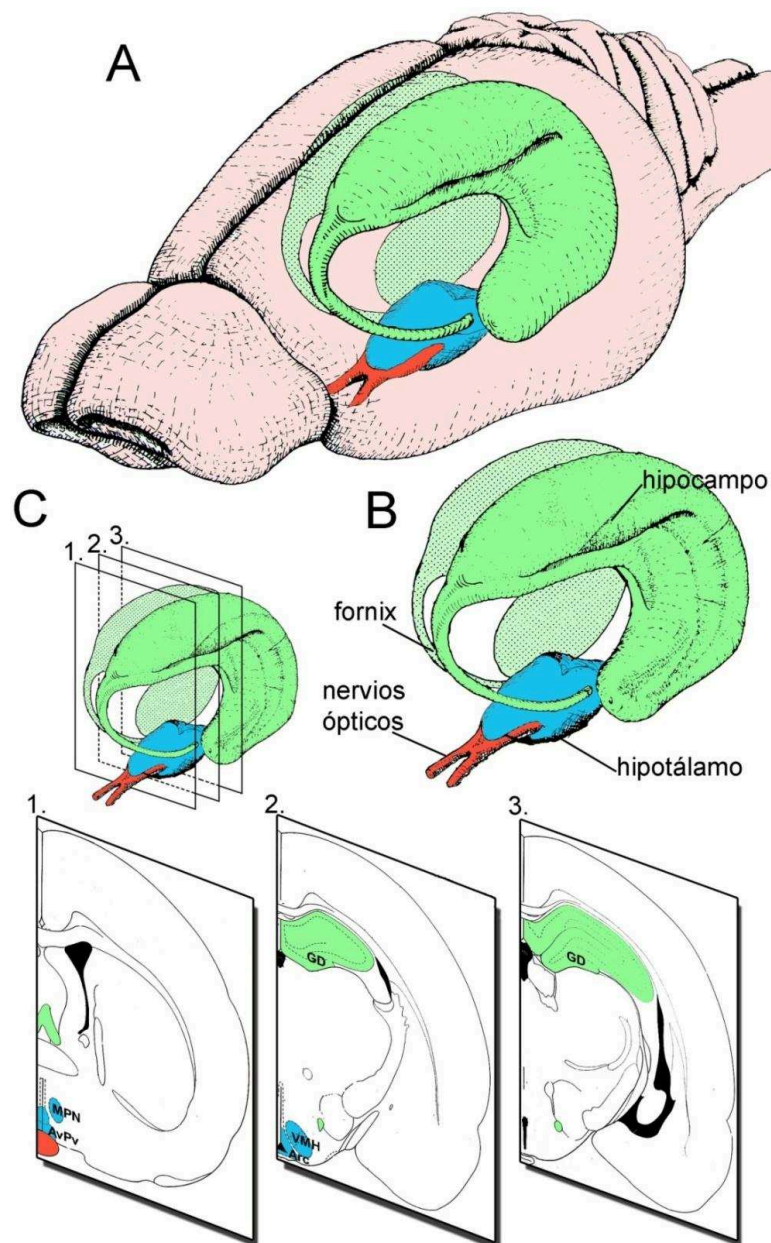


Figura 1 (A) Ubicación espacial de la formación hipocámpica en el cerebro de la rata (B) En verde pueden observarse el fórnix y el hipocampo, en rojo los nervios ópticos y en azul el hipotálamo. (C) Ubicación rostro-caudal de los cortes 1, 2 y 3 en el plano coronal. 1. Hipotálamo anterior. AvPv, núcleo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

periventricular; MPN, núcleo medial preóptico. 2. Hipotálamo medio-basal y principio de la formación hipocámpica. Arc, núcleo arcuato; VMH, núcleo ventromediano; GD, giro dentado. 3. Región medial del hipocampo. Tomado de Moreno-Piovano (2013).

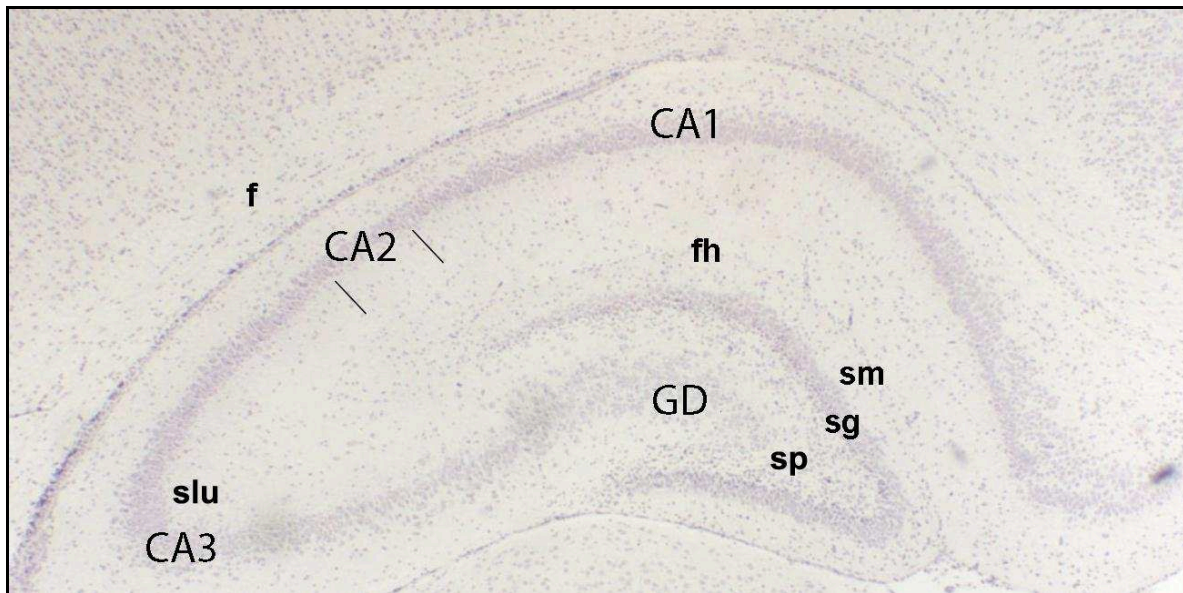


Figura 2 Tinción de Nissl del hipocampo dorsal de ratón. Las regiones CA1, CA2 y CA3 están compuestas principalmente por neuronas piramidales. Stratum moleculare (sm); stratum granulosum (sg); Capa o zona polimórfica (sp); Stratum lucidum (slu); giro dentado (GD); fimbria (f); fisura hipocámpica (fh). Aumento: 4x. Tomado de Moreno-Piovano (2013).

1.2. Los neuroesteroides como moduladores de las funciones cerebrales

Las hormonas esteroideas son sintetizadas de novo a partir de colesterol en las gónadas, glándulas adrenales y placenta. Las mismas no sólo ejercen su acción sobre los órganos reproductores, la unidad hipotálamo-hipofisiaria y los tejidos responsables de los caracteres sexuales secundarios, sino que también actúan sobre numerosas estructuras tales como hígado, vasos sanguíneos, tejido adiposo, células del sistema inmunitario, músculo, huesos, etc (Schumacher y col., 2003).

Las hormonas gonadales, además, pueden atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer su acción en el sistema nervioso central y periférico. En este sentido, el sistema endocrino está estrechamente ligado al cerebro y presenta una fuerte influencia sobre sus funciones (Schumacher y col., 2003). Los esteroides también pueden ser sintetizados de novo en distintas regiones del cerebro, incluyendo el hipocampo, por células neuronales y gliales y son denominados neuroesteroides. Poseen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras y

regulan distintos procesos asociados al desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central (apoptosis, sinaptogénesis y proliferación celular), la regulación de los sistemas de neurotransmisores, la neurogénesis, la arborización de las dendritas, la mielinización y las funciones de memoria y aprendizaje (Charalampopoulos y col., 2006; Charalampopoulos y col., 2008; Mellon, 2007; Reddy, 2010).

1.2.1. Pregnenolona

La pregnenolona es el neuroesteroide precursor de los estrógenos, andrógenos y progestágenos. La formación de pregnenolona en el hipocampo resultaría ser crítica para la mantención de las funciones cognitivas (Fig. 3). Los menores niveles de pregnenolona conjugada en el hipocampo de ratas de 2 años de edad fueron relacionados con déficits de memoria; estos déficits fueron atenuados mediante inyecciones intrahipocampales de pregnenolona sulfatada (Schumacher y col., 2003). En el mismo sentido, los niveles de pregnenolona resultaron aumentados en la corteza temporal de pacientes con la EA; mientras que su forma sulfatada se encontró disminuida en el cerebelo y en el cuerpo estriado, sugiriendo un posible rol de dichos neuroesteroides en el desarrollo de la enfermedad y/o neuroprotección contra la misma (Luchetti y col., 2011b). Sumado a ello, estudios *in vitro* han demostrado que la pregnenolona protege células hipocampales de ratón contra la muerte celular inducida por el glutamato y los péptidos amiloides (Gursoy y col., 2001).

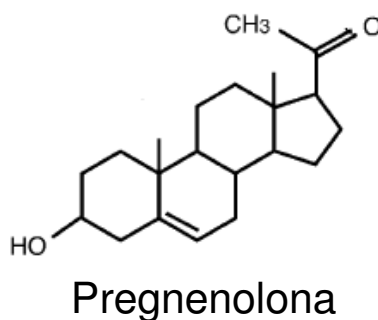


Figura 3 Pregnenolona. Tomado y adaptado de Schumacher y col. (2003).

1.2.2. Estrógenos

Existen tres variantes químicas de estrógenos diferentes, el 17β -estradiol (E2), la estrona y el estriol. De los tres, el E2 es considerado como el estrógeno más potente y por lo tanto su efecto neuromodulador ha sido reportado por numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* (Fig. 4).

Rune y Frotscher (2005) demostraron que el E2 derivado del cerebro es esencial para la regulación de la expresión de las proteínas sinápticas. Mediante el empleo de letrozol, un inhibidor de la enzima citocromo P450 aromataasa (P450arom), estos autores mostraron una fuerte relación entre los niveles de E2 y la expresión de la espinofilina (un marcador de espinas dendríticas) y la sinaptofisina (un marcador presináptico; Syp, del inglés Synaptophysin) en cultivos de hipocampo. En el mismo sentido, Vierk y col. (2014) reportaron que los estrógenos sintetizados en las neuronas hipocampales juegan un rol fundamental en la conectividad sináptica. La inhibición local de la síntesis de E2 genera una importante disminución de sinapsis en el hipocampo, causada aparentemente por un deterioro en la potenciación a largo plazo y la desfosforilación de la cofilina que produce la desestabilización de las espinas dendríticas.

Los efectos neuroprotectores del E2 también han sido reportados por diversos autores. Zhang y col. (2014) describieron efectos anti-inflamatorias asociados al E2 derivado del cerebro en la región hipocampal CA1 luego de una isquemia cerebral global. Liu y col. (2013) mostraron que la administración de la proteína $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo bilateral en rata aumenta los niveles de E2 en la corteza prefrontal y el hipocampo. El depósito de β amiloide en el parénquima cerebral es una característica distintiva de la neuropatología de la enfermedad del Alzheimer (EA), pero también ocurre en grado menor en el envejecimiento. Por su parte, Zhang y col. (2001) encontraron, mediante estudios in vitro, que el E2 protege a las neuronas contra la toxicidad generada por el péptido β -amiloide y el estrés oxidativo.

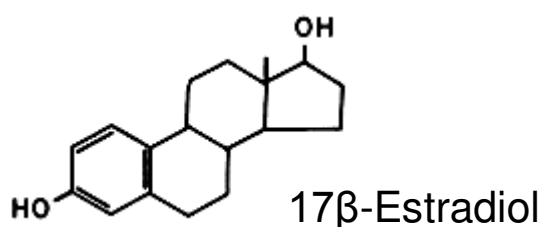


Figura 4 El 17 β -Estradiol es considerado como el estrógeno más potente. Tomada de Moreno-Piovano (2013).

1.2.3. Progestágenos

Dentro de los progestágenos, se encuentran la progesterona y la alopregnanolona (Fig. 5). La progesterona derivada de cerebro tiene un rol fundamental en la formación y el arreglo

de las vainas de mielina, las cuales son necesarias para la eficiente y rápida conducción de los potenciales de acción (Charalampopoulos y col., 2008). Esto fue reportado in vivo, luego de una criolesión del nervio ciático de ratón, e in vitro en co-cultivos de células de Schwann y neuronas sensoriales (Koenig y col., 1995). Los efectos positivos de la progesterona sobre los procesos de mielinización fueron luego confirmados por numerosos trabajos (Azcoitia y col., 2003; Ghomari y col., 2005). La progesterona derivada de cerebro también parecería tener un rol importante en ciertos procesos neurodegenerativos. Lopez-Rodriguez y col. (2015) encontraron que los niveles de progesterona se encuentran disminuidos en el cerebro de ratones hembra tras una injuria cerebral traumática (TBI, del inglés **T**raumatic **B**rain **I**njury) y que los mismos muestran una correlación positiva con la recuperación neurobiológica observada. Sumado a ello, Liu y col. (2013) mostraron que la administración de la proteína A β ₂₅₋₃₅ (el principal factor etiológico de la EA) en la región CA1 del hipocampo bilateral en rata disminuye los niveles de progesterona en la corteza prefrontal y el hipocampo, regiones principales asociadas a los procesos de memoria y aprendizaje. La progesterona también tiene un marcado efecto neuroprotectivo frente a injurias de la espina cortical, isquemias cerebrales y accidentes cerebrovasculares (Guennoun y col., 2015).

La alopregnanolona es sintetizada a partir de la progesterona y parecería tener un rol clave durante el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (Brinton, 2013; Escudero y col., 2012; Singh y col., 2012). Particularmente, se han detectado menores niveles de alopregnanolona en la corteza prefrontal y la corteza temporal de pacientes con la EA (Luchetti y col., 2011b). En el mismo sentido, se reportó una disminución del contenido de alopregnanolona en la materia blanca de pacientes con esclerosis múltiple y en los fluidos cerebrospinales de pacientes con la enfermedad de Parkinson (di Michele y col., 2003). En modelos animales transgénicos de la EA, la alopregnanolona revirtió los déficits cognitivos y neurogénicos (Singh y col., 2012). Al igual que la progesterona, la alopregnanolona interviene en la recuperación y supervivencia neuronal tras injurias traumáticas cerebrales y de la espina cortical. Sumado a ello, los niveles de alopregnanolona se han relacionado con la estimulación de la supervivencia neuronal hipocampal y la inhibición de la apoptosis celular (Charalampopoulos y col., 2008; Wang y col., 2005).

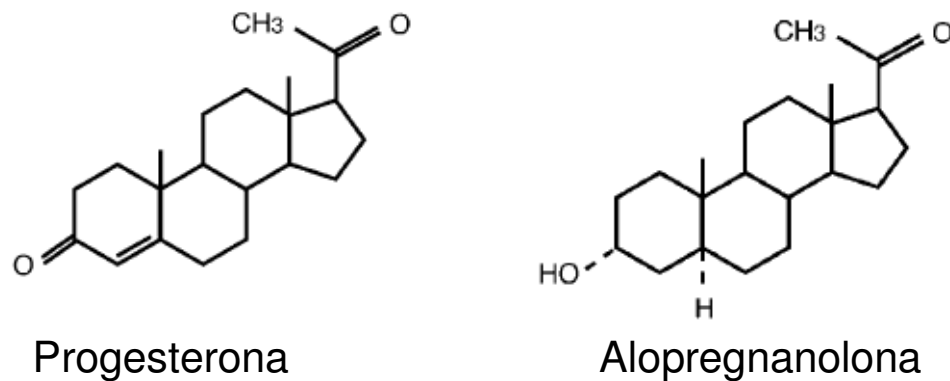


Figura 5 Progesterona y Allopregnanolona. Tomado y adaptado de Schumacher y col. (2003).

1.2.4. Andr6genos

Los andr6genos son hormonas sexuales masculinas entre las cuales podemos encontrar la testosterona y la dehidroepiandrosterona (DHEA) (Fig. 6). La testosterona, por su parte, regula la producci3n neuronal de p6ptidos amiloides y afecta el proceso de mielinizaci3n (Gouras y col., 2000; Magnaghi y col., 1999). En el mismo sentido, Lau y col. (2014) reportaron que en cultivos primarios de neuronas hipocampales expuestas a p6ptidos amiloides, la testosterona preserva la integridad de las neuritas y la expresi3n de las prote3nas pre-sin6pticas. Tambi3n se ha reportado que concentraciones fisiol3gicas de testosterona protegen cultivos primarios de neuronas humanas contra la apoptosis inducida por la deprivaci3n de suero (Hammond y col., 2001).

La DHEA y su forma sulfatada promueven la supervivencia y diferenciaci3n celular en cultivos de neuronas (Bologa y col., 1987), protegen las neuronas hipocampales de los efectos t3xicos del glutamato (Cardounel y col., 1999) y estimulan el crecimiento de las neuritas en cultivos de neuronas corticales aisladas de cerebros de embriones de rata (Compagnone y Mellon, 1998). La DHEA y su forma sulfatada tambi3n estimulan el aprendizaje en ratones adultos (Flood y Roberts, 1988) y protegen contra la neurotoxicidad inducida por los p6ptidos amiloides (Cardounel y col., 1999). En pacientes con la EA, menores niveles de DHEA sulfatada se encontraron en el cerebelo, cuerpo estriado e hipot6lamo. Contrariamente, los niveles de DHEA resultaron aumentados en el hipocampo, hipot6lamo, corteza frontal y temporal y esto fue correlacionado con el estadio neuropatol3gico en el que se encontraba la EA. Este incremento fue sugerido como un posible mecanismo compensatorio por parte de los neuroesteroides para sobrellevar el avance de dicha enfermedad (Luchetti y col., 2011b).

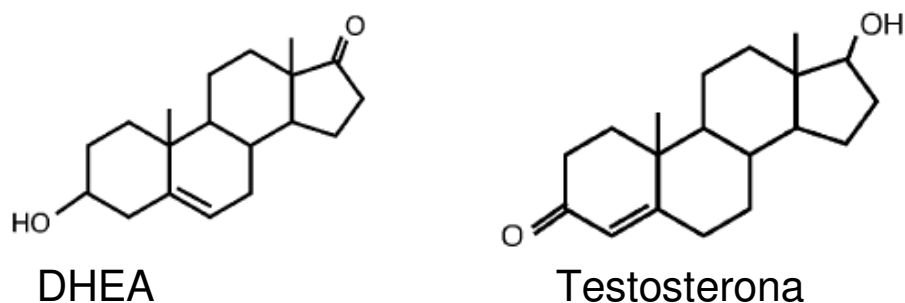


Figura 6 Dehidroepiandrosterona (DHEA) y Testosterona. Tomado y adaptado de Schumacher y col. (2003).

1.3. Vías de síntesis de los neuroesteroides: principales enzimas y proteínas implicadas

En distintas regiones del cerebro, incluyendo el hipocampo, han sido detectadas por inmunohistoquímica e hibridación in situ las principales enzimas y proteínas implicadas en la síntesis de los neuroesteroides. Las enzimas esteroideogénicas pueden diferenciarse en dos grandes grupos de proteínas nombradas como citocromos P450 o hidroxisteroide deshidrogenasas (HSD). Los genes que codifican las enzimas citocromos P450 son comúnmente llamados CYP en humanos y Cyp en roedores, seguidos por un número que indica la familia a la que pertenecen y una letra indicando la subfamilia. Cuando existen dos o más familias, se agrega otro número luego de la última letra. A modo de ejemplo, la enzima citocromo P450scc (P450scc, del inglés P450 cholesterol side-chain cleavage) está codificada por el gen Cyp11a1 en rata (Citocromo P450, familia 11, subfamilia a, polipéptido 1) (Payne y Hales, 2004).

Dentro de las principales proteínas/enzimas esteroideogénicas, encontramos la proteína de la regulación esteroideogénica aguda (StAR; del inglés **S**teroidogenic **A**cute **R**egulatory protein), P450scc, 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa / Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3 β -HSD), citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa (P450(17 α)), esteroide 5 α -reductasa (5 α -reductasa), 3 α -hidroxisteroide deshidrogenasa (3 α -HSD), P450arom, aldosterona sintasa (P450(11 β)-2) y 17 β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3 (17 β -HSD-3) (Fig. 7). La actividad biológica de las enzimas mencionadas ha sido reportada por la habilidad de los explantes de cerebro de convertir precursores radiomarcados en neuroesteroides bioactivos. La mayoría de estas enzimas están implicadas en la síntesis de novo de los esteroides en el cerebro. Contrariamente, otras enzimas como la P450arom y la 5 α -reductasa son

principalmente responsables de la conversión que sufren los esteroides hormonales producidos por las gónadas que atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro (Do Rego y col., 2009).

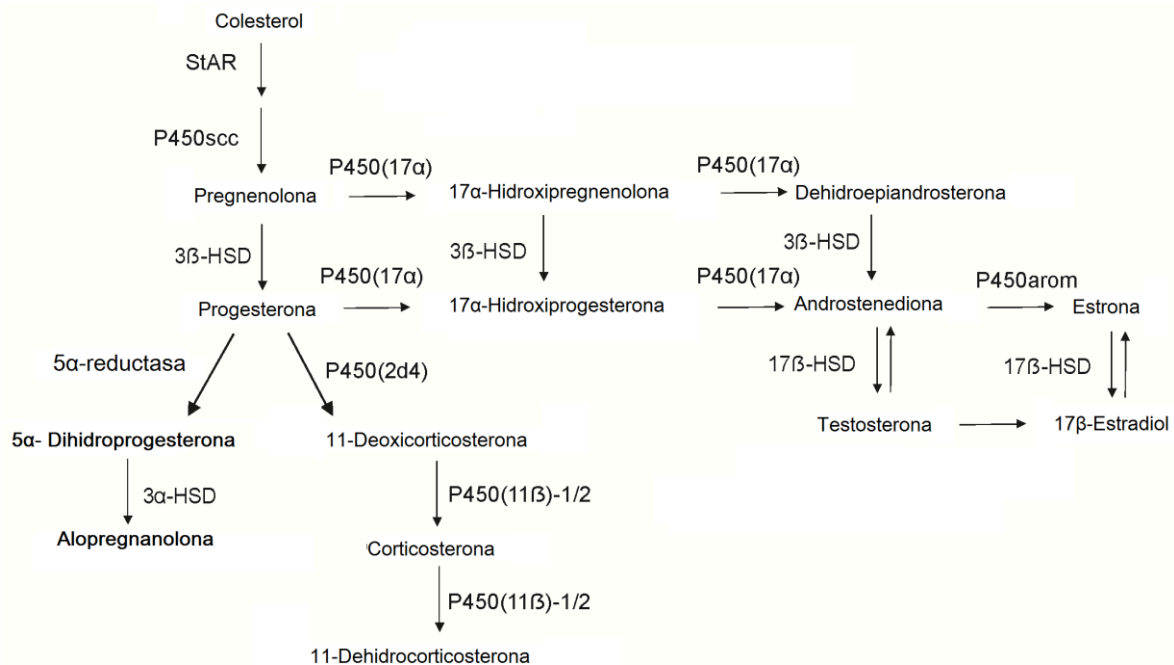


Figura 7 Esquema de las principales vías de síntesis de los neuroesteroides en el hipocampo. Proteína de la regulación esteroidogénica aguda (StAR), citocromo P450scc (P450scc), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3β-HSD), citocromo P450 17α-hidroxilasa/c17,20-liasa (P450(17α)), esteroide 5α-reductasa (5α-reductasa), 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α-HSD), citocromo P450 aromatasa (P450arom), aldosterona sintasa (P450(11β)-2) y 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (17β-HSD-3). Tomado y adaptado de Rossetti y col. (2015).

1.3.1. Proteína de la regulación esteroidogénica aguda

El acceso del colesterol a la primera enzima neuroesteroidogénica, la citocromo P450scc constituye la etapa limitante de la síntesis de esteroides. La P450scc está localizada en el interior de la membrana mitocondrial y requiere de una proteína que transporte el colesterol al interior de dicha membrana (Miller, 1995). Esta función es llevada a cabo por StAR (Fig. 8).

Furukawa y col. (1998) demostraron por primera vez la presencia de ARNm de StAR en el cerebro de rata y sus resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica en cerebro humano, de rata y de ratón (Sierra y col., 2003). StAR está ampliamente distribuida en el

cerebro, aunque su expresión está limitada a poblaciones celulares específicas incluyendo neuronas, células gliales y precursores en proliferación. Los mayores niveles de expresión han sido descritos en neocorteza, tálamo, hipocampo y cerebelo (Sierra, 2004). En varias regiones, el ARNm de StAR esta co-localizado con los transcritos de las enzimas esteroidogénicas P450scc y 3 β -HSD. Estudios inmunohistoquímicos revelan que la proteína es detectada por primera vez en día post-natal (DPN) 1 en ratón y en DPN 10 en rata. El hecho de que en roedores la síntesis de novo ocurra en el cerebro en desarrollo indica que la proteína StAR es una proteína funcional durante el período postnatal (Do Rego y col., 2009).

1.3.2. Citocromo P450scc

La enzima P450scc es una monooxigenasa mitocondrial y cataliza el primer paso de la vía de síntesis de neuroesteroides: la conversión de colesterol en pregnenolona (Fig. 8). Dicha reacción ocurre en tres etapas sucesivas: 20 α -hidroxilación; 22-hidroxilación y la escisión del C20-C22 de los enlaces de carbono de la molécula de colesterol (Chung y col., 1986).

La presencia de P450scc se describió tanto en células neuronales como células gliales. En embriones de ratas, los sitios de mayor expresión de la P450scc se encontraron principalmente en estructuras sensoriales del sistema nervioso periférico, sugiriendo una posible función de dicha enzima en el desarrollo y la maduración del cerebro (Compagnone y col., 1995). Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa luego de una transcripción reversa (RT-PCR) y Southern blot, se reportó que la expresión de P450scc también es región-específica en el cerebro adulto, encontrándose en corteza, amígdala, hipocampo y cerebro medio (Compagnone y Mellon, 2000; Do Rego y col., 2009). En el cerebro humano, la presencia de ARNm de la P450scc ha sido descrita en bulbo olfatorio, cuerpo calloso, amígdala, hipocampo y corteza cerebral. En algunas de dichas regiones, también ha sido detectada a nivel proteico.

Aunque es posible detectar ARNm de P450scc en cerebro, los niveles de expresión resultan extremadamente menores comparados con los niveles en testículo u ovario. A modo de ejemplo, en cultivos de hipocampo de ratas de 10-12 días de edad, los niveles de ARNm de la P450scc fueron de aproximadamente 110 moléculas/miligramo de proteínas (Munetsuna y col., 2009b). El hecho de que su expresión sea tan baja dificulta su estudio en cerebro, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

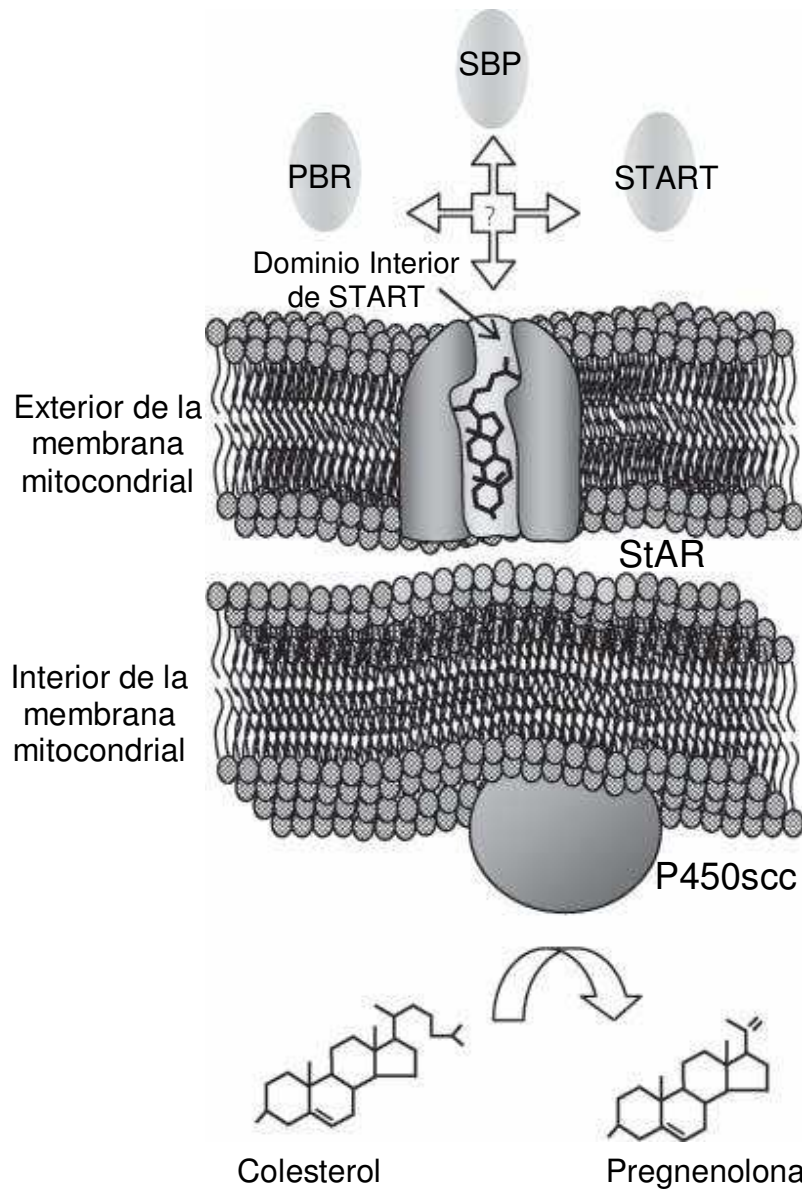


Figura 8 Representación de la proteína esteroidogénica de regulación aguda (StAR) y la citocromo P450scc (P450scc) en la mitocondria. StAR se encuentra localizada en la parte exterior de la membrana mitocondrial donde el esteroide precursor (colesterol) está acumulado. StAR tiene un dominio interior que facilita el transporte del colesterol hasta P450scc, la cual se encuentra localizada en el interior de la membrana mitocondrial. Otras proteínas (denominadas PBR, SBP o START) podrían interactuar con StAR para colaborar con el transporte. El colesterol es convertido a pregnenolona por la enzima P450scc. Tomado y adaptado de Sierra (2004).

1.3.3. 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa

La enzima 3β -HSD es una deshidrogenasa/ isomerasa y actúa convirtiendo la pregnenolona en progesterona; aunque también interviene en otras reacciones esteroidogénicas (Fig. 9) (Compagnone y Mellon, 2000). Existen al menos dos isoformas humanas y cuatro en

roedores (Do Rego y col., 2009). En rata, la isoforma tipo 1 ha sido reportada en distintas regiones del cerebro como cerebelo, hipocampo, corteza e hipotálamo, aunque los niveles de expresión resultan bajos comparados con los niveles hallados en testículos y ovarios (Mellon y col., 2001). En la corteza cerebelar, el ARNm ha sido detectado en células de Purkinje, granulares y basket/estelares; contrariamente, en otras áreas del cerebro, 3 β -HSD sólo se pudo determinar en células neuronales. En humanos, la isoforma tipo 2 ha sido detectada en distintas regiones del cerebro, como amígdala, hipocampo, cuerpo caloso, tálamo y espina cortical, mediante RT-PCR. Líneas celulares humanas neuronales, astrogiales y olodendrogiales también expresan 3 β -HSD, sugiriendo que son varios los tipos celulares que tienen la capacidad de sintetizar progesterona (Do Rego y col., 2009).

1.3.4. Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa

La pregnenolona también puede ser convertida a 17 α -hidroxipregnenolona por la enzima P450(17 α). Dicha enzima tiene actividad hidroxilasa/liasa y también interviene en la formación de los andrógenos androstenediona y DHEA (Fig. 9) (Mellon y col., 2001).

En roedores, la P450(17 α) se encuentra en gónadas y placenta, pero no en glándulas adrenales. Sumado a ello, también se la puede encontrar en cerebro, corazón y riñón (Missaghian y col., 2009). Entre otras regiones, se la ha hallado en corteza, hipocampo y cerebelo (Mellon y col., 2001). Es interesante resaltar que la regulación de la expresión de la P450(17 α) en el cerebro está determinada por el desarrollo, ya que se la ha encontrado en distintas regiones del cerebro a lo largo de los diferentes estadios post-natales. Esto sugeriría que estaría implicada en el desarrollo del sistema nervioso central, la neurogénesis y el establecimiento de las conexiones entre neuronas (Compagnone y col., 1995).

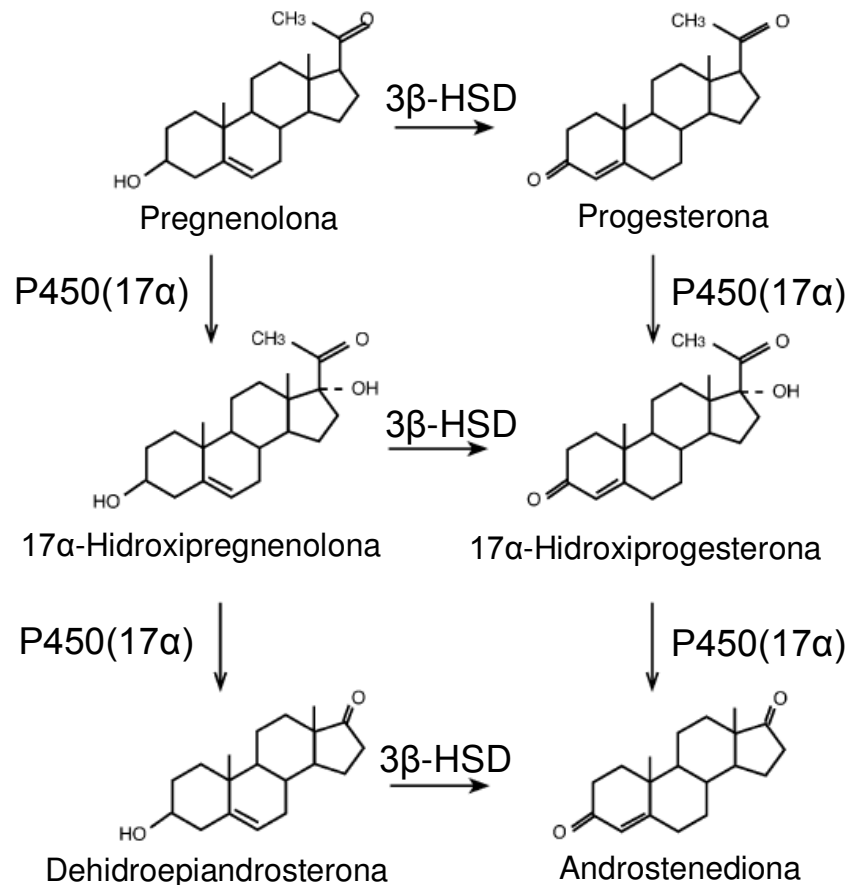


Figura 9 Reacciones esteroidogénicas catalizadas por las enzimas citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa (P450(17 α)) y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3 β -HSD). Tomado y adaptado de Schumacher y col. (2003).

1.3.5. Esteroide 5 α -reductasa

La importancia fisiológica de la 5 α -reductasa en el cerebro deriva de dos de sus propiedades: su capacidad de convertir testosterona en uno de sus andrógenos más potentes, la dihidrotestosterona (la cual participa en procesos de diferenciación sexual en algunas regiones del cerebro) y la capacidad de convertir progesterona y desoxicorticosterona en sus derivados reducidos, precursores de alopregnanolona y tetrahydrodesoxicorticosterona (Do Rego y col., 2009). Las principales reacciones en las cuales interviene dicha enzima se indican en la Fig. 10.

Dos isoformas de la 5 α -reductasa han sido reportadas, 5 α -reductasa tipo 1 (5 α -reductasa-1) y tipo 2 (5 α -reductasa-2). La 5 α -reductasa-1 es la isoforma predominante en cerebro de rata, ratón y humanos y ha sido descrita como una enzima constitutiva que juega un rol protector en procesos neuronales y catabólicos. Dicha isoforma ha sido reportada en

hipotálamo, amígdala, hipocampo, cerebelo y corteza cerebral, entre otras regiones (Do Rego y col., 2009; Melcangi y col., 1993). La 5α -reductasa-2, en cambio, ha sido asociada a funciones dimórficas sexuales en el macho como el desarrollo de la próstata y los órganos genitales externos y la diferenciación del sistema nervioso central (Poletti et al., 1998; Russell and Wilson, 1994). Esta isoforma se encuentra en cerebro de rata, casi exclusivamente durante el desarrollo fetal tardío y los estadios post-natales tempranos; en el cerebro humano resulta prácticamente indetectable (Do Rego et al., 2009).

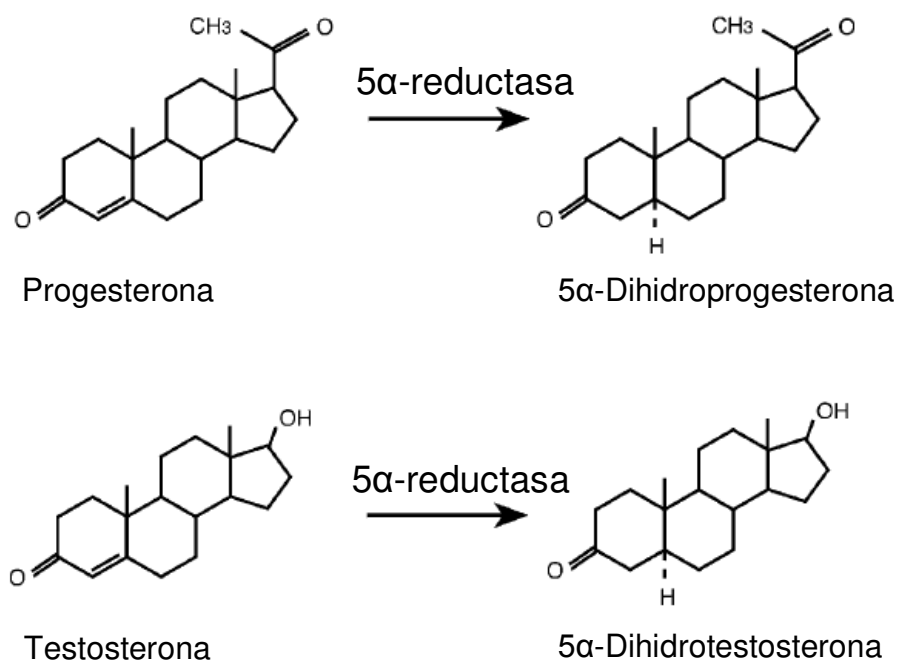


Figura 10 Principales reacciones catalizadas por la enzima esteroide 5α -reductasa (5α -reductasa): formación de la 5α -Dihidrottestosterona y la 5α -Dihidroprogesterona. Tomado y adaptado de Schumacher y col. (2003).

1.3.6. 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

La enzima 3α -HSD, también denominada 3α -hidroxiesteroide oxido-reductasa, es una enzima bifuncional que convierte, de manera reversible, esteroides 5α -reducidos en tetrahidrosteroides (Do Rego y col., 2009). Dicha enzima es un miembro de la familia aldo-ceto reductasa, que también comprende aldehído reductasas, aldosa reductasas y dihidrodiol deshidrogenasa (Penning y Drury, 2007). Entre las reacciones en las cuales participa, la conversión de 5α -dihidroprogesterona a alopregnanolona es una de las más destacadas (Fig. 11), considerando la gran importancia que ha adquirido en los últimos años la alopregnanolona a nivel de las funciones cerebrales.

En humanos, sólo cuatro isoformas funcionales (1, 2, 3 y 20a) han sido descritas para la enzima 3α -HSD y caracterizadas en base a su afinidad con los sustratos correspondientes. Las isoformas tipo 2, 3 y 20a han sido detectadas en distintas regiones del cerebro como cerebelo, espina cortical y lóbulos fronto-temporales (Do Rego y col., 2009).

Una única isoforma se detectó en rata, la misma interviene en todas las reacciones oxidativas y reductivas (Penning y col., 2001) y ha sido descrita en numerosas regiones del cerebro en forma de ARNm y proteína. Los máximos niveles fueron reportados en el bulbo olfatorio; mientras que las mínimas concentraciones fueron encontradas en corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo, cerebelo y pituitaria (Compagnone y Mellon, 2000). La presencia de la 3α -HSD se detectó tanto en células neuronales y gliales. La actividad de dicha enzima parecería estar exclusivamente localizada en astrocitos tipo 1; mientras que la actividad de la 5α -reductasa, en los astrocitos tipo 2. El hecho de que las actividades enzimáticas de ambas proteínas sean independientes y estén diferencialmente localizadas sugiere la coordinación entre células neuronales y gliales para asegurar la formación de los esteroides reducidos (Do Rego y col., 2009).

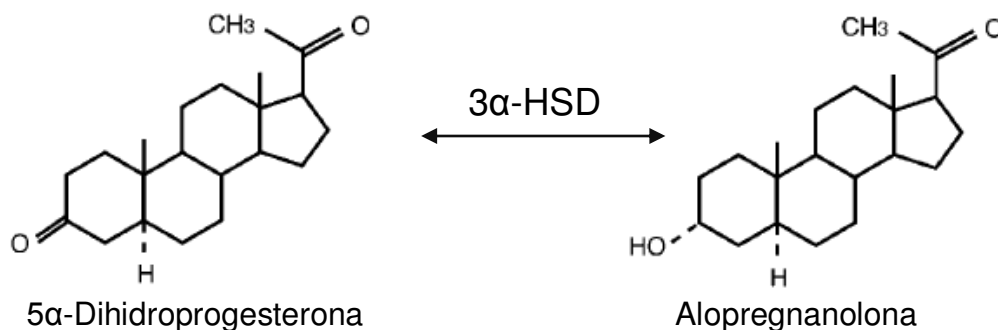


Figura 11 La conversión de la 5α -Dihidroprogesterona a Alopregnanolona es llevada a cabo por la enzima 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HSD). Tomado y adaptado de Schumacher y col. (2003).

1.3.7. Citocromo P450 aromatasa

La enzima P450arom, también llamada sintasa estrogénica, es un complejo enzimático terminal que cataliza la conversión de los C19 andrógenos a C18 estrógenos (estrone y E2; Fig. 12) (Compagnone y Mellon, 2000). En muchas especies, incluidos humano, rata y ratón, el gen que codifica para dicha enzima es único; en otras especies, como cerdo, existen múltiples isoformas (Do Rego y col., 2009).

La presencia de ARNm de aromatasa fue detectada en el cerebro de mamíferos utilizando RT-PCR e hibridación in situ. En rata, la expresión de dicha enzima fue descripta en el área preóptica, hipotálamo medio basal, núcleo hipotalámico ventromedial, amígdala media e hipocampo, entre otras regiones. En el cerebro humano, el ARNm de aromatasa fue detectado en corteza temporal y frontal, hipocampo, tálamo e hipotálamo. La presencia de la proteína fue confirmada por inmunohistoquímica en la corteza cerebral, el sistema límbico y el hipotálamo (Do Rego y col., 2009).

1.3.8. 17-oxido- reductasa/17-cetoesteroide reductasa

La conversión de los 17-cetoesteroides y los 17 β -hidroxiesteroides es catalizada por una enzima multifuncional y reversible denominada 17 β -HSD, que es responsable de la biosíntesis y la inactivación de las hormonas esteroides sexuales (Labrie y col., 2000). Esta enzima también cataliza la conversión reversible de otros esteroides C19 como la DHEA y el androstenediol (Fig. 12) (Labrie y col., 2000). Actualmente, se encuentran descriptas en vertebrados doce isoenzimas (tipo 1-12) que difieren en términos de distribución tisular, localización subcelular, actividad catalítica, especificidad de sustrato y propiedades bioquímicas. Incluso los genes que las codifican son múltiples (Do Rego y col., 2009). Las tipo 1,3,5,7 y 12 son responsables de la formación de los 17-hidroxiesteroides incluyendo testosterona, E2 y dihidrotestosterona; mientras que las tipo 2,4,6,9,10 y 11 son responsables de la inactivación de la testosterona y el E2 (Do Rego y col., 2009).

La localización de las diferentes isoformas ha sido investigada en el sistema nervioso central de los mamíferos mediante inmunohistoquímica y RT-PCR. En roedores, la inmunoreactividad de la enzima 17 β -HSD (tipo 1-4) fue detectada en células epididimales y astrocitos en hipocampo, corteza cerebral, tálamo e hipotálamo (Hojo y col., 2008). A su vez, la expresión del ARNm también fue reportada en el cerebro de rata neonatal y adulta (Hojo y col., 2004; Hojo y col., 2008). En el cerebro humano, también se describió la presencia de ARNm de las isoenzimas tipo 1-4 en lóbulo temporal, corteza cerebral, hipocampo y materia blanca subcortical (Do Rego y col., 2009).

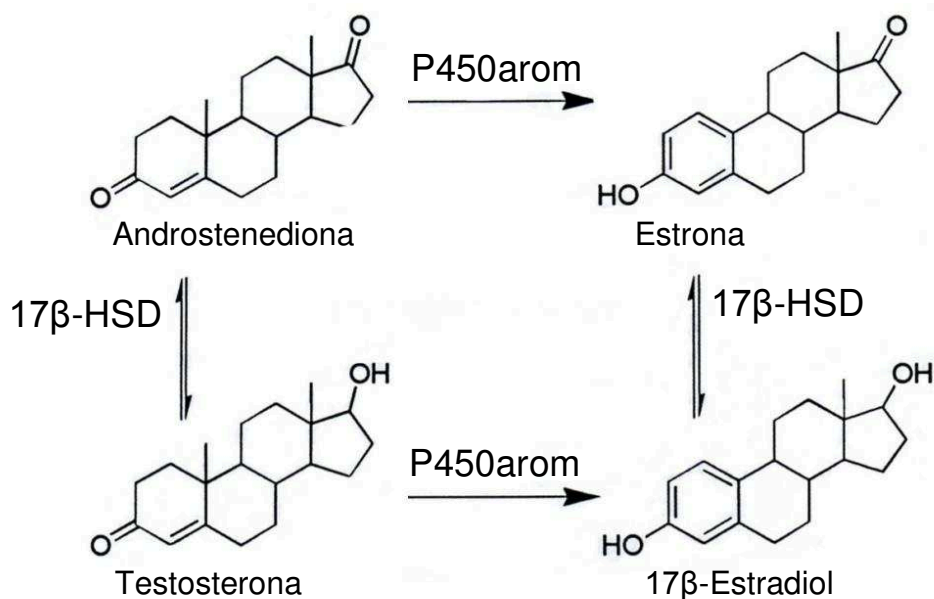


Figura 12 La enzima citocromo P450 aromatasa (P450arom), también llamada sintasa estrogénica, cataliza la conversión de los C19 andrógenos a C18 estrógenos: estrona y 17β-Estradiol (E2). Por su parte, la enzima 17-oxido-reductasa/17-cetoesteroide reductasa (17β-HSD) cataliza la conversión reversible de androstenediona y estrona en testosterona y E2, respectivamente. Tomado y adaptado de Schumacher y col. (2003).

1.3.9. Aldosterona sintasa

La enzima P450(11β)-2 es una enzima esteroide 11-β-monooxigenasa que cataliza los pasos de síntesis de aldosterona, corticosterona y 18-hidroxycorticosterona (Fig. 13) (Do Rego y col., 2009).

La presencia de ARNm de P450(11β)-2 fue reportada en el cerebro de roedores utilizando RT-PCR y Southern blot. Específicamente, en rata, la presencia de dicha enzima fue descrita en hipotálamo, hipocampo, amígdala y cerebelo (Gomez-Sanchez y col., 2014; MacKenzie y col., 2000). En humanos, en cambio, la presencia de ARNm no fue detectada en amígdala, cerebelo e hipocampo (Yu y col., 2002). Sin embargo, hasta el momento, es poca la información disponible acerca de la P450(11β)-2 en cerebro, considerándose una de las enzimas neuroesteroideogénicas menos estudiada.

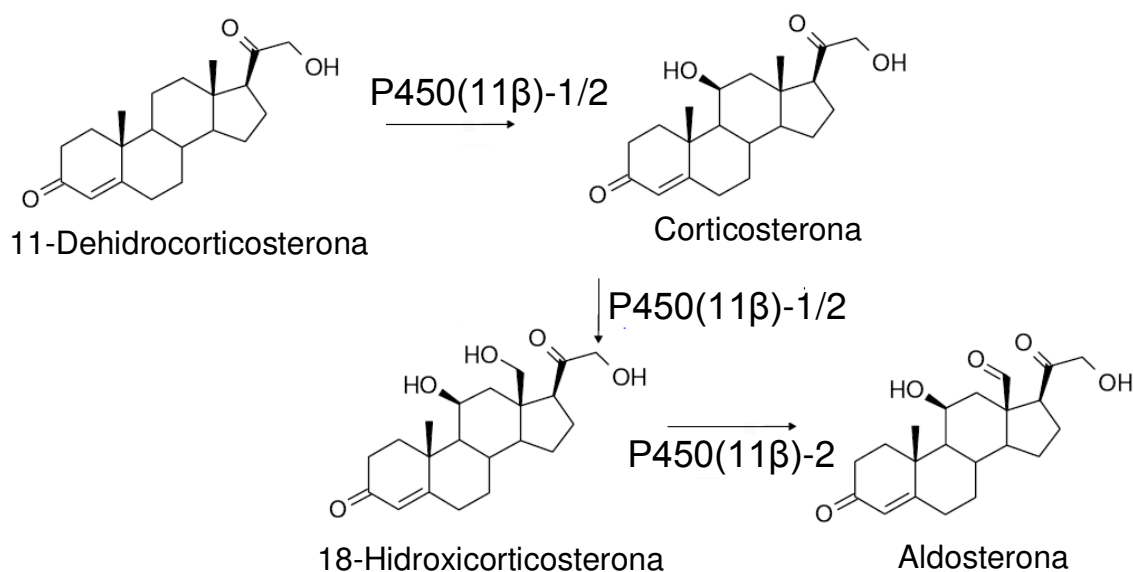


Figura 13 Las enzimas 11 β -hidroxilasa (P450(11 β)-1) y aldosterona sintasa (P450(11 β)-2) catalizan los pasos de síntesis de aldosterona, corticosterona y 18-hidroxicorticosterona. Tomado y adaptado de Roumen y col. (2007).

1.4. Regulación transcripcional de las enzimas esteroideogénicas

En los últimos años se ha prestado especial atención a los cambios de expresión que sufren las enzimas esteroideogénicas y particularmente a los mecanismos que la regulan. Hasta el momento, las regiones promotoras y los factores de transcripción que regulan la activación/inhibición de las mismas han sido caracterizados por diversos autores. Estos estudios se han centrado en el control transcripcional de los genes en regiones esteroideogénicas tradicionales como las gónadas y las glándulas suprarrenales; sin embargo, poco se conoce sobre dicha regulación en el sistema nervioso central.

1.4.1. Citocromo P450_{scc}

La enzima P450_{scc} se encuentra codificada por el gen CYP11A1. La región promotora presenta elementos basales de regulación que se extienden desde la caja TATA hasta aproximadamente -130; una región distal que abarca desde -130 a -500, una secuencia de respuesta a adenosín monofosfato cíclico (cAMP; de inglés **C**yclic **A**denosine **M**onophosphate, U-CRS; del inglés **U**pstream **c**AMP-**R**esponsive **S**equences) a -1600 y un activador adrenal (AdE; del inglés **A**drenal **E**nhancer) que se ubica alrededor de -1850

(considerando +1 el sitio de inicio de la transcripción) (Shih y col., 2011). La región proximal controla la actividad promotora basal e incluye: la caja TATA a -24/-29, un sitio de unión al factor esteroideogénico 1 (SF-1; del inglés **S**teroidogenic **F**actor 1) a -38/-40 y un sitio correspondiente al factor promotor selectivo 1 (Sp1; del inglés **S**elective **p**romoter factor 1) imperfecto a -101/-111, que se une a proteínas de la familia Sp1 (Shih y col., 2011). Un esquema del promotor se indica en la Fig. 14.

En las glándulas adrenales y las células testiculares de Leydig, los principales factores de transcripción implicados son SF-1, el receptor nuclear Dax-1 y la proteína de activación transcripcional de 132 kDa (TreP-132; del inglés **T**ranscriptional **r**egulation **P**rotein of 132 kDa). En ovario, por otra parte, el control es llevado a cabo por los factores receptor homólogo de hígado 1 (LRH-1; del inglés **L**iver **R**eceptor **H**omolog-1), GATA4 y CREB-1/Fra-2 (Shih y col., 2011). En la placenta, proteínas como la proteína de unión a terminaciones repetitivas largas (LBP; del inglés **L**ong terminal repeat **B**inding **P**rotein), TreP-132 (-155/-131), CREB-1 y GATA-2 (-475/-447) han sido sugeridas como reguladoras de la expresión de la P450scc (Lavoie y King, 2009; Shih y col., 2011). Sp1, la proteína activadora 1 (AP-1; del inglés **A**ctivating **P**rotein 1) y 2 (AP-2) también han sido reconocidos como activadores de la expresión de la P450scc. En el cerebro en desarrollo, miembros de la familia Sp se unen a la región -130/-94 del promotor de rata de P450scc y activan la transcripción (Hammer y col., 2004).

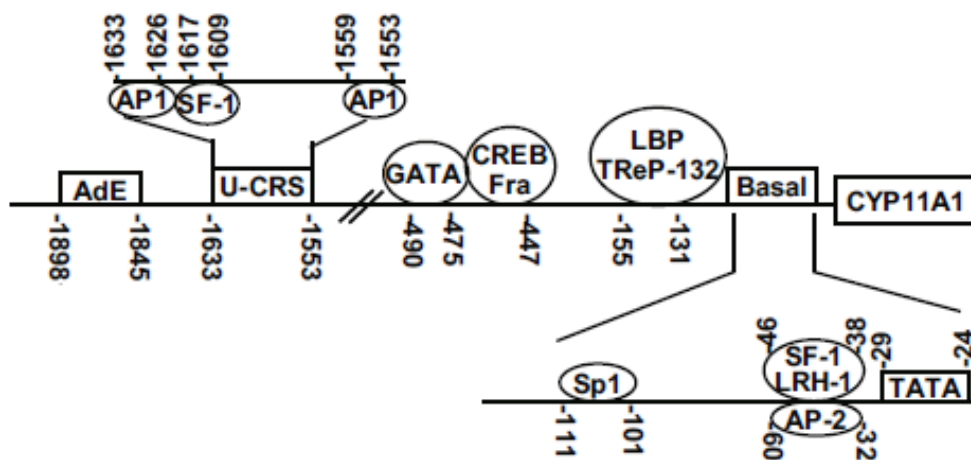


Figura 14 Región promotora del gen CYP11A1. Se indican el promotor basal (Basal), la caja TATA, la secuencia de respuesta a cAMP (U-CRS), el activador adrenal (AdE), la proteína activadora 1 (AP1), la proteína activadora 2 (AP-2), el factor esteroideogénico 1 (SF-1), GATA, la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB/Fra), proteína de unión a terminaciones repetitivas largas (LBP), la proteína de

activación transcripcional de 132 kDa (TReP-132), el receptor homólogo de hígado 1 (LRH-1) y el factor promotor selectivo 1 (Sp1). Tomado y adaptado de Shih y col. (2011).

1.4.2. Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa

El gen CYP17A1 codifica para la enzima esteroidogénica P450(17 α). Un esquema de los promotores en humano y rata se indica en la Fig. 15. En la región promotora de la secuencia de rata se han identificado distintos elementos regulatorios. Entre ellos, un elemento proximal asociado a la actividad basal y a la inducida por cAMP, localizado en la posición -85/-55 y capaz de interactuar con SF-1; y un segundo elemento en cis que contiene tres secuencias de reconocimiento para receptores nucleares de dedos de zinc, identificado en las bases -447/-399 (Lin y col., 2001). Molquentin (2000) determinó que una completa maquinaria de receptores nucleares incluyendo SF-1, el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés **Nerve Growth Factor**) I-B y dos factores, el factor esteroidogénico inductor de la transcripción 1 y 2 (ATF-1 y ATF-2, del inglés **Activating Transcription Factor 1 y 2**), son capaces de unirse a dicha secuencia. Sumado a ello, Dalla Valle y col. (2002) describieron que el gen posee múltiples sitios de inicio de la transcripción, lo cual contribuye a que la expresión sea tejido específico y produce transcritos de diferentes tamaños en los tejidos extra-glandulares.

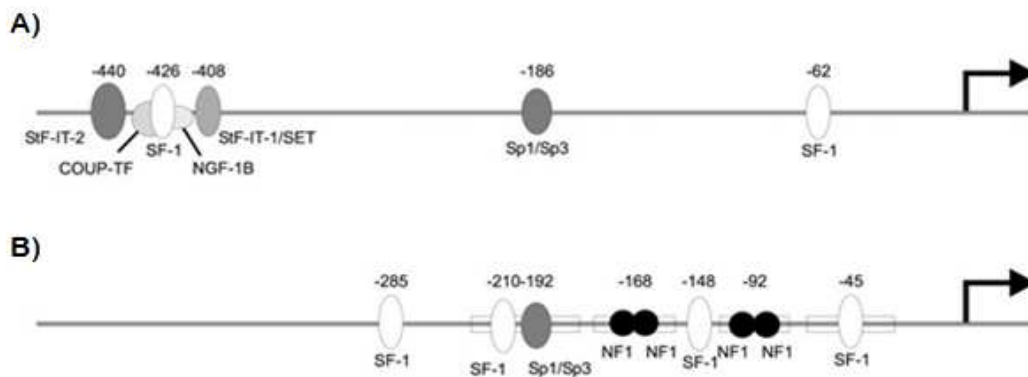


Figura 15 Comparación de la secuencia correspondiente al promotor proximal del gen CYP17A1 de dos especies: rata (A) y humano (B). Los números muestran la posición de cada uno de los sitios de unión. Se indican el factor esteroidogénico 1 (SF-1), el factor de crecimiento nervioso IB (NGF-IB), el factor promotor selectivo 1 y 3 (Sp1 y Sp3), el factor nuclear 1 (NF-1), el factor esteroidogénico inductor de la transcripción 1 (StF-IT-2), StF-IT-1/SET y el factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TF). Los promotores de las dos especies contienen un sitio SF-1 próximo al sitio de inicio de la transcripción; aunque los otros sitios son sustancialmente diferentes. Tomado y adaptado de Lin y col. (2001).

1.4.3. Citocromo P450 aromatasa

El gen CYP19A1 codifica para la enzima P450arom. En rata, se han descritos tres promotores asociados a dicho gen: dos promotores proximales P.II y P.I.t que controlan la expresión de dicha enzima en las células de la granulosa y células del cuerpo lúteo y células de Leydig, respectivamente; y un promotor distal P.I.f que regula la expresión de la P450arom en el cerebro (Silandre y col., 2007). Estudios *in vivo* sugieren que la región proximal comprendida entre -278/-43 contiene los elementos necesarios para dirigir la expresión de la aromatasa en ovario. Dentro de esta región, encontramos una secuencia similar al elemento de respuesta a cAMP (CLS; del inglés cAMP-responsive element-Like Sequence) y dos sitios de unión a la familia de receptores nucleares de membrana 5A (NREa y NREb; del inglés Nuclear Receptor Element a y b). El promotor proximal también contiene un elemento de respuesta a miembros de la familia de dedos de zinc GATA y un sitio de unión a AP-3. Estos sitios de unión son altamente conservados entre especies (Stocco, 2008)

Algunos autores sugieren que CLS tiene un rol clave en la activación del promotor proximal de la enzima P450arom en las células de la granulosa (Stocco, 2008). Mutaciones de este elemento disminuyen, aunque no bloquean completamente, la inducción de la actividad de dicho promotor inducida por cAMP. Esta región puede ser reconocida por CREB y por la proteína beta de unión a los activadores CCAAT (Cebpb; del inglés CCAAT enhancer-binding protein beta). Este último factor tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad promotora de la aromatasa en células endometriales humanas. Por otra parte, existe evidencia que apoya la idea de que la activación de CLS es específica de tejido y de que otras proteínas y elementos son necesarios para la activación del promotor proximal en ovario. De hecho, ha sido descrito que los elementos CLS y NREa interactúan de manera aditiva para controlar la expresión de la aromatasa en células de la granulosa (Stocco, 2008).

1.4.4. Esteroide 5 α -reductasa

En ratas, existen dos isoformas de la 5 α -reductasa, la isoforma tipo 1 y la tipo 2. Hasta el momento, el promotor de la 5 α -reductasa no ha sido completamente caracterizado. Seenundun y Robaire (2005) clonaron y analizaron el extremo 5' del gen correspondiente a

la 5 α -reductasa-2 del epidídimo de rata. El sitio de inicio de transcripción y las regiones activadoras y represoras fueron identificadas. El promotor basal mostró una preferencia unidireccional y los factores de transcripción Sp1 y Sp3 mostraron interacción con la región promotora. Por su parte, Blanchard y col. (2007) evaluaron la región 5' del gen codificante de la enzima 5 α -reductasa-1. Dicha región contiene una isla CpG de aproximadamente 1000 pb, sugiriendo que la misma es un importante centro regulatorio de la transcripción. Sumado a ello, la secuencia es particularmente rica en sitios de unión a Sp1; aunque también reportaron la presencia de potenciales sitios de unión a factores de transcripción como AP-2 y NF-1. En diferentes líneas celulares humanas como PC3, HepG2 y HeLa, la secuencia estudiada mostró una actividad promotora bidireccional, a diferencia de la región promotora correspondiente a la 5 α -reductasa-2. Sumado a ello, Sp1 resultaría necesario para la actividad direccional mencionada (Blanchard y col., 2007).

1.4.5. 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

La región 5' del gen correspondiente a la enzima 3 α -HSD humana y de rata contiene secuencias consenso para los factores de transcripción factor de unión a octámeros 1 (Oct-1), AP-1 y numerosas copias perfectas e imperfectas de elementos de respuestas a hormonas esteroideas (Lin y Penning, 1995) (Fig. 16). En rata, Penning (1996) reportó la presencia de un activador proximal ubicado a -498/-199, un activador distal en la posición -2000/-4000 y un poderoso silenciador en -755/-498, considerando el sitio de inicio de la transcripción en +1. Sumado a ello, encontró que los glucocorticoides y los factores Oct-1 actúan como moduladores positivos y negativo, respectivamente, de la transcripción del gen mencionado. Otro factor de transcripción que ha sido implicado en la regulación transcripcional de las enzimas de la familia de las aldo ceto reductasas en rata es el NF-1. En este caso, Hung y Penning (1999) proponen que el NF-1 estaría regulando positivamente al gen de la enzima 3 α -HSD en el hígado de rata. Sin embargo, esta regulación también implicaría la interacción con otros factores que hasta el momento no se han descriptos. En humanos, también se ha reportado la presencia de numerosos elementos en cis como el elemento de respuesta osmótica, AP-1, elemento de respuesta a esteres de forbol y el elemento de respuesta antioxidante (Penning y Drury, 2007).

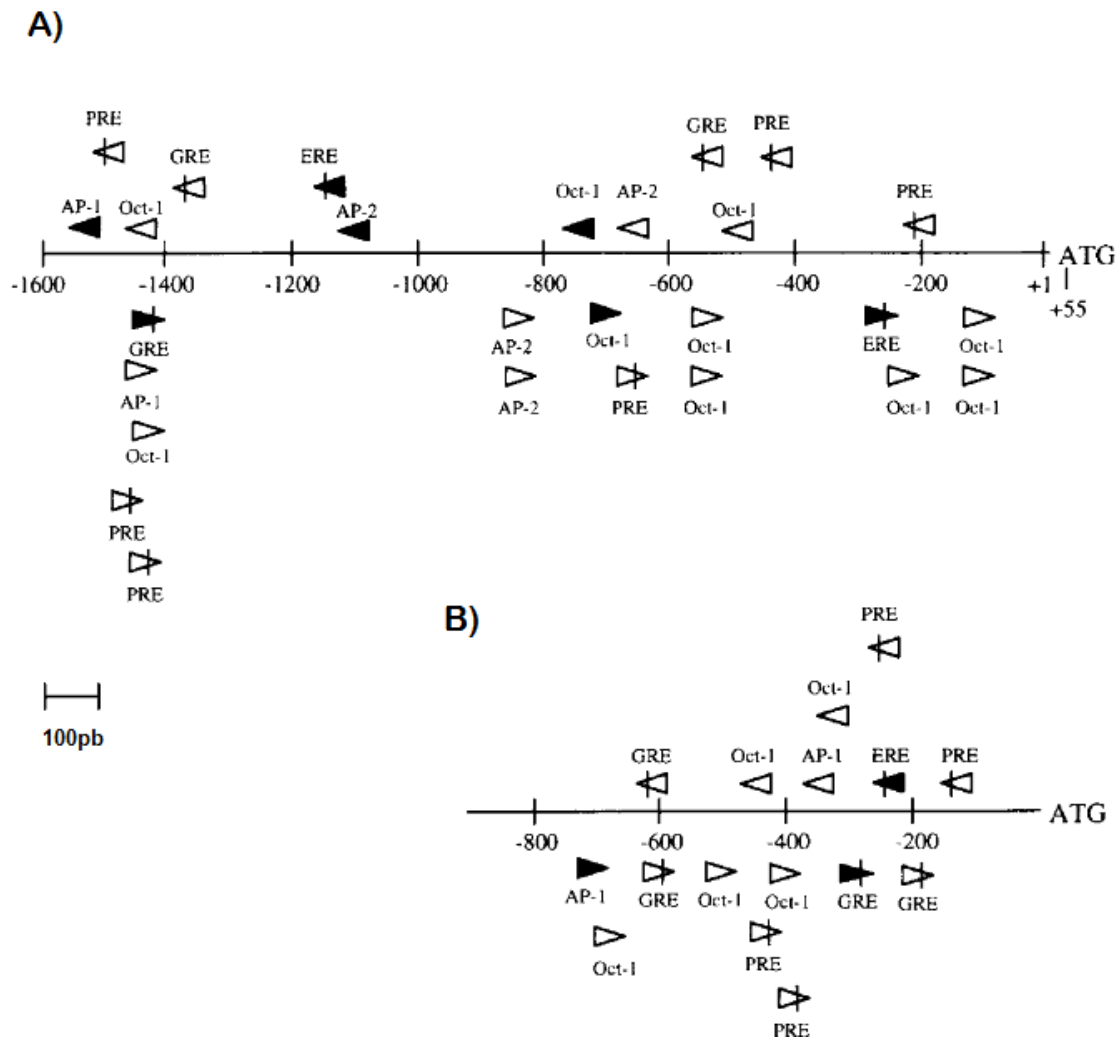


Figura 16 Región promotora del gen 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HSD) en rata (A) y humano (B). Se indican los codones de inicio ATG y distintos sitios de unión a factores de transcripción. Los números se indican considerando +1 el sitio de inicio de la transcripción. Se muestran los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), progesterona (PRE) y glucocorticoides (GRE), la proteína activadora 1 y 2 (AP-1 y AP-2) y el factor de unión a octámeros (Oct-1). Tomado y adaptado de Penning (1996).

1.4.6. Aldosterona sintasa

El gen que codifica para la enzima P450(11 β)-2 es conocido como CYP11B2. El análisis del extremo 5' de dicho gen en humanos reveló la presencia de numerosas secuencias en cis, entre ellas Ad1-Ad6 que se unen a receptores nucleares (Clyne y col., 1997). Además, se identificaron un elemento de respuesta a cAMP (CRE; del inglés **cAMP Response Element**) ubicado en -71/-64; un elemento Ad5 posicionado en -129/-114 y NBRE-1 en -766/-759. El elemento CRE está regulado por mecanismos dependientes de cAMP y proteína quinasa A (Bassett y col., 2000; Condon y col., 2002). Sumado a ello, el sitio CRE

es capaz de unirse a miembros de las familias de factores de activación transcripcional ATF-1 y ATF-2 y proteínas de unión a CRE (Bassett y col., 2000). La habilidad de dichos factores, particularmente de ATF-1 y CREB, para activar la transcripción está determinada por su estado de fosforilación (Bassett y col., 2004; Matthews y col., 1994). Sin embargo, CRE es insuficiente para una completa activación de la expresión génica (Bassett y col., 2004). En este sentido, Cheng y col. (2012) encontraron que los elementos Ad5 y SF-1 ubicados en el promotor proximal juegan un rol importante en la expresión basal de CYP11B2. Como muestra la figura 17, similares sitios de unión a factores de transcripción, como SF-1, CRE y Ad5, se encontraron en el gen *Cyp11b2* en roedores (Cheng y col., 2012).

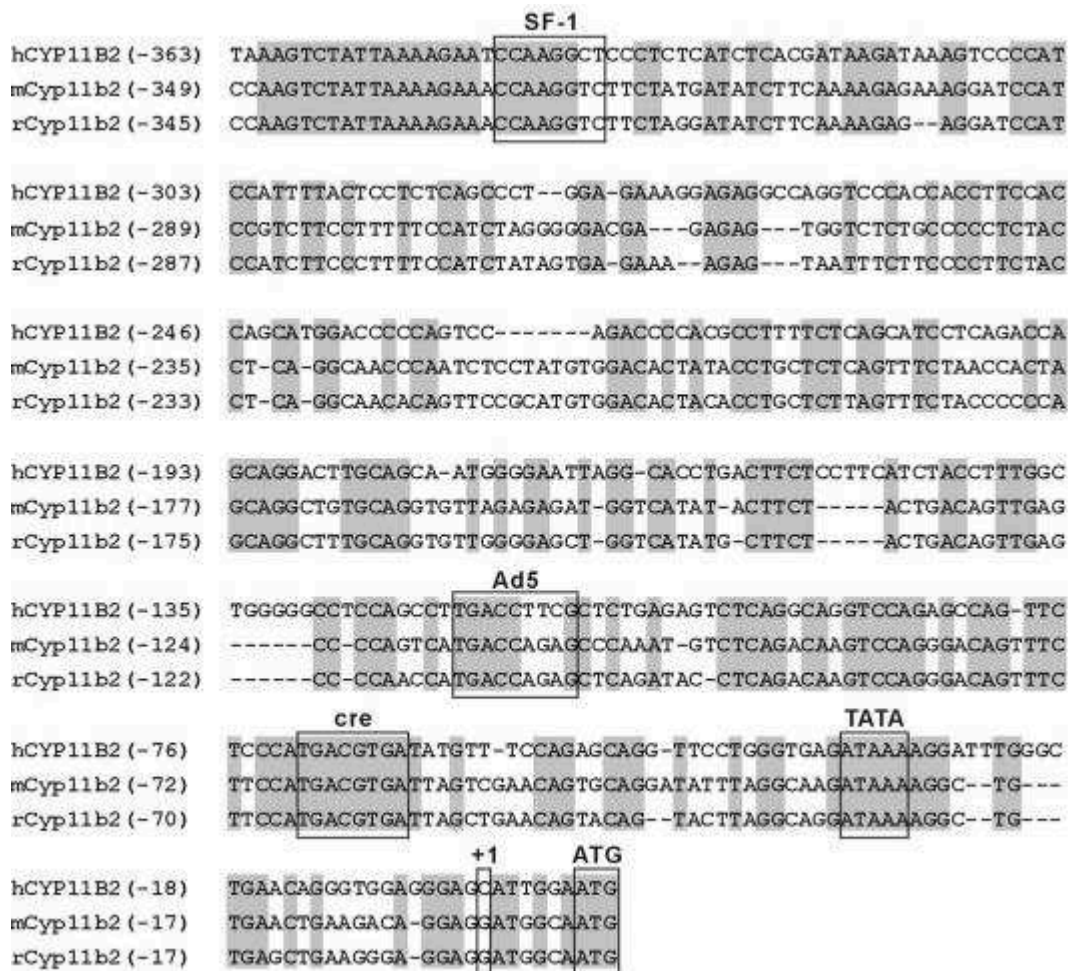


Figura 17 Comparación de la secuencia correspondiente al promotor del gen CYP11B2 en humanos (hCYP11B2) y roedores (mCYP11B2 – ratones – y rCYP11B2 – ratas). Los nucleótidos están enumerados considerando como +1 el sitio de inicio de la transcripción. Los residuos conservados entre especies se indican en gris. Se muestran el codón de inicio ATG, el sitio de inicio de la transcripción (+1), la caja TATA y los sitios de unión: elemento de respuesta a cAMP (CRE), Ad5 y factor esteroideogénico 1 (SF-1). Tomado y adaptado de Cheng y col. (2012).

1.5. Mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional

La regulación de la expresión génica por mecanismos epigenéticos actualmente ocupa un punto muy importante dentro de la investigación científica, en la búsqueda de comprender los mecanismos de control génico neuronal. De hecho, se ha determinado que los diversos factores que modulan la formación de memorias, tales como el estrés, el abuso de drogas, la depresión y modificaciones en el medio ambiente, influyen en el cerebro y la función cognitiva a través de mecanismos epigenéticos (Hunter y col., 2009; Maze y Nestler, 2011). En base a estos antecedentes, se sugiere que las alteraciones epigenéticas son críticas tanto para la formación de memoria como para la modulación de los estímulos del medio ambiente y la acción de las hormonas. Una modificación epigenética de la cromatina involucra cambio de bases y proteínas asociadas en ausencia de cambios en la secuencia de ADN (Zhang y Ho, 2011). Algunas de las modificaciones epigenéticas conocidas y muy estudiadas son la acetilación y metilación de las histonas y la metilación del ADN, siendo la última uno de los mecanismos más estudiados relacionado con el silenciamiento de los genes.

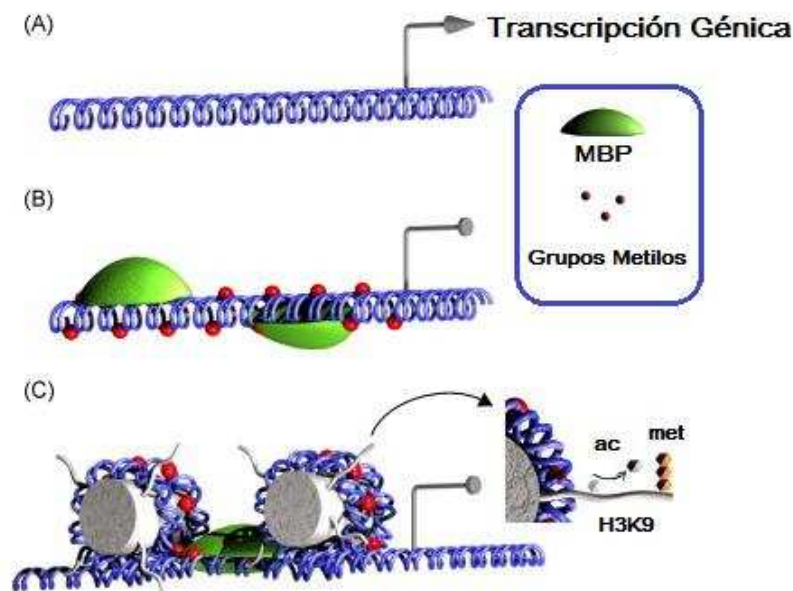


Figura 18 Regulación de la expresión génica mediante mecanismos de metilación de ADN. (A) El ADN sin metilar permite la unión de los factores de transcripción y es transcripcionalmente activo. (B) Los grupos metilos son adicionados a los sitios CpGs de la región promotora por DNA metiltransferasas y son reconocidos por las proteínas de unión a regiones metil-CpG (MBPs). (C) MBPs se acoplan a los complejos de remodelación de la cromatina que conducen a una configuración cerrada del promotor a través de las modificaciones de las histonas como la desacetilación y la trimetilación de la histona H3K9. Extraído y adaptado de Martínez-Arguelles y Papadopoulos (2010).

1.5.1. Mecanismos de metilación diferencial del ADN

La metilación es una modificación química mediada por enzimas que adicionan grupos metilos (-CH₃) en sitios específicos de proteínas, ADN y ARN. La modificación del ADN afecta únicamente a la base citosina (C) cuando esta seguida de una guanosina (G), de manera que la metilación ocurre en sitios CpG (donde “p” se refiere al enlace fosfodiéster que une a C y G) (Tajima y Suetake, 1998). La frecuencia de secuencias CG repetitivas a lo largo del genoma es muy baja, excepto en regiones específicas (por lo general de un tamaño que oscila entre 200 a 3000 pb) donde la periodicidad de CpG es mayor a la esperada. Estas regiones se denominan islas CpG y están presentes en aproximadamente el 40% de los promotores de los genes conocidos de mamíferos (Antequera y Bird, 1993). La mayor o menor metilación de los sitios CpG ubicados en regiones promotoras de un gen está asociado con el nivel de transcripción del gen. Por ejemplo, si los genes presentan altos niveles de transcripción, los sitios CpG en las islas CpG están demetilados (Clark y Melki, 2002). Esta observación conlleva a la hipótesis de que la metilación de los sitios CpG en los promotores de los genes puede inhibir la expresión de un gen (silenciarlo). El mecanismo de silenciamiento de genes por metilación se encuentra todavía en discusión, pero se postula que esta modificación provoca una remodelación física de la cromatina, impidiendo el ingreso de diversos factores de transcripción al área afectada. La enzima DNA metiltransferasa adiciona los grupos metilos a sitios CpGs de la región promotora y estos grupos son reconocidos por las proteínas de unión a regiones metil-CpG. Estas últimas se acoplan a los complejos de remodelación de la cromatina que conducen a una configuración cerrada del promotor a través de las modificaciones de las histonas; evitando así que se unan los factores de transcripción requeridos para la activación de la misma (Fig. 18) (Martinez-Arguelles y Papadopoulos, 2010).

Los cambios en el estado de metilación de genes implicados en la síntesis de esteroides han sido poco abordados. A modo de ejemplo, el control de expresión de las enzimas P450_{scc} y 3β-HSD en los folículos ováricos de bovino esta mediado por mecanismos de metilación diferencial (Vanselow y col., 2010; Zhang y Ho, 2011). Sumado a ello, cambios en la metilación del ADN de P450(17α) se observaron durante la senescencia celular en células adrenocorticales de bovinos (Missaghian y col., 2009). Otro estudio demostró que el promotor 2 de la enzima P450_{arom} estaría siendo regulado por mecanismos de metilación del ADN en células de la granulosa y células luteínicas en bovinos (Vanselow y col., 2005). De esta manera, la búsqueda de mecanismos de metilación diferencial que generen la

activación/inhibición de las enzimas esteroideogénicas, resulta un foco de estudio sumamente interesante. Sin embargo, poco se conoce sobre las regiones promotoras de estas moléculas en el cerebro, los factores de transcripción implicados o los posibles sitios sensibles a metilación.

1.6. Envejecimiento y esteroides

1.6.1. Las consecuencias del envejecimiento sobre las funciones neuronales

El envejecimiento es un proceso fisiológico que abarca distintas áreas del cerebro y tiene consecuencias importantes sobre los procesos de memoria y aprendizaje (Bishop y col., 2010). Particularmente en el hipocampo, se han descrito cambios en mecanismos celulares, moleculares y neuronales que afectan directamente la plasticidad. Numerosos estudios han reportado modificaciones en la proliferación celular y neurogénesis (Klempin y Kempermann, 2007; Kuhn y col., 1996), en la formación de dendritas (Markham y Juraska, 2002), en la conectividad sináptica (Nicholson y col., 2004), en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} (Toescu y col., 2004) y en los sistemas de neurotransmisores (Segovia y col., 2001). Sumado a ello, se han reportado cambios en la expresión génica de factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, del inglés **B**rain-**D**erived **N**eurotrophic **F**actor), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés **I**nsulin-like **G**rowth **F**actor-1) (Hattiangady et al., 2005; Shetty et al., 2005).

El aumento progresivo de la edad se encuentra también acompañado por modificaciones en distintas funciones cognitivas como la navegación espacial, la memoria de trabajo, el reconocimiento de objetos y la memoria episódica en distintas especies, como humanos y roedores (Barnes, 1988; Pause y col., 2013; Wallace y col., 2007). Particularmente, las alteraciones en la memoria episódica resultan extremadamente sensibles al envejecimiento normal del cerebro y a enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, tales como la EA, la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia (Dere y col., 2010; Mattson y Magnus, 2006; Pause y col., 2013). De hecho, los déficits en la memoria episódica son usualmente los primeros síntomas observados en pacientes con neuropatologías como la EA y la

enfermedad del Parkinson (Pause y col., 2013). Esto convierte a la memoria episódica en un indicador clave de las patologías cerebrales incipientes que se manifiesta mucho antes que los deterioros cognitivos globales a nivel psicológico y conductual.

1.6.2. Genes neurotróficos y sinápticos como marcadores de disfunciones/funciones cerebrales

Como mencionamos en la sección anterior, el aumento progresivo de la edad genera importantes cambios en la expresión génica. Específicamente, genera un perfil característico que es indicativo de una respuesta inflamatoria, del estrés oxidativo y de la reducción del soporte neurotrófico, entre otras cosas, en distintas regiones cerebrales (Lee y col., 2000). Entre estos genes encontramos el BDNF, VEGF, Syp y espinofilina, los cuales son de gran interés debido a su implicancia en distintas funciones neuronales (Calhoun y col., 2008; Hattiangady y col., 2005; Shetty y col., 2005).

EL BDNF y el VEGF son utilizados como marcadores neurotróficos. El BDNF es una neurotrofina que resulta crítica para el normal desarrollo del sistema nervioso central y también regula distintas funciones como la transmisión sináptica, las estructuras dendríticas y la plasticidad (Binder y Scharfman, 2004), lo cual lo convierte en un importante marcador a nivel cognitivo (Komulainen y col., 2008). De hecho, los niveles de ARNm de BDNF se encontraron reducidos en neuronas hipocámpales de pacientes con la EA; contrariamente, un aumento en los niveles de expresión ha sido asociado con una mejor performance en el laberinto de agua de Morris (Croll y col., 1998), sugiriendo un rol clave del BDNF en las funciones de memoria y aprendizaje asociadas al hipocampo. El VEGF también ha sido implicado en múltiples funciones asociadas con el sistema nervioso central, ya sea actuando a nivel sistémico o directamente a nivel local. Se lo ha relacionado con funciones axonales, la neurogénesis y la migración y la supervivencia neuronal (Mackenzie y Ruhrberg, 2012). Los efectos neuroprotectivos del VEGF también han sido descritos. En un modelo experimental de diabetes, el VEGF atenuó la pérdida de las espinas dendríticas y de las funciones espaciales (Taylor y col., 2015). Empleando un modelo transgénico de la EA en ratón, Religa y col. (2013) mostraron que el aumento en la expresión neuronal de VEGF atenúa las disfunciones cognitivas características de dicha enfermedad.

La Syp y la espinofilina se emplean como marcadores sinápticos. La Syp es una proteína que se encuentra en la vesícula sináptica y está implicada en numerosas funciones

sinápticas como la exocitosis, la formación de sinapsis, la biogénesis y la endocitosis (Kwon y Chapman, 2011). La pérdida de dicha proteína en el hipocampo ha sido relacionada con el deterioro cognitivo asociado a la EA (Sze y col., 1997), sugiriendo un rol crítico de la misma en las funciones asociadas a los procesos de memoria y aprendizaje. La espinofilina, por su parte, es una proteína que se encuentra altamente expresada en las espinas dendríticas y modula las transmisiones sinápticas glutamatérgicas y la morfología dendrítica. Las espinas dendríticas son protusiones especializadas que reciben la mayoría de los inputs excitatorios en el sistema nervioso central; los cambios de expresión durante el aumento progresivo de la edad, las alteraciones en su número, tamaño y forma han sido asociados con los procesos de aprendizaje, la electrofisiología, el desarrollo y los cambios hormonales (Feng y col., 2000).

1.6.3. Niveles hormonales durante el envejecimiento y deterioro cognitivo

Durante años, los cambios observados en las funciones neuronales asociados al aumento progresivo de la edad, fueron relacionados con una disminución en los niveles de ciertas hormonas (Schumacher y col., 2003). Estas modificaciones hormonales se observan particularmente en las mujeres durante la menopausia, proceso asociado al envejecimiento que resulta en el cese de la menstruación, reducciones profundas en los niveles de hormonas ováricas e insuficiencia ovárica irreversible (Bellantoni y col., 1996). Numerosos informes han vinculado la menopausia con la pérdida de memoria (Sherwin, 2006; Sherwin y Henry, 2008). Sumado a ello, las mujeres también tienen un mayor riesgo de desarrollar la EA en relación con los hombres (Launer y col., 1999; Yaffe y col., 1998; Zandi y col., 2002), lo que sugiere que la deficiencia de los estrógenos y/o progesterona durante la mediana edad puede ser un factor crítico en el desarrollo de la demencia.

Debido a que el hipocampo depende de factores tróficos hormonales tales como los estrógenos y progestágenos durante la edad adulta (Brinton, 2001), la deficiencia de los mismos durante la menopausia puede hacer que estas neuronas sean más vulnerables al deterioro cognitivo y exacerbar déficits de memoria emergentes relacionados con la edad. Los estudios en roedores apoyan esta hipótesis. Con respecto al envejecimiento reproductivo, hay varias diferencias clave entre roedores y humanos. Por ejemplo, a diferencia de las mujeres, donde la menopausia conduce a una pérdida total de folículos primordiales (Richardson y col., 1987), las ratas no experimentan pérdida completa de

folículos (Lu y col., 1979). Además, mientras que los efectos de retroalimentación negativa de E2 sobre las gonadotropinas están disminuidos en mujeres menopáusicas, lo que conduce a niveles elevados de gonadotropina (Crowley y col., 1985; Yen, 1999), tal retroalimentación permanece intacta en ratas pseudopreñadas acíclicas adultas mayores, lo que conduce a niveles de gonadotropina relativamente normales (Lu, 1983; Wise y col., 2000). Sin embargo, la senescencia reproductiva en roedores (estropausia) es similar a la menopausia en varios aspectos críticos, incluyendo alteraciones similares en la liberación pulsátil de hormona luteinizante (LH) y en el pico de LH, la variabilidad de la duración del ciclo antes de la aciclicidad, y el cese definitivo de la ciclicidad hormonal (LeFevre y McClintock, 1988; Nelson y col., 1995). Además, el inicio del declive reproductivo tanto en roedores de mediana edad como en seres humanos se caracteriza por el aumento de los niveles circulantes de la hormona folículoestimulante y E2 (Lu, 1983). Seguidamente, los niveles circulantes de E2 disminuyen en mujeres y ratones (Conn, 2006; Nelson y col., 1995), aunque tienden a permanecer elevados en ratas de mediana edad durante bastante tiempo (Morrison y col., 2006). En promedio, las alteraciones en el ciclo estral en ratas comienzan a los 9 meses de edad; a los 12 meses aproximadamente, dichos roedores entran en un estado de estro permanente (niveles elevados de E2), y finalmente, a los 19 meses, en un diestro permanente (los niveles de E2 permanecen disminuidos) (Lu y col., 1979). A pesar de las diferencias entre especies arriba mencionadas, las consideraciones prácticas, incluyendo su pequeño tamaño y corta vida, hacen de los roedores un importante modelo con el cual evaluar los efectos del envejecimiento sobre la pérdida de memoria y otras funciones de neuroplasticidad asociadas al hipocampo (Frick, 2009).

1.6.4. Proteínas neuroesteroideas y neuroprotección

Al igual que las hormonas gonadales, los niveles de neuroesteroides disminuyen durante el desarrollo postnatal (Charalampopoulos y col., 2006; Charalampopoulos y col., 2008) y durante la presencia de neuropatologías como la EA (Luchetti y col., 2011a), la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (Luchetti y col., 2011b). En el mismo sentido, se ha demostrado que la expresión de ciertas moléculas implicadas en la síntesis de los esteroides se ve modificada en distintas regiones del cerebro, como el hipocampo, durante dicho procesos (Higo y col., 2009; Kimoto y col., 2010; Luchetti y col., 2011a; Luchetti y col., 2011b)

La localización de StAR en áreas neuromitóticas apoya la idea de que la producción local de esteroides podría estar regulando la neurogénesis, proceso asociado a la formación de la memoria y a la recuperación neuronal tras una injuria cerebral. En ese sentido, ratas tratadas con ácido kaínico, una potente neurotoxina que produce muerte excitotóxica (Sperk, 1994), mostraron un rápido aumento en los niveles de ARNm y de proteína de StAR en neuronas hipocampales que fueron resistentes a la excitotoxicidad inducida por dicho ácido (Sierra y col., 2003). Otros autores sugieren que el ARNm de StAR también se encuentra sobreexpresado en oligodendrogliomas y tumores gliales malignos sugiriendo un posible rol de StAR en la tumorigénesis de gliomas humanos (Do Rego y col., 2009).

Un aumento en la expresión de ARNm de P450scc, StAR y P450arom fue descrito tras un daño en las neuronas aferentes cerebelares en rata (Lavaque y col., 2006). Las lesiones cerebrales por kainato también afectaron la expresión de la P450scc en el hipocampo de la rata (Chia y col., 2008). Por su parte, Biagini y col. (2009) demostraron que la expresión de P450scc es inducida por un modelo de epilepsia generado por pilocarpina en una población glial del hipocampo de rata. Dicha inducción está asociada con el retraso en la aparición de las convulsiones espontáneas. Contrariamente, la inhibición de la síntesis de neuroesteroides acelera la aparición de convulsiones, pero sólo en animales que presentan aumentos significativos en P450scc.

Birnie y col. (2013) encontraron un aumento en la expresión de la enzima P450(17 α) en el hipocampo de rata 24 horas post-injuria traumática, aunque todavía se desconoce si este cambio podría estar regulando la recuperación neuronal. Utilizando inmunohistoquímica, Mellon y col. (2008) reportaron una disminución en la expresión de P450scc, 3 β -HSD, 5 α -reductasa y 3 α -HSD en cerebros adultos de ratones con la enfermedad de Niemann Pick tipo C. La caída en la expresión de la enzima 5 α -reductasa-1 también fue descrita en regiones particulares del cerebro de pacientes con la enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple (Luchetti y col., 2011b). En el último caso, incluso, esta caída en la expresión génica resultó acompañada por una disminución en los niveles de alopregnanolona (Luchetti y col., 2011b). Por otra parte, cambios en la expresión de la enzima P450arom fueron reportados en el hipotálamo y en corteza prefrontal de pacientes con la EA (Ishunina y col., 2005; Luchetti y col., 2011b).

Estos y otros hallazgos, sugieren que las enzimas y proteínas neuroesteroidogénicas, posiblemente a través de cambios en la síntesis de neuroesteroides, estarían regulando

funciones neuronales y gliales claves durante el envejecimiento y otros procesos neuropatológicos.

1.7. Los estímulos ambientales como activadores de las funciones neuronales durante la vejez

Durante años se ha demostrado que la estimulación cognitiva (por ejemplo, la lectura extensiva, los viajes y la educación continua) y el ejercicio físico (por ejemplo, caminar, jardinería, baile, tenis) pueden proporcionar beneficios significativos para la salud humana en general y la función cognitiva, siendo además, tratamientos simples de aplicar a cualquier edad. A modo de ejemplo, las ocupaciones cognitivamente estimulantes (como la enseñanza) pueden prevenir la disminución de la memoria verbal y de trabajo, en comparación a la población general de adultos mayores (Shimamura y col., 1995), y los mayores niveles de educación están fuertemente asociados con un riesgo reducido de padecer deterioro cognitivo asociado a la edad, la demencia y la EA (Launer y col., 1999).

Los datos más recientes muestran que las actividades de ocio cognitivamente estimulantes para el adulto mayor (por ejemplo, lectura, crucigramas, grupos de discusión, eventos culturales) pueden reducir el riesgo de demencia (Verghese y col., 2003) y retrasar la aparición de la pérdida de memoria en personas ancianas sanas que posteriormente desarrollan demencia (Hall y col., 2009). El ejercicio físico (por ejemplo, caminar, subir escaleras, actividades recreativas) también se ha asociado con una reducción de la disminución cognitiva global (Middleton y col., 2008). En hombres y mujeres de edad avanzada, se ha visto un efecto positivo incluso cuando este tratamiento se inicia muy tarde en la vida. Aunque estos datos son convincentes, se han realizado relativamente pocos estudios en seres humanos como para comprender los mecanismos celulares y moleculares en el cerebro que subyacen a los beneficios cognitivos de la estimulación enriquecedora. Dada la similitud del deterioro cognitivo neurobiológico relacionados con la edad en roedores como en humanos, los modelos animales pueden ser extremadamente útiles. Con ellos se pueden diseñar estudios para entender el potencial de la estimulación cognitiva y física sobre la prevención y/o reducción de la declinación cognitiva relacionada con la edad (Frick y Benoit, 2010).

1.7.1. La exposición a ambientes enriquecidos

Para estudiar el efecto de los estímulos ambientales en animales de laboratorio se utilizan los denominados ambientes enriquecidos. El ambiente enriquecido puede definirse como “una combinación compleja de estímulos inanimados y sociales” (Rosenzweig y col., 1978). Un modelo estándar de ambiente enriquecido para roedores se indica en la Fig. 19. Esta clase de ambiente implica generalmente jaulas especialmente diseñadas para alojar a un gran número de animales y lograr así la estimulación social. La estimulación sensorial incluye objetos, túneles y juguetes de diferentes formas, tamaños, texturas y colores, que pueden ser modificados diariamente para mantener la novedad y la curiosidad. Las ruedas giratorias son utilizadas para favorecer la actividad física voluntaria y lograr la estimulación motora.

En roedores, estas condiciones experimentales incrementan la plasticidad neuronal a través de cambios en la morfología del cerebro que incluyen la neurogénesis, los contactos sinápticos y la arborización de las dendritas (Beauquis y col., 2010; Mora y col., 2007; Sale y col., 2009). También han sido descritos cambios en la expresión de ciertos genes neurotróficos y sinápticos, como el BDNF, el NGF y la Syp (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Sumado a ello, el ambiente enriquecido ha mostrado mejorar las funciones de memoria y aprendizaje en modelos animales adultos y con desórdenes del sistema nervioso central como la EA, la enfermedad de Parkinson e injurias cerebrales (Frick y Fernandez, 2003; Laviola y col., 2008; Nithianantharajah y Hannan, 2006; van Praag y col., 2000).

A la fecha, pocos son los antecedentes que relacionan las condiciones ambientales y la esteroidogénesis en el cerebro. Concretamente se determinó que el aislamiento social disminuyó la expresión génica de la enzima 5α -reductasa-1 en el hipocampo de ratón (Agis-Balboa y col., 2007) y aumentó los niveles de ARNm de la P450arom y la síntesis de E2 en el hipocampo de rata (Munetsuna y col., 2009a). Por otro lado, el ambiente enriquecido aumentó la expresión de la 5α -reductasa-1 y 3α -HSD en el hipocampo de ratas macho jóvenes adultas (Munetsuna y col., 2011). En el mismo sentido, nuestro grupo de investigación encontró que la exposición prolongada a un ambiente enriquecido (9 meses) incrementa la expresión proteica de uno de los receptores vinculados a la acción de los estrógenos, el receptor de estrógenos α (RE α), en el hipocampo de roedores (Moreno-Piovano, 2013). Así, las condiciones ambientales parecerían afectar tanto la síntesis como la acción de los esteroides a nivel de cerebro.

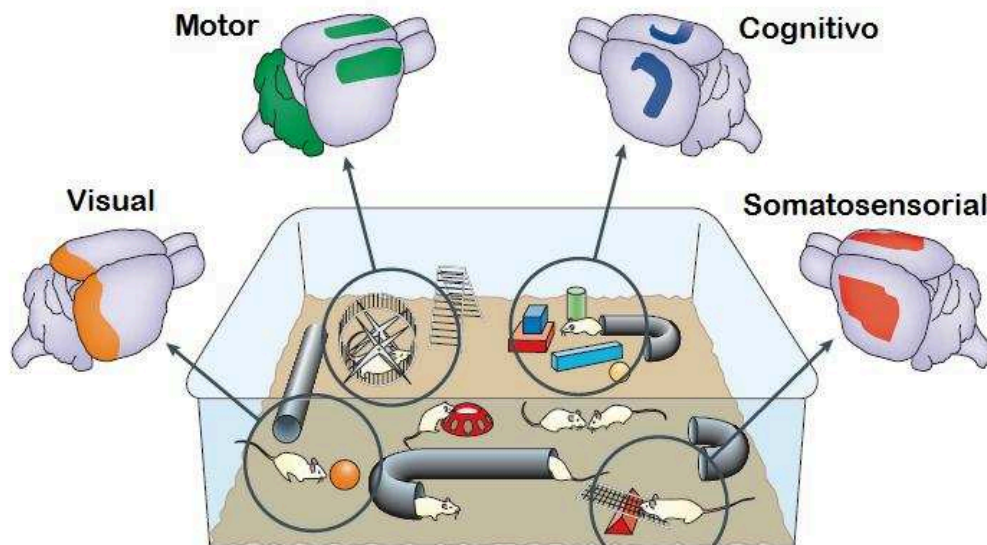


Figura 19 Modelo de un ambiente enriquecido estándar para roedores. Se indican los efectos de la estimulación visual (naranja), motora (verde), cognitiva (azul) y somatosensorial (roja) sobre las distintas áreas del cerebro. Adaptado de Nithianantharajah y Hannan (2006).

1.7.2. La experiencia materna como un modelo natural de neuroprotección

La experiencia reproductiva (preñez, lactancia y cuidado materno) también podría ser considerada como un modelo natural de “ambiente enriquecido” teniendo en cuenta los estímulos cognitivos, sensoriales y motores a los cuales están expuestas las madres. La reproducción conlleva a una serie de cambios a nivel fisiológico que implican modificaciones en las funciones celulares, moleculares y neuronales. Numerosos autores han demostrado que la experiencia materna contribuye a un mejoramiento de la memoria, del aprendizaje y de las funciones de neuroplasticidad asociadas al hipocampo (Franssen y col., 2012; Gatewood y col., 2005; Kinsley y col., 2006). Se ha demostrado que las ratas multíparas tienen mejor performance en los test de memoria espacial (Morris Water Maze) y no espacial (Object Recognition) que ratas nulíparas y muestran una atenuación del deterioro cognitivo asociado a la edad. De hecho, el aumento de la plasticidad neuronal observada se correlaciona con la capacidad adaptativa que debe tener la madre en relación al cuidado materno (protección, alimentación) (Kinsley y Lambert, 2008). Sumado a ello, las ratas multíparas exhiben menores niveles de la proteína precursora amiloide en el hipocampo, que es utilizada como un marcador de neurodegeneración, y mayores niveles de expresión del BDNF, que actúa como un factor de crecimiento nervioso (Gatewood y col., 2005; Macbeth y col., 2008). También han sido descriptos cambios asociados al

volumen celular en el área media preóptica, a la neurogénesis y a la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo (Vanoye-Carlo y col., 2008). Es importante resaltar, que algunos de estos efectos se han visto aún cuando ha transcurrido un largo período de tiempo desde el último evento reproductivo.

La importancia de los neuroesteroides, particularmente de la alopregnanolona, durante la reproducción también ha sido descrita por algunos autores (Brunton y col., 2014; Frye, 2009; Frye y col., 2011); sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares implicados. Hasta el momento no hay antecedentes sobre el efecto a largo plazo de la experiencia materna sobre la esteroidogénesis hipocámpica.

1.8. Hipótesis de Trabajo

Nuestra hipótesis propone que el envejecimiento, el ambiente enriquecido mediante la estimulación sensorial/motora y la experiencia materna producen cambios en la expresión de las enzimas esteroidogénicas en el hipocampo a través de mecanismos epigenéticos. En particular pensamos que el aumento progresivo de la edad produce una disminución de la expresión de dichas enzimas y esto podría estar asociado a cambios en los niveles de metilación de regiones ricas en dinucleótidos CpG correspondiente a sitios regulatorios de la transcripción. Esto redundaría en cambios significativos en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo, trayendo consecuencias negativas en las capacidades mnemónicas del individuo (memoria episódica) durante su adultez mayor. Por el contrario pensamos que la experiencia reproductiva y la estimulación sensorial y motora pueden atenuar la caída en la expresión de las enzimas esteroidogénicas en el hipocampo y esto estaría relacionado con una disminución en los patrones de metilación de los promotores/genes implicados. Sumado a ello, creemos que estos cambios podrían, a su vez, promover la expresión de marcadores neurotróficos y sinápticos claves asociados a las funciones neuronales.

2. OBJETIVOS

“El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta”

Charles Dickens.-

2.1. Objetivo General

Conocer, mediante el uso de modelos in vivo, la influencia de variables fisiológicas sobre la expresión de enzimas clave en la esteroidogénesis hipocámpica. Concretamente, estudiar el efecto de la edad, la experiencia reproductiva y el ambiente enriquecido sobre la expresión de los genes que codifican las proteínas/enzimas StAR, P450_{scc}, 3 β -HSD, P450_{arom}, P450(17 α), 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, P450(11 β)-2 y 17 α -HSD-3 en el hipocampo de la rata.

2.2. Objetivos Particulares

- ✓ Sobre ratas de diferente edad de ambos sexos, determinar en forma cuantitativa la expresión de los ARNm de las enzimas esteroidogénicas en el hipocampo. Posteriormente, analizar el estado de metilación de secuencias CpG en regiones regulatorias de los genes cuya expresión se haya visto modificada. Además, evaluar si las posibles diferencias de expresión de las enzimas esteroidogénicas se correlacionan con la performance mnemónica del individuo mediante el empleo del test de memoria episódica (Experimento 1).

- ✓ Evaluar si la estimulación sensorial (ambiente enriquecido) y la actividad motora voluntaria modifican a corto y largo plazo la expresión de enzimas esteroidogénicas y el estado de metilación de los promotores en el hipocampo de ratas hembra. Sumado a ello, estudiar el efecto de los ambientes enriquecidos sobre la expresión de los factores neurotróficos VEGF-A y BDNF y las proteínas sinápticas Syp y espinofilina (Experimento 2).

- ✓ Determinar si la experiencia reproductiva en ratas hembra (preñez con y sin lactancia) modifica la expresión génica a largo plazo de las enzimas esteroidogénicas, el factor neurotrófico BDNF y las proteínas sinápticas Syp y espinofilina. Además, estudiar si las posibles diferencias de expresión de las enzimas esteroidogénicas se correlacionan con cambios en el estado de metilación de sus regiones regulatorias (Experimento 3).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”

Albert Einstein.-

3.1. Animales y modelos experimentales

Utilizamos ratas (*Rattus norvegicus*) hembra y macho de la cepa Wistar pertenecientes al bioterio del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). De acuerdo a la capacidad de producción y cría del bioterio, se trabajó con un número de 15-20 animales para cada grupo experimental. Los animales fueron mantenidos durante todo el experimento en un ambiente de luz y temperatura controladas (período de luz desde las 06.00 h hasta las 20.00 h y temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con acceso libre a comida y bebida (alimento balanceado en forma de pellets provenientes de Alimentos Cooperación, Rafaela, Santa Fe). Los animales fueron asignados al azar a los diferentes grupos experimentales. Todos los animales utilizados fueron manipulados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio editada por la Academia Nacional de Ciencias (USA). Los experimentos llevados a cabo durante la ejecución de esta tesis fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), UNL.

3.1.1. Experimento 1

Para evaluar el efecto de la edad, los animales fueron distribuidos de la siguiente manera:

Grupo HJ: Ratas hembra (H) vírgenes jóvenes adultas (J) mantenidas en ambiente estándar hasta DPN 90.

Grupo MJ: Ratas macho (M) jóvenes adultas mantenidas en ambiente estándar hasta DPN 90.

Grupo HA: Ratas hembra vírgenes adultas mayores (A) mantenidas en ambiente estándar hasta DPN 450.

Grupo MA: Ratas macho adultas mayores mantenidas en ambiente estándar hasta DPN 450.

3.1.2. Experimento 2

Para estudiar el efecto breve del ambiente enriquecido se compararon los siguientes grupos:

Grupo HJ.S: ratas hembra vírgenes colocadas en jaulas con ambiente enriquecido con estimulación sensorial (S) y social durante 10 días y sacrificadas en DPN 90.

Grupo HJ.M: ratas hembra vírgenes colocadas en jaulas con ambiente enriquecido con estimulación motora (M) y social durante 10 días y sacrificadas en DPN 90.

Grupo HJ: ratas hembra vírgenes mantenidas en ambientes estándar y sacrificadas en DPN 90.

Grupo HA.S: ratas hembra vírgenes colocadas en jaulas con ambiente enriquecido con estimulación sensorial y social durante 10 días y sacrificadas en DPN 450.

Grupo HA.M: ratas hembra vírgenes colocadas en jaulas con ambiente enriquecido con estimulación motora y social durante 10 días y sacrificadas en DPN 450.

Grupo HA: ratas hembra vírgenes mantenidas en ambiente estándar y sacrificadas en DPN 450.

Para evaluar el efecto prolongado del ambiente enriquecido se compararon los siguientes grupos:

Grupo HA.S.Ep: ratas hembra vírgenes colocadas en jaulas con ambiente enriquecido con estimulación sensorial (S) y social durante 105 días (exposición prolongada - Ep) y sacrificadas en DPN 450.

Grupo HA: ratas hembra vírgenes mantenidas en ambiente estándar y sacrificadas en DPN 450.

3.1.3. Experimento 3

Para determinar el efecto de la experiencia materna en ratas adultas mayores, los animales fueron distribuidos de la siguiente manera:

Grupo HA.M+L: ratas hembra multíparas (M) sometidas a tres preñeces sucesivas con sus respectivas lactancias (+L) y sacrificadas en DPN 450.

Grupo HA.M-L: ratas hembra multíparas sometidas a tres preñeces sucesivas sin sus respectivas lactancias (-L) y sacrificadas en DPN 450.

Grupo HA: ratas hembra vírgenes mantenidas en ambientes estándar y sacrificadas en DPN 450.

3.2. Exposición a ambiente enriquecido o estándar

Las ratas hembra y macho mantenidas en condiciones estándares fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable sin exposición a condiciones de enriquecimiento (n = 3/jaula, Fig. 20).

Las ratas hembra mantenidas en ambientes enriquecidos fueron alojadas en jaulas de mayor tamaño especialmente diseñadas (80 cm de largo x 32 cm de alto x 51 cm ancho). El acceso al agua fue proporcionado por dos botellas de agua montada en un lado externo de la jaula, lo que permitió que el pico de acceso se encuentre a 7 cm por encima de la base de la jaula. La comida se colocó en un comedero enrejado de acero ubicado dentro de la jaula. La estimulación sensorial se logró mediante el agregado de objetos, juguetes y túneles de diferentes formas, tamaños, colores y texturas (Fig. 20). Para la estimulación motora se agregaron dos ruedas para correr por jaula, las cuales se limpiaban diariamente. Las jaulas contenían distintos objetos con nuevas configuraciones cada día y cuidamos de no incluir el mismo juguete más de una vez por semana. Para asegurar la estimulación social se colocaron 8 animales por jaula y dos veces a la semana 3 animales de la misma jaula eran intercambiados por otros animales que estaban mantenidos en las mismas condiciones de enriquecimiento en una segunda jaula. Las jaulas estándares y enriquecidas se mantuvieron en la misma sala de bioterio. Los animales recibieron estimulación sensorial y motora desde las 18:00 h hasta las 9:00 h todos los días de la semana. Tal como se menciona en la descripción de los grupos experimentales, la duración del enriquecimiento sensorial y motor fue de 10 días en los grupos HJ.S y HA.S y HJ.M y HA.M, respectivamente, y de 105 días en el grupo HA.S.Ep.

Ambiente Estándar



Estimulación Motora



Estimulación Sensorial



Figura 20 Ambientes estándar, con estimulación motora y con estimulación sensorial.

3.3. Enriquecimiento materno: preñez y lactancia.

Las ratas hembra multíparas fueron mantenidas en condiciones estándares y fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable ($n = 3/\text{jaula}$) hasta DPN 90. Desde DPN 90 a DPN 320 fueron sometidas a tres preñeces sucesivas con y sin sus respectivas lactancias. Para la obtención de ratas preñadas, se alojó a la hembra en la jaula con un macho de fertilidad comprobada y se observó su comportamiento. Si la hembra presentaba conducta receptiva, evidenciada por el reflejo de lordosis e indicando el proestro, se la dejaba toda la noche con el macho. A la mañana siguiente se realizaban extendidos vaginales a fin de confirmar la preñez del animal, mediante la observación de la presencia de espermatozoides en los mismos. Ese día se consideró como el día de gestación (DG) 1. Las ratas así preñadas fueron mantenidas en sus jaulas originales ($n=3/\text{jaula}$) hasta DG 19, momento en el cual se colocaron en jaulas maternas individuales. Se corroboró que el número de crías nacidas sea de entre 10 y 12 animales para asegurar una preñez exitosa. Luego del parto, las crías fueron mantenidas con sus madres durante 23 días y fueron separadas (HA.M+L). Para evitar la lactancia, en otro grupo, las crías fueron removidas de las jaulas maternas en DPN 0 (HA.M-L).

3.4. Test de memoria episódica

La memoria episódica se refiere al recuerdo consciente de una experiencia pasada en términos de lo "qué pasó", "donde" y "cuando" (Tulving, 2002). Actualmente, los paradigmas que permiten evaluarla en modelos animales han sido descriptos combinando la preferencia por los objetos novedosos (Qué), la memoria de localización de los objetos (Dónde) y el orden temporal en el cual los objetos fueron presentados (Cuándo) (Dere y col., 2005; Kart-Teke y col., 2006).

3.4.1. Campo abierto

Se utilizó un campo abierto (Open field) negro de acero inoxidable de 80 cm de ancho x 80 cm de largo x 60 cm de alto. Dicho campo abierto contenía pistas proximales incluidas en una de sus caras y permitía a los animales observar las pistas externas colocadas en las paredes de la habitación. Una cámara de video conectada a una computadora fue colocada a 100 cm por encima de la base del campo abierto para monitorear y grabar las pruebas

realizadas. Después de cada prueba, se limpiaba con alcohol 70° y se secaba; de esta manera, se eliminaba el olor de los animales previamente testeados.

3.4.2. Objetos A y B

Se seleccionaron dos clases de objetos novedosos de vidrio diferentes en color, peso, forma y superficie (en cuádruplicado). Dado que los objetos eran del mismo material, los animales no podían distinguirlos mediante pistas olfatorias. Asimismo, el peso y la forma de los objetos impedían que los animales los desplacen o se suban sobre ellos. Después de cada prueba, los objetos eran limpiados con alcohol 70°. Se realizaron pruebas pilotos para verificar que el animal no tenga preferencia por ninguno de los dos objetos.

3.4.3. Procedimiento

Ratas macho y hembra pertenecientes a los grupos experimentales HJ, MJ, HA y MA fueron evaluadas por única vez en el test de memoria episódica, mediante un protocolo adaptado de Kart-Teke y col. (2006), una semana antes de su sacrificio. Los animales fueron familiarizados con el operador, el ambiente y el campo abierto por 3 días consecutivos. Para ello, las ratas fueron colocadas en la parte central del campo abierto y se les permitió explorarlo durante 10 minutos (min). Luego de la habituación, cada rata fue sometida a 2 pruebas (P1 y P2) y al test propiamente dicho (T) (Fig. 21). Durante P1, la rata fue colocada en el centro del dispositivo, el cual contenía 4 copias idénticas de un objeto novedoso (A) distribuidas en posición triangular y se le permitió explorarlos durante 5 min. Pasados los 50 min, la rata fue colocada nuevamente en el centro (P2) durante 5 min. En este caso, el campo abierto contenía 4 copias idénticas de un objeto novedoso distinto (B) distribuidas como está indicado en la Fig. 21. Finalmente, 50 min después, la rata fue colocada en el dispositivo (Test) y se puso en contacto con dos objetos A y dos B distribuidos según se muestra en la Fig. 21 durante 5 min. Uno de los objetos A y uno de los objetos B fue colocado en una posición idéntica a las utilizadas en P1 y P2 respectivamente y el otro en una posición distinta y por lo tanto novedosa.

3.4.4. Análisis de variables

Para el análisis informático, la base del campo abierto se dividió en 9 cuadrantes y se cuantificó el tiempo que cada uno de los animales pasó explorando los objetos A y B. El tiempo de exploración puede definirse como el tiempo en que el animal se encuentra cerca del objeto y tiene contacto físico con él, ya sea a través de sus patas delanteras o su hocico. Además del tiempo de exploración, puede utilizarse un “valor de discriminación” denominado “memoria dónde” y “memoria cuándo”. La “memoria dónde” se calcula como el tiempo de exploración del objeto desplazado menos el objeto estacionario dividido la sumatoria de ambos tiempos de exploración. La “memoria cuándo” se calcula como el tiempo de exploración del objeto estacionario antiguo menos el objeto estacionario nuevo dividido la sumatoria de ambos tiempos de exploración. En ambos casos, un valor igual a 0 indica que no existe preferencia por uno u otro objeto; un valor positivo indica preferencia por el objeto desplazado (dónde) o el objeto antiguo (cuándo), según corresponda (Kart-Teke y col., 2006).

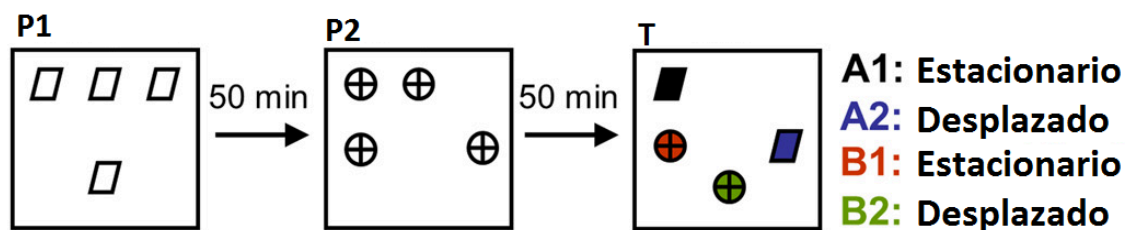


Figura 21 Test de memoria episódica. Cada rata fue sometida a 2 pruebas (P1 y P2) y al test propiamente dicho (T). Durante P1, la rata es colocada durante 5 min en el campo abierto, el cual contiene 4 copias idénticas de un objeto novedoso (A) distribuidas en posición triangular. Pasados los 50 min, la rata es colocada nuevamente en el dispositivo (P2) durante 5 min. En este caso, el campo abierto contiene 4 copias idénticas de un objeto novedoso distinto de A (B). Finalmente, 50 min después, la rata es colocada en el dispositivo (T) y se pone en contacto con dos objetos A y dos B; uno de los objetos A y uno de los objetos B es colocado en una posición idéntica a las utilizadas en P1 y P2 y el otro en una posición distinta.

3.5. Obtención de las muestras

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación con guillotina; en el caso de las ratas hembra este procedimiento se realizó en la fase diestro del ciclo estral para mantener condiciones endocrinas similares. Se colocó la cabeza del animal en una tabla de disección, y se procedió a retirar la piel y la musculatura cefálica mediante el uso de una tijera quirúrgica. Seguidamente se separaron los huesos craneales mediante un corte sagital-medial del cráneo a través de la sutura sagital. Rápidamente se procedió a la extracción del

cerebro separándolo del cráneo por corte de los nervios ópticos con la ayuda de una pinza. El cerebro completo se colocó sobre una tabla de microdissección en posición ventral hacia arriba. Mediante la ayuda de una lupa estereoscópica y un bisturí se realizaron dos cortes coronales; el primero a la altura del cuarto anterior del hipotálamo y el segundo a la altura del cerebelo (Fig. 22). Seguidamente se colocó la fracción resultante en posición rostral respecto del operador y mediante cortes en sentido distal se separó la corteza cerebral para lograr descubrir el hipocampo, el cual se retiró con la menor cantidad de tejido circundante posible y se colocó en un tubo eppendorf estéril previamente pesado para su inmediata congelación en nitrógeno líquido. Los tejidos destinados a la extracción de ácidos nucleicos fueron conservados directamente en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesado.

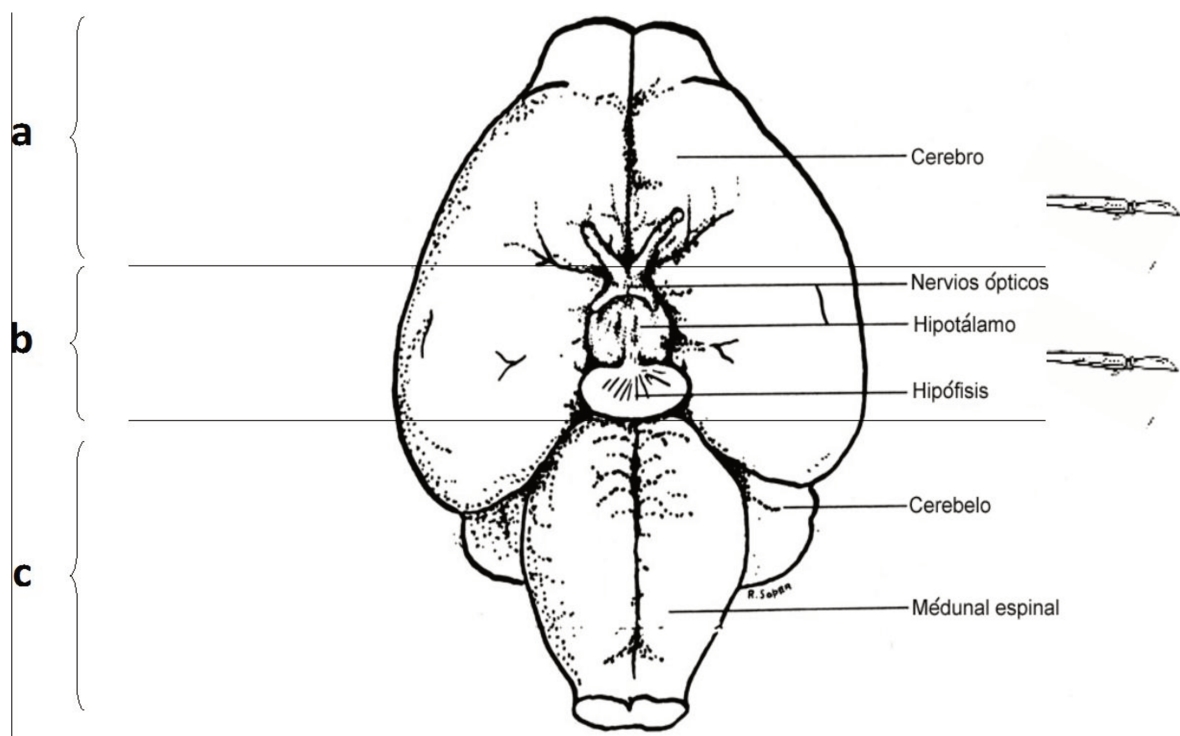


Figura 22 Cortes coronales sobre el cerebro con la posición ventral hacia arriba. (a) Corte a la altura del tracto óptico; (b) Segmento utilizado para disecar el hipocampo dorsal; (c) Corte del cerebelo. Modificado de <http://www.informatics.jax.org/greenbook/figures/figure13-11.shtml>.

3.6. Extracción de ARN total, transcripción reversa y análisis de la expresión de las moléculas de interés mediante PCR en tiempo real

Las muestras de hipocampo de cada grupo experimental fueron homogenizadas individualmente en reactivo TRIzol y el ARN total fue extraído de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina). La

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

Cantidades equivalentes de ARN ($4\text{ }\mu\text{g}$) fueron retro-transcriptas a ADN copia (ADNc) con transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (300 U; Promega, Madison, WI) usando 200 pmoles de hexanucleótidos al azar (Promega). Veinte unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNAout; Invitrogen) y 100 nmoles de una mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs) fueron agregados a cada tubo de reacción en un volumen final de $30\text{ }\mu\text{l}$ de buffer de transcriptasa reversa $1\times$. La transcripción reversa se realizó a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 min y la reacción fue finalizada mediante calentamiento a $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y posterior enfriamiento en hielo. El ADNc obtenido se llevó a un volumen final de $60\text{ }\mu\text{l}$ con agua libre de ribonucleasas.

Se utilizó un protocolo optimizado de PCR en tiempo real para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de las proteínas esteroideogénicas StAR, P450_{scc}, 3β -HSD, P450_{arom}, P450(17 α), 5α -reductasa-1, 3α -HSD, P450(11 β)-2 y 17β -HSD-3; los factores neurotróficos VEGF-A y BDNF; y las proteínas sinápticas Syp y espinofilina. Como control interno de carga (housekeeping gene) se determinó la expresión de la proteína ribosomal L19. En la Tabla 1 se detallan los oligonucleótidos cebadores utilizados para este estudio.

Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por triplicado y se incluyó una muestra sin transcriptasa reversa para detectar contaminación por ADN genómico (ADNg). Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el sistema Real-Time DNA Step One Cycler (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Para la amplificación, $5\text{ }\mu\text{l}$ de cada ADNc fueron combinados con HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica, Rosario, Argentina) y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de $20\text{ }\mu\text{l}$. Luego de una desnaturalización inicial de 15 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, la mezcla de reacción fue sometida a 45 ciclos de desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s, hibridación a $52\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s, y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación consistente. El ciclo umbral (C_t) de cada muestra fue calculado utilizando el programa de análisis Step One Software (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). La eficiencia

de las reacciones de PCR se evaluó para cada par de cebadores por la amplificación de ocho diluciones en serie de los ADNc y posterior construcción de la recta C_t versus log de la dilución (eficiencia= $10^{(-1/\text{pendiente})-1}$). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la eficiencia varió de 98% a 102%. No se observaron diferencias significativas en los valores de C_t de la proteína ribosomal L19 entre los grupos experimentales.

Los niveles de expresión de las muestras experimentales sobre los valores controles se calcularon para cada gen target utilizando el método de la curva estándar relativa (Cikos y col., 2007). Para cada uno de los genes targets y para el gen de referencia se construyó una curva estándar relativa (curva de calibrado) C_t versus Log C_R (donde C_R es Concentración Relativa). Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen de referencia fue determinada de la curva realizada. La cantidad obtenida correspondiente al gen target fue normalizada contra la cantidad relativa del gen de referencia en cada uno de los grupos experimentales. A uno de estos grupos se le asignó como valor de expresión relativa 1 y el valor normalizado de los otros grupos fue dividido por el valor normalizado del primero para facilitar la comparación.

Tabla 1. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real para estudios de expresión de las enzimas/proteínas esteroideogénicas a nivel del ARNm.

| Enzima/Proteína | Cebador Sentido | Cebador Antisentido |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| StAR | 5'- GCAAAGCGGTGTCATCAG- 3' | 5'- GGCGAACTCTATCTGGGTCT- 3' |
| P450scc | 5'- AGGGAGAACGGCACACACAG- 3' | 5'- TCGCAGGAGAAGAGAGTCGC- 3' |
| 3 β -HSD | 5'- CAGGGCATCTCTGTGTCAT- 3' | 5'- AGATGAAGGCTGGCACACTA- 3' |
| P450(17 α) | 5'- GGTGATAAAGGGTTATGCCA- 3' | 5'- GCTTGAATCAGAATGTCCGT- 3' |
| 17 β -HSD-3 | 5'- CAACCTGCTCCCAAGTCATT- 3' | 5'- AACCCCTACTCCCGAAGAAA- 3' |
| P450arom | 5'- TGGCAGATTCTTGTGGATGG- 3' | 5'- CGAGGACTTGTGATGATGAGT- 3' |
| 5 α -reductasa-1 | 5'- CACCTTCAACGGCTATGTAC- 3' | 5'- AGGATGTGGTCTGAGTGGAT- 3' |
| 3 α -HSD | 5'- GCACTCAACTGGACTATGTGGA- 3' | 5'- GCTCATCTCGTGGGAAAAAT- 3' |
| P450(11 β)-2 | 5'- GAAGGTGCGTCAGAATGCTC- 3' | 5'- TTCAGGCTACCAGGGTTCAG- 3' |
| VEGF | 5'- TATCTTCAAGCCGTCCTGTG- 3' | 5'- TCTCCTATGTGCTGGCTTTG- 3' |
| BDNF | 5'-GACTCTGGAGAGCGTGAATG- 3' | 5'-GAACCTTCTGGTCCTCATCC- 3' |
| Syp | 5'- TGTTTGCCTTCCTCTACTCC- 3' | 5'- CCCAGGCTGATGAACTAACT- 3' |
| Espinofilina | 5'- GGAATCAGGGTGTGTGGAGA- 3' | 5'- GCGTCGGTCATAGTCCTCAT- 3' |
| Proteína ribosomal L19 (housekeeping) | 5'- AGCCTGTGACTGTCCATTCC- 3' | 5'- TGGCAGTACCCTTCCTCTTC- 3' |

3.7. Análisis bioinformático

Los genes de rata correspondientes a las enzimas P450scc, P450arom (AC_000076.1), P450(17 α), 5 α -reductasa-1 (AC_000069.1), 3 α -HSD (AC_000085.1) y P450(11 β)-2 (AC_000075.1) fueron analizados en busca de Islas CpG utilizando el software Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Una isla CpG es definida como una secuencia de ADN igual o superior a 200 pb, con un porcentaje de GC mayor a 50% y un promedio de CpG observado/esperado mayor a 0.6 (Missaghian y col., 2009). Luego se determinó si estas secuencias contenían sitios de reconocimiento para las enzimas BstUI y/o Mae II (secuencias de reconocimiento con dinucleótidos CpG). Para determinar la presencia de sitios de unión a factores de transcripción utilizamos el programa TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Los cebadores se diseñaron mediante el software Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, USA) (Tabla 2).

3.8. Extracción de ADNg, digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y análisis del estado de metilación de las moléculas esteroideogénicas mediante PCR en tiempo real

Para el análisis de los niveles de metilación de las secuencias promotoras de P450scc, P450arom, P450(17 α), 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD y P450(11 β)-2 se utilizó la técnica combinada de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y PCR en tiempo real (MSRE-PCR) (Bruce y col., 2008; von Kanel y col., 2010). El ADNg de hipocampo fue extraído a partir del tejido de animales individuales de cada grupo experimental utilizando el kit de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración total de ADN fue determinada por medición a A₂₆₀ y el ADN fue mantenido a -80 °C. Una cantidad de 1.5 μ g del ADNg total fue digerida con 7.5 unidades de BamHI (Promega, Madison, WI) para reducir el tamaño de los fragmentos y el producto de digestión fue purificado utilizando el Kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up Sistema Kit (Promega, Madison, WI). 130 ng de ADN clivado con BamHI fueron digeridos toda la noche con 2 unidades de BstUI (New England BioLabs, Beverly, MA) o Mae II (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) en buffer enzimático 1X a 60 °C o 50 °C, respectivamente, en un baño de agua cubierto (Tecno Dalvo, Santa Fe, Argentina) para asegurar la completa digestión. Nuevamente se

utilizó el Kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) para purificar los productos de corte.

Como control positivo de la técnica se procedió a obtener ADN metilado in vitro. Para tal fin se utilizó la enzima CpG metiltransferasa (M.SssI) (New England BioLabs Inc.; Tost y Gut, 2007). Se preparó un tubo conteniendo 7,5 µl de solución amortiguadora NE Buffer 2, 0,4 µl de SAM (equivalente a 10 nmoles de S-adenosilmetionina), 1,5 µl de SssI (equivalente a 6 U de SssI) y 4,5 µg de ADN_g de rata. Se llevó a un volumen final de 67,5 µl. Luego se incubó 3 h a 37 °C en baño seco y finalmente se agregó al tubo 0,4 ml de SAM y 1,5 µl de SssI, dos veces (cada dos horas). Seguidamente se incubó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se inactivó la enzima por incubación en termociclador durante 5 min a 95 °C. Como control negativo utilizamos ADN_g de ratas jóvenes stock (donde las secuencias de interés fueron corroboradas por no estar metiladas).

Mediante PCR en tiempo real se analizaron los niveles de expresión relativa de distintas regiones correspondientes a P450_{scc}, P450_{arom}, P450(17 α), 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD y P450(11 β)-2 (Tabla 2). Los niveles de ADN_g fueron detectados utilizando el sistema Real-Time DNA Step One Cyler (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Todas las muestras fueron amplificadas por triplicado. Para la amplificación, 5 µl de cada ADN_g fueron combinados con HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica, Rosario, Argentina) y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de 20 µl. Luego de una desnaturalización inicial de 15 min a 95 °C, la mezcla de reacción fue sometida a 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, hibridación a 50-60 °C por 15 s, y extensión a 72 °C por 15 s. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. La eficiencia de las reacciones de PCR se evaluó para cada par de cebadores por la amplificación de ocho diluciones en serie de los ADN_g y posterior construcción de la recta C_t versus log de la dilución (eficiencia= $10^{(-1/\text{pendiente})}-1$). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la eficiencia varió de 98% a 102%. El C_t de cada muestra fue calculado utilizando el programa de análisis Step One Software (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). Como control interno (CI) se amplificó una región del gen que no contenía sitios BstUI o Mae II (Control normalizador). Cuando un sitio CpG se encuentra metilado, no es posible que sea digerido por las enzimas sensibles a metilación BstUI o Mae II, lo cual permite que el producto sea amplificado. Contrariamente, si el mismo sitio no se encontraría metilado,

las enzimas generan un corte en la secuencia y no es posible lograr la amplificación del fragmento. Los niveles relativos de metilación del promotor se calcularon utilizando el método de curva estándar relativa previamente descrito en la Sección 3.6.

Tabla 2. Cebadores utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real para el estudio del estado de metilación de las secuencias promotoras.

| Región Promotora | Cebador Sentido | Cebador Antisentido |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| IC P450 _{scc} | 5'- ACCCATAAGGCAGACATTGA- 3' | 5'- CCAAACGCAGAGAAAGAACT- 3' |
| Mae II (a) P450 _{scc} | 5'- GAGACTTAATAGCAGTCCCA- 3' | 5'- GAGTAATAGCACACCCCTTT- 3' |
| Mae II (b) P450 _{scc} | 5'- GGAGGGGGTCTTAGCCATTA- 3' | 5'- CCACTGCCCTTCAGACAGGT- 3' |
| IC 3 α -HSD | 5'- CAGAGAAGGAAGTTTGAATC- 3' | 5'- ATGTCAGATCACTTGGAAGT- 3' |
| Mae II (a) 3 α -HSD | 5'- ACTGATTTTTGCTTAGGCTG- 3' | 5'- AAAATTCTGTAGTGAGCCGT- 3' |
| Mae II (b) 3 α -HSD | 5'- GGATGTGGCTGGAATACAGA- 3' | 5'- TTCTGTCACTTTGTCTGCCC- 3' |
| Mae II (c) 3 α -HSD | 5'- GAAACATTGTGTCTGTATGG- 3' | 5'- GTAAATTGTTAAGGGGAGAC- 3' |
| IC 5 α -reductasa-1 | 5'- CAACTTTCTGTCCATCTACC- 3' | 5'- CTTACAACCTCTCCTCTTTCG- 3' |
| BstUI (a) 5 α -reductasa-1 | 5'- CACCTTCCCAGCCCTGACAG- 3' | 5'- AGGTGCCAGGAGAGAGGGGT- 3' |
| Mae II (b) 5 α -reductasa-1 | 5'- AGTCAAGAAATATGCCTGAA- 3' | 5'- AATACGTTCTCGGTATGAAT- 3' |
| Mae II (c) 5 α -reductasa-1 | 5'- CCACTAAGCGTGAATCTCTC- 3' | 5'- AACACTCCATGACTCTCTGC- 3' |
| Mae II (d) 5 α -reductasa-1 | 5'- CTGCTGGCTATGTTTCTGAT- 3' | 5'- TGGAAATTAAGTCTCTGAGCC- 3' |
| IC P45017 α | 5'- GCAACTGAACTAAAACAAGG- 3' | 5'- TAAGCAACAACCTCTCCAATC- 3' |
| Mae II (a) P45017 α | 5'- AGGAGTATTCATAGGCAGAA- 3' | 5'- GTATAAATCTTGTGGGCAAC- 3' |
| Mae II (b) P45017 α | 5'- CAGAGAGATGGCACAAATGT- 3' | 5'- TACATGCAGGTAAAAGGCTC- 3' |
| IC P450arom | 5'- ACTCAAGGGCAAGATGATAA- 3' | 5'- AGTGACAAGGCAAGACAAAT- 3' |
| Mae II P450arom | 5'- CTGGAGTAGGAGCCTTTACC- 3' | 5'- CTTGAGTGGGTAGAGTGACG- 3' |
| IC P45011 β 2 | 5'-TGGACACTACACCTGCTCTT-3' | 5'-GGGCTCAACTGTCAGTAGAA-3' |
| Mae II P450 β 2 | 5'-GAGCCCCAACCATGACCAGA-3' | 5'-TGCCATCCTCCTCCCTCAG-3' |

3.9. Análisis estadístico

Todos los datos fueron calculados como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para el estudio de los parámetros edad y sexo se aplicó el ANOVA de dos vías. En caso de detectarse interacción entre los factores estudiados, se prosiguió con un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni. Para el análisis del test de memoria episódica, las diferencias en los tiempos de exploración se evaluaron utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni. La comparación entre los grupos HJ versus HA y HJ versus HJ.S se realizó empleando el test t no apareado de dos colas. Los efectos del ambiente enriquecido (con estimulación motora/sensorial) y multiparidad (preñez con y sin lactancia) fueron estudiados aplicando ANOVA de una vía seguido del post-test

Bonferroni. Se consideró un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ para todos los test estadísticos y todos los análisis fueron acompañados con un análisis de los supuestos correspondientes. Para ello, se utilizó el software estadístico GraphPad Prism Version 5.03 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

“El trabajo hecho con gusto y con amor, siempre es una creación original y única”

Roberto Sapriza.-

4.1. Experimento 1. Regulación transcripcional de las moléculas implicadas en la vía de síntesis de esteroides hipocampales durante el envejecimiento en ratas hembra y macho

4.1.1. La edad y el sexo modifican la expresión de los genes implicados en la síntesis de esteroides en el hipocampo de rata

Para analizar el efecto del envejecimiento en los niveles de ARNm de las moléculas esteroidogénicas en el hipocampo, ratas macho y hembra en DPN 90 y 450 fueron comparadas (Fig. 23). El ANOVA de dos vías permitió estudiar la edad y el sexo como factores fijos de interés, evaluando los efectos principales y la interacción entre los mismos. De ello resultó que la expresión génica de las enzimas P450(11 β)-2 y P450arom fue significativamente afectada por la edad ($p < 0.001$); aunque no se detectó interacción entre los factores. En cambio, la transcripción de los genes StAR, P450scc, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(17 α) y 17 β -HSD-3 resultó afectada por la interacción entre la edad y el sexo de los animales ($p < 0.0001$); en este caso, el análisis mediante un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni fue necesario. En las ratas hembra, el aumento de la edad disminuyó significativamente la transcripción de las moléculas StAR, P450scc, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(17 α) y 17 β -HSD-3 (HJ vs. HA; $p < 0.05$). En relación al sexo, cuando se compararon animales jóvenes se observó mayor expresión génica de StAR, P450scc, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa, P450(17 α) y 17 β -HSD-3 en las hembras comparadas con los machos (HJ vs. MJ; $p < 0.05$). En los animales adultos mayores, sólo se detectó una menor expresión de ARNm de StAR en las ratas hembra respecto a los machos (HA vs. MA; $p < 0.05$).

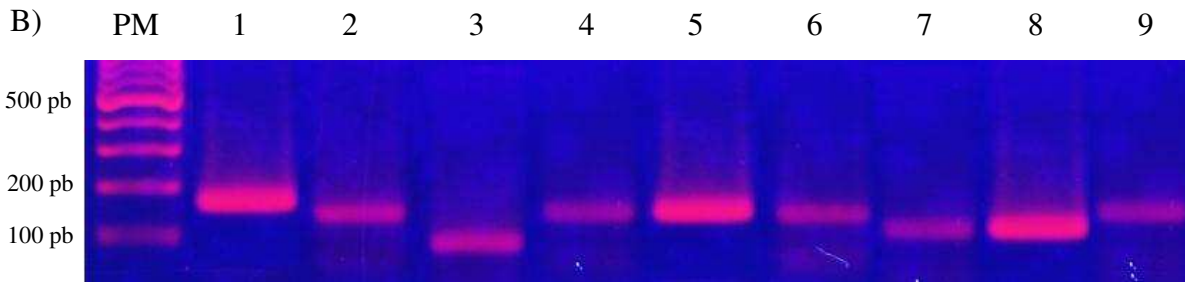
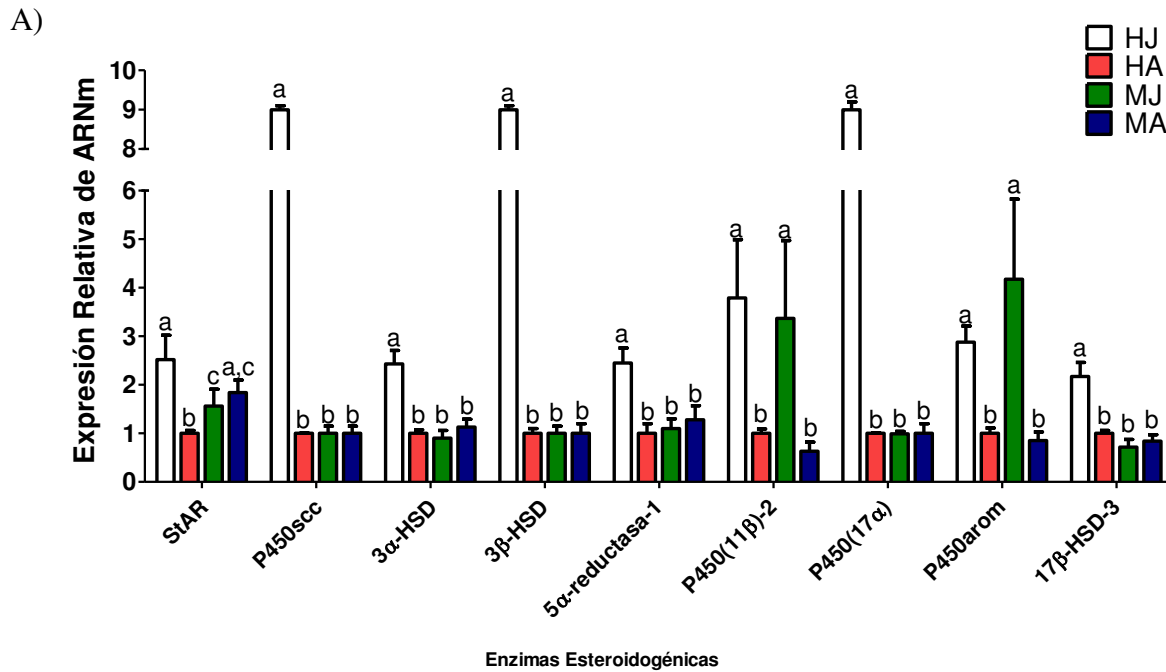


Figura 23 A) Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas jóvenes adultas (J, DPN 90) y adultas mayores (A, DPN 450) hembra (HJ y HA) y macho (MJ y MA). La cantidad de ARNm de las ratas HJ, MJ y MA se indica como un valor relativo respecto del grupo HA. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). StAR, P450scc, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(17 α) y 17 β -HSD-3: el ANOVA de dos vías reveló interacción entre los factores edad y sexo ($p<0.0001$), por lo tanto un análisis mediante un ANOVA de una vía fue necesario; en este caso, diferentes letras indican diferencia significativa con $p<0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni. P450(11 β)- 2 y P450arom: diferentes letras indican diferencia significativa con $p<0.001$ utilizando el ANOVA de dos vías. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación en muestras HJ. PM: Marcador de peso molecular; 1: StAR (173 pb); 2: P450scc (143 pb); 3: 3 α -HSD (87 pb); 4: 3 β -HSD (145 pb); 5: 5 α -reductasa-1 (144 pb); 6: P450(11 β)- 2 (144 pb); 7: P450(17 α) (117 pb); 8: P450arom (118 pb) y 9: 17 β -HSD-3 (160 pb).

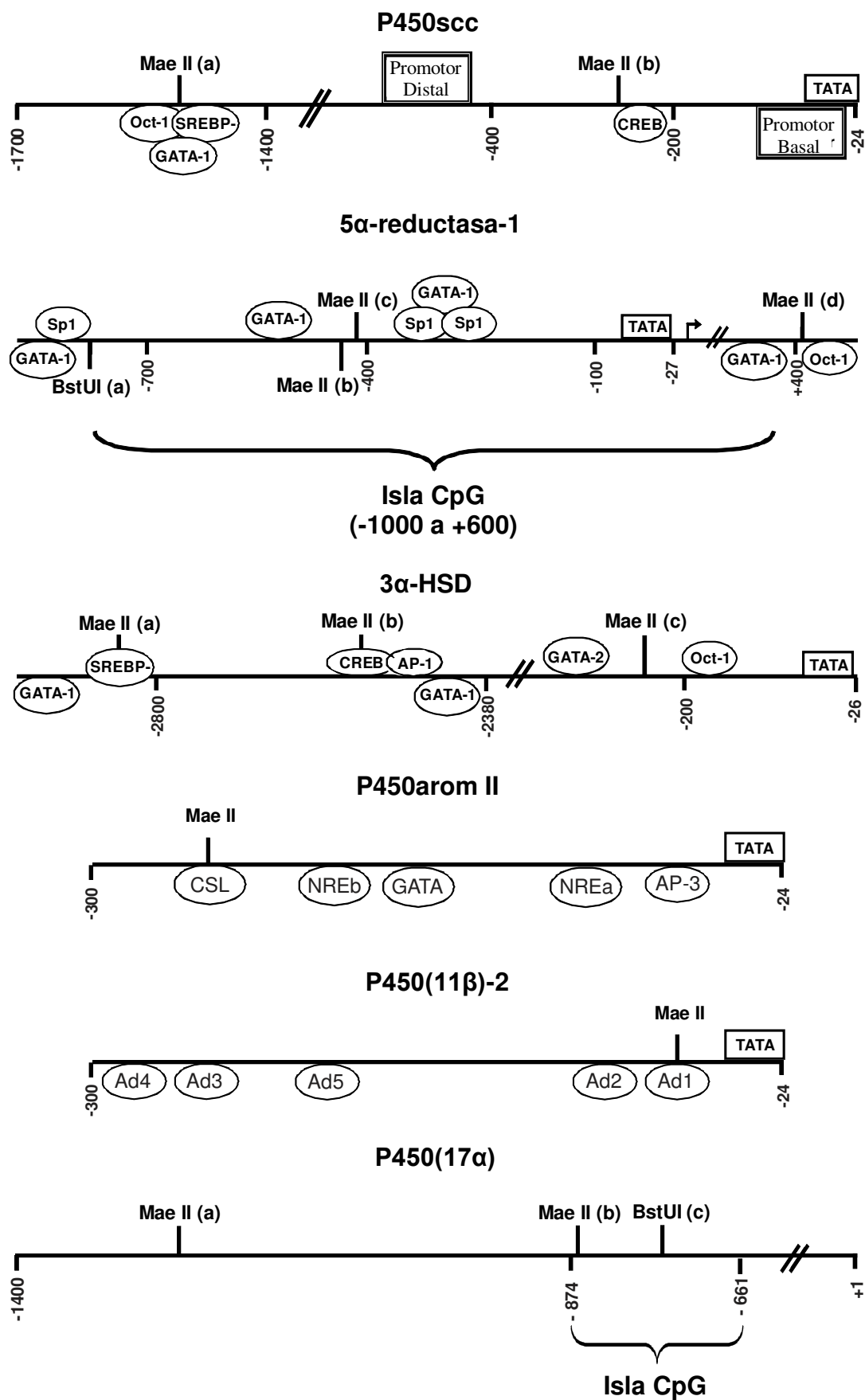


Figura 24 Esquema de los promotores de los genes correspondientes a las enzimas P450scc (Shih y col., 2011), 5 α -reductasa-1 (Blanchard y col., 2007), 3 α -HSD (Penning, 1996), P450(11 β)-2 (Nomura y col., 1993), P450(17 α) (Missaghian y col., 2009) y P450arom (Stocco, 2008). Se indica la posición de la caja TATA y los posibles sitios de unión a los factores de transcripción: proteínas de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB), factor de unión a octámeros 1 (Oct-1), GATA, proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBP-), factor promotor selectivo 1 (Sp1) y proteína activadora 1 y 3 (AP-1, AP-3). También se indican elementos de unión a miembros de la familia de receptores nucleares (NREa y NREb), elementos similares al elemento de respuesta a cAMP (CLS) y elementos Ad1-5. Se detallan las islas CpG y los sitios CpG estudiados mediante el empleo de enzimas de restricción sensibles metilación BstUI (CGCG) y Mae II (ACGT).

4.1.2. Análisis in silico de los genes de rata correspondientes a las enzimas P450scc, 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(11 β)-2, P450(17 α) y P450arom

En base a los resultados obtenidos y con el fin de determinar si existe un control epigenético sobre las moléculas esteroideogénicas, se analizaron las regiones promotoras de los genes correspondientes a las enzimas P450scc, 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(11 β)-2, P450(17 α) y P450arom y se estudiaron los posibles sitios de unión a factores de transcripción y sitios CpG potencialmente metilables. Como mencionamos previamente, en la rata, tres promotores han sido descritos para la enzima P450arom: PI.f (promotor de cerebro), PII (promotor de ovario y testículos) y PI.tr (promotor de testículos) (Silandre et al., 2007). Dado que los transcritos correspondientes a los dos primeros promotores han sido detectados en el hipocampo de rata, ambos fueron analizados. Sin embargo, en el promotor PI.f no se detectaron sitios CpG que pudieran ser estudiados mediante la metodología propuesta; por lo tanto, sólo el promotor PII fue incluido en este análisis. Los resultados se indican en la Fig. 24.

4.1.3. El envejecimiento produce cambios en el estado de metilación de los promotores de enzimas implicadas en la síntesis de alopregnanolona en ratas hembra

Para determinar si los cambios en la expresión génica de las moléculas esteroideogénicas observados con el aumento de la edad en el hipocampo de ratas hembra se debe a mecanismos de metilación del ADN, las secuencias promotoras de dichos genes fueron

evaluadas en los grupos HJ y HA. Los resultados muestran un incremento en el estado de metilación de determinados sitios CpG de los promotores correspondientes a las enzimas P450scc (sitio a), 5 α -reductasa-1 (sitio b) y 3 α -HSD (sitio a), en el hipocampo de la rata hembra adulta (HJ vs. HA; $p < 0.05$; Fig. 25A, Fig. 25B y Fig. 25C, respectivamente).

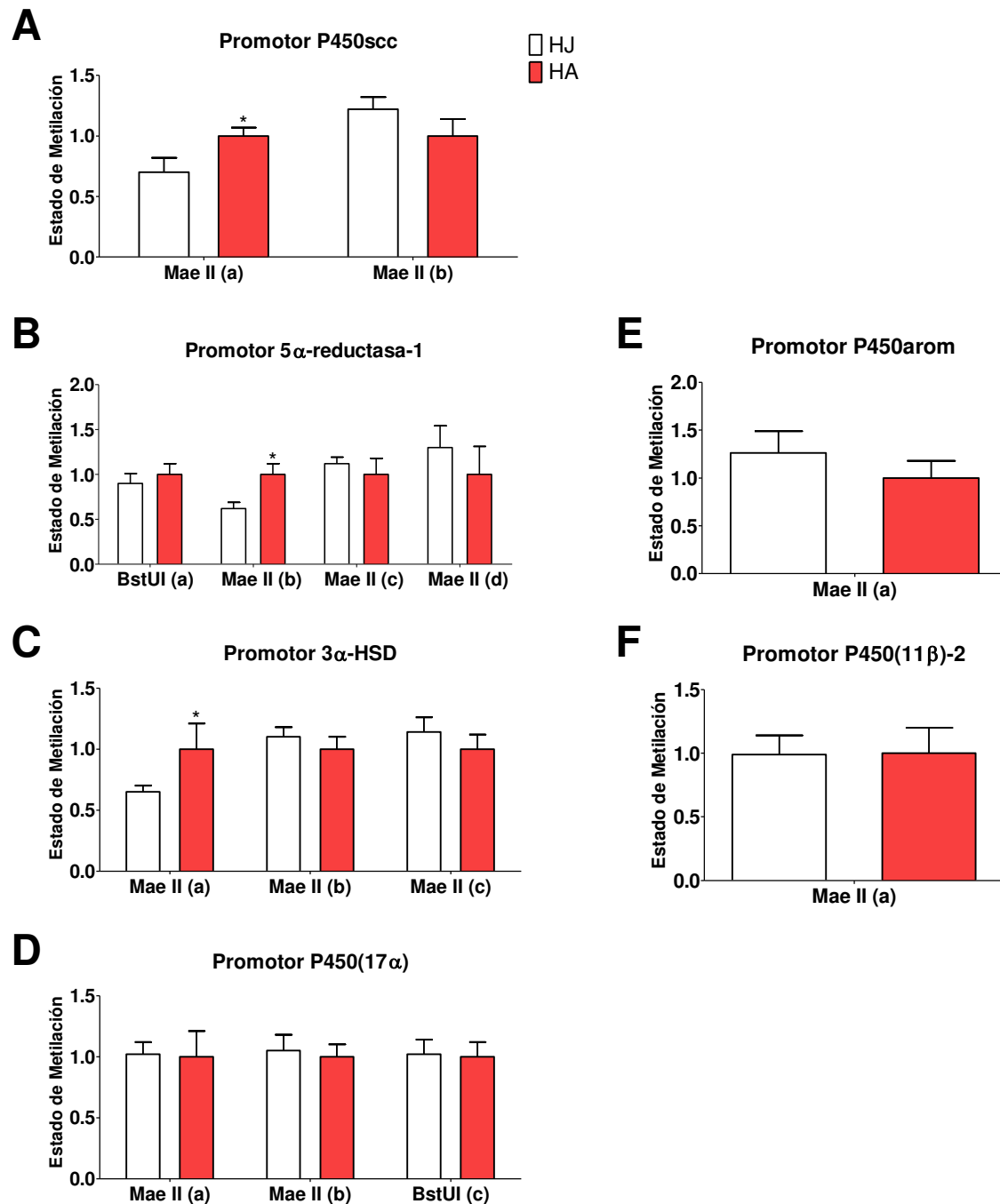


Figura 25 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de los genes que codifican para las enzimas P450scc (A), 5 α -reductasa-1 (B), 3 α -HSD (C), P450(17 α) (D), P450arom (E) y P450(11 β)-2

(F) mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas hembra jóvenes adultas y adultas mayores. El estado de metilación relativa de los animales pertenecientes al grupo de hembras jóvenes adultas (HJ) se indica como un valor relativo respecto a los del grupo de hembras adultas mayores (HA). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=8/grupo). * indica $p < 0.05$ versus HA.

4.1.4. La memoria episódica se ve afectada con el aumento progresivo de la edad en ratas

Considerando el importante efecto que tienen los esteroides/neuroesteroides sobre los procesos asociados a las funciones de memoria y aprendizaje, quisimos determinar la influencia del envejecimiento sobre la memoria episódica. Para ello, ratas hembra y macho jóvenes adultas y adultas mayores fueron sometidas a un test de comportamiento que permite evaluar el recuerdo consciente de una experiencia pasada en términos de lo "qué pasó", "dónde" y "cuándo". Durante el mismo, los animales tienen que discriminar el orden en el cual los objetos fueron presentados y la localización de los mismos. Para el análisis individual de cada grupo experimental, los resultados se muestran como el tiempo de exploración que el animal destinó a cada uno de los objetos; mientras que para el análisis comparativo entre grupos, los valores se indican como los valores de discriminación (la definición de cada concepto se detalla en Materiales y Métodos, Sección 3.4.4.). En base a lo previamente descrito por Inostroza y col. (2013), esperaríamos que en ratas normales los tiempos de exploración sean:

- ✓ Objeto antiguo estacionario (OA) > objeto reciente estacionario (OR) (memoria cuándo);
- ✓ OA > objeto antiguo desplazado (OAD) (memoria dónde);
- ✓ Objeto reciente desplazado (ORD) > OR (memoria dónde).

Como muestra la Figura 26A, ratas hembra jóvenes presentaron un tiempo de exploración significativamente mayor en OA comparado con OR, OAD y ORD. No se detectaron diferencias en el tiempo de exploración entre OR y ORD. En ratas hembra adultas, se detectó un aumento en el tiempo de exploración en OA comparado con OR y ORD (Fig. 26B). En ratas macho jóvenes, los tiempos de exploración fueron significativamente mayores en OA comparado con OR, OAD y ORD y en ORD comparado con OR (Fig. 26C). En ratas macho adultas no se detectaron diferencias en los tiempos de exploración (Fig. 26D).

En los cuatro grupos HJ, HA, MJ y MA los coeficientes correspondientes a la “memoria cuándo” fueron mayores a 0 (positivo), lo cual estaría indicando una preferencia hacia el OA comparado con OR (Tabla 3). Contrariamente, los coeficientes correspondientes a la “memoria dónde - OA” resultaron negativo, mostrando una preferencia hacia el objeto estacionario (Tabla 3). Finalmente, los coeficientes que refieren a la “memoria dónde – OR” fueron mayores a 0 en los grupos HJ, MJ y MA, indicando una preferencia hacia el objeto desplazado; y menores a 0 en el grupo HA, indicando un efecto contrario (Tabla 3). En ninguno de los casos se detectaron diferencias significativas.

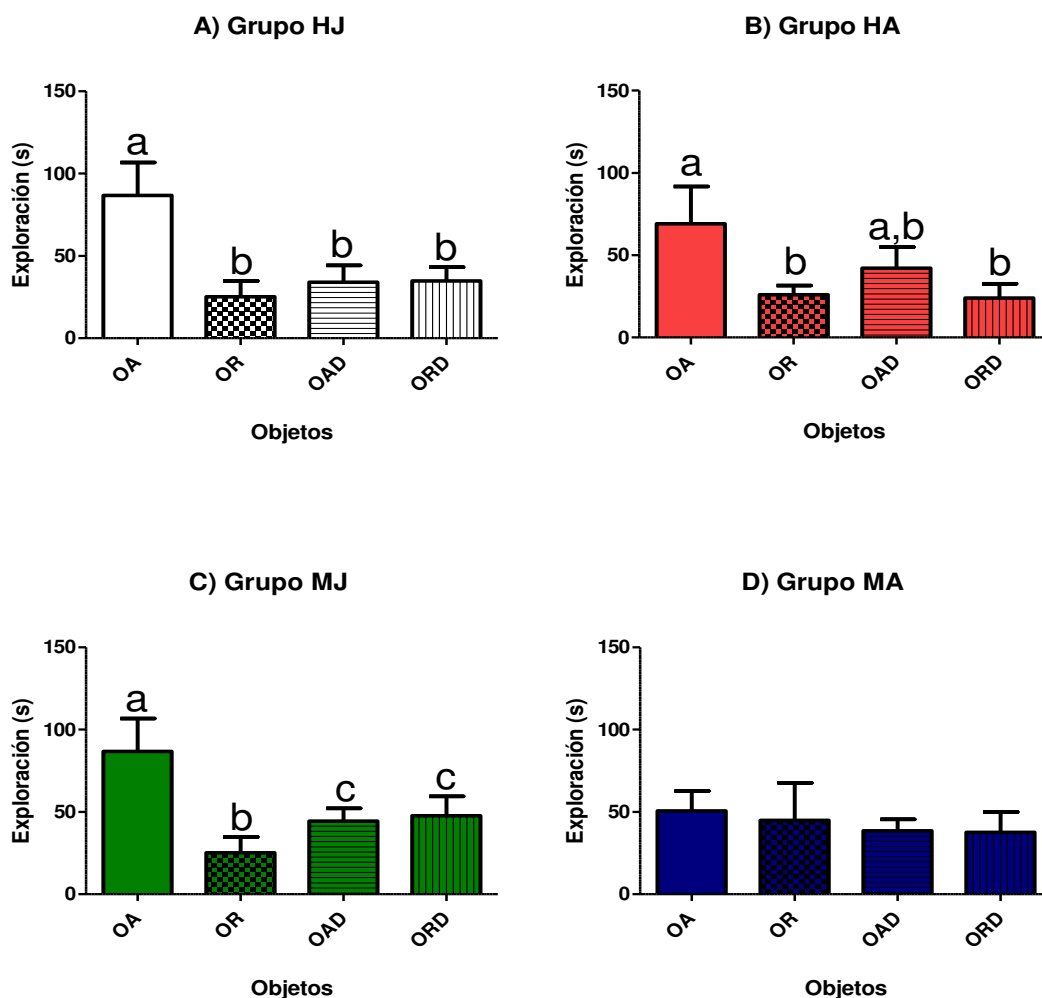


Figura 26 Test de memoria episódica en ratas hembra y macho jóvenes adultas (DPN 90) y adultas mayores (DPN 450). Se indican los tiempos de exploración (s) para cada uno de los objetos antiguo (OA), reciente (OR), antiguo desplazado (OAD) y reciente desplazado (ORD). Cada animal fue evaluado una sola vez en el test mencionado. A) Hembras jóvenes adultas (HJ); B) Hembras adultas mayores (HA); C) Machos jóvenes adultos (MJ) y D) Machos adultos mayores (MA). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=10). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$ utilizando one-way ANOVA seguido del post-test Bonferroni.

Tabla 3. Coeficientes correspondientes a las “memoria cuándo” y “memoria dónde” obtenidos en el test de memoria episódica en ratas hembra y macho jóvenes adultas (HJ y MJ) y adultas mayores (HA y MA).

| | HJ | HA | MJ | MA | valor p |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| Memoria Cuándo | 0.42 ± 0.13 | 0.35 ± 0.11 | 0.42 ± 0.11 | 0.47 ± 0.16 | p>0.05 |
| Memoria Dónde- OA | -0.36 ± 0.14 | 0.04 ± 0.17 | -0.32 ± 0.13 | -0.13 ± 0.13 | p>0.05 |
| Memoria Dónde - OR | 0.05 ± 0.17 | -0.11 ± 0.17 | 0.05 ± 0.17 | 0.09 ± 0.19 | p>0.05 |

OA: Objeto antiguo; OR: Objeto reciente.

Un valor igual a 0 indica que no existe preferencia por uno u otro objeto; un valor positivo indica preferencia por el objeto desplazado (dónde) o el objeto antiguo (cuándo), según corresponda.

Los resultados se indican como la media ± SEM (n=10).

4.2. Experimento 2. Los ambientes enriquecidos como moduladores de la esteroidogénesis hipocámpica

4.2.1. La exposición breve a ambientes con estimulación sensorial y motora modifica la expresión de las moléculas esteroidogénicas en el hipocampo de la rata hembra joven

Para determinar el efecto del ambiente enriquecido sobre la regulación de la esteroidogénesis hipocámpica, ratas hembra en DPN 80 y DPN 440 fueron expuestas durante 10 días a ambientes sensorialmente enriquecidos (HJ.S y HA.S respectivamente) y con estimulación motora (HJ.M y HA.M respectivamente). Como control, se utilizaron ratas hembra mantenidas en ambientes estándares (HJ y HA). En la Fig. 27 se muestran los resultados. En las ratas jóvenes, la estimulación sensorial generó un aumento en la expresión del ARNm de las enzimas 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1 y P450(17 α) y una disminución de P450arom (HJ vs. HJ.S; p<0.05); la estimulación motora, por su parte, incrementó la expresión génica de las enzimas 3 α -HSD, P450(17 α) y P450(11 β)-2 (HJ vs. HJ.M; p<0.05). En las ratas adultas, sólo se verificó un aumento en la expresión génica de P450(11 β)-2 producido por la estimulación motora (HA vs. HA.M; p<0.05).

4.2.2. La exposición breve a ambientes enriquecidos modifica la expresión génica de los factores neurotróficos y proteínas sinápticas

Para determinar el efecto de la estimulación sensorial y motora sobre otros genes implicados en la vía de acción de los neuroesteroides y asociados a las funciones neuronales, se estudió la expresión del ARNm de VEGF-A, BDNF, Syp y espinofilina (Fig. 28). En las ratas jóvenes, la estimulación sensorial generó un aumento en la transcripción del gen neurotrófico BDNF y los genes sinápticos Syp y espinofilina. En animales adultos, en cambio, la estimulación sensorial disminuyó la expresión de los genes Syp y espinofilina (HA vs. HA.M; $p < 0.05$).

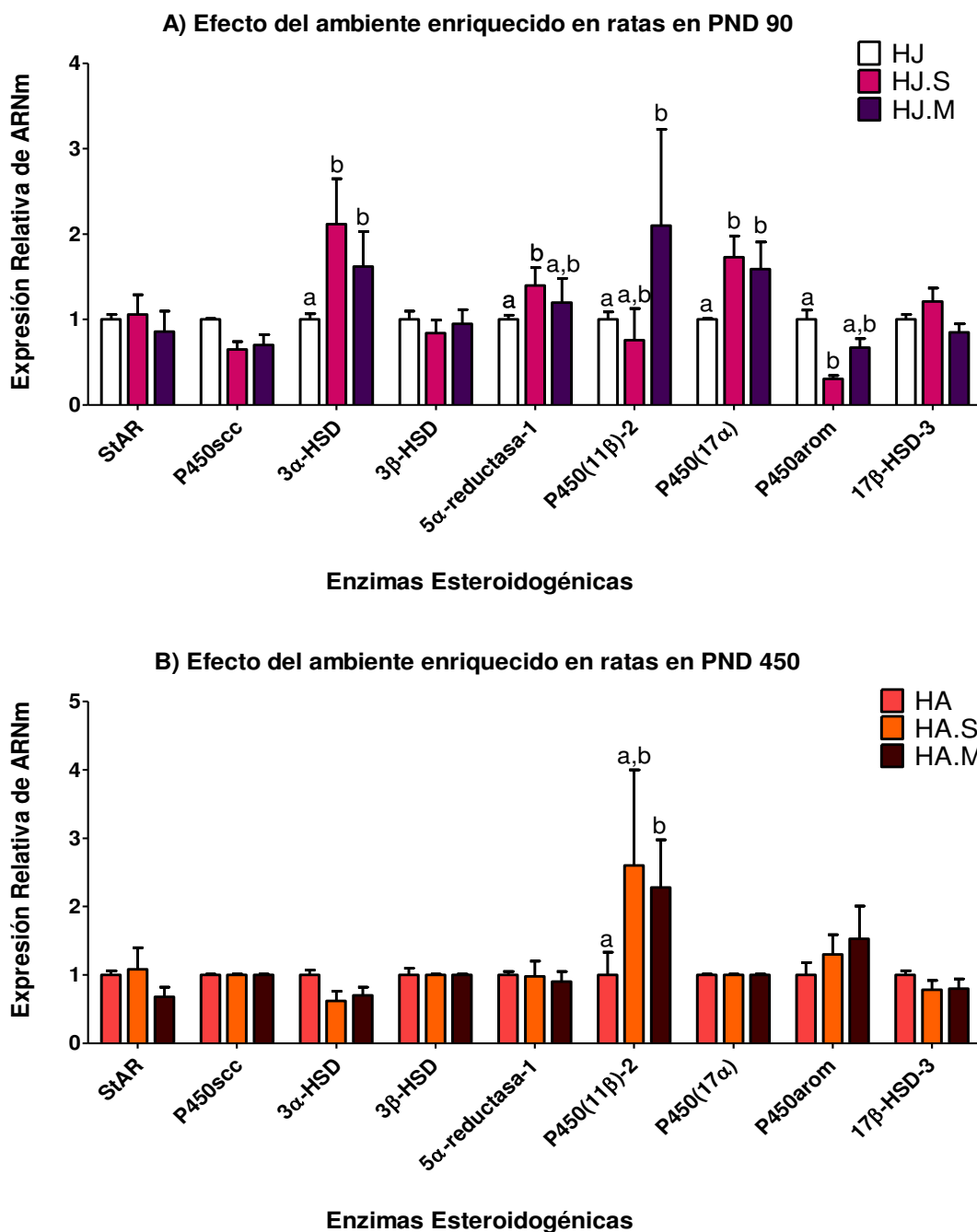


Figura 27 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas hembra expuestas durante 10 días a un ambiente enriquecido. (A) Ratas jóvenes adultas mantenidas en un ambiente estándar (HJ), con estimulación sensorial (HJ.S) y con estimulación motora (HJ.M). (B) Ratas adultas mayores mantenidas en un ambiente estándar (HA), con estimulación sensorial (HA.S) y con estimulación motora (HA.M). La cantidad de ARNm de las ratas mantenidas en condiciones de enriquecimiento se indica como un valor relativo respecto del grupo mantenido en condiciones estándares. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p<0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

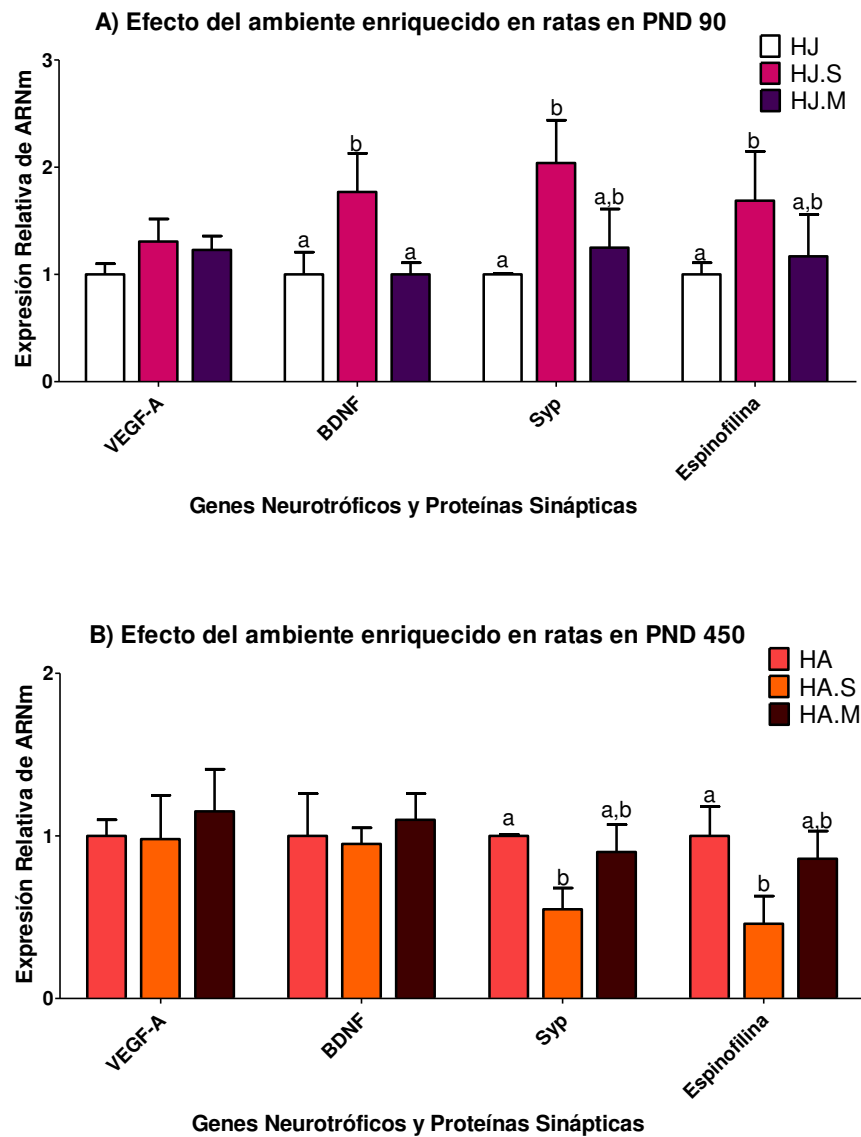


Figura 28 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de los factores neurotróficos y proteínas sinápticas en el hipocampo de ratas hembra expuestas durante 10 días a un ambiente enriquecido. (A) Ratas jóvenes adultas mantenidas en un ambiente estándar (HJ), con estimulación sensorial (HJ.S) y con estimulación motora (HJ.M). (B) Ratas adultas mayores mantenidas en un ambiente estándar (HA), con estimulación sensorial (HA.S) y con estimulación motora (HA.M). La cantidad de ARNm de las ratas mantenidas en condiciones de enriquecimiento se indica como un valor relativo respecto del grupo mantenido en condiciones estándares. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p<0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

4.2.3. La exposición breve a ambientes sensorialmente enriquecidos modifica el estado de metilación del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1 en el hipocampo de la rata joven

Para determinar si los cambios producidos por el ambiente enriquecido en la expresión de las moléculas esteroideogénicas en el hipocampo de la rata podrían estar mediados por mecanismos de metilación del ADN, las secuencias promotoras de dichos genes fueron evaluadas. Basados en los cambios observados a nivel transcripcional, decidimos enfocar el estudio epigenético en los animales jóvenes estimulados sensorialmente y por tanto, el análisis fue realizado sobre los promotores de los genes correspondientes a las enzimas 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(17 α) y P450arom en los grupos HJ y HJ.S. Según estos resultados, el ambiente enriquecido disminuyó el estado de metilación de uno de los sitios CpG del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1 (sitio d) (HJ vs. HJ.S; $p < 0.05$; Fig. 29A), lo cual podría explicar el aumento en la expresión del ARNm de dicho gen.

4.2.4. La exposición prolongada a un ambiente sensorialmente enriquecido atenúa la disminución de la expresión de las moléculas esteroideogénicas asociada a la edad en el hipocampo

Considerando que la exposición breve a ambientes con estimulación sensorial activa la expresión de ciertas moléculas esteroideogénicas y proteínas sinápticas (Syp y espinofilina) en ratas hembra jóvenes pero no en ratas adultas, se decidió evaluar el efecto de una exposición prolongada a este tipo de ambiente enriquecido. Ratas adultas (DPN 345) fueron expuestas durante 105 días a ambientes sensorialmente enriquecidos (HA.S.Ep) y como control, se utilizaron ratas hembra en DPN 450 mantenidas en ambientes estándares (HA). Para poder estudiar la estimulación sensorial como un posible atenuador de la caída en la expresión génica de las enzimas neuroesteroideogénicas asociada a la edad, se incluyó en este análisis ratas hembra en DPN 90 mantenidas en ambientes estándares (HJ).

Como fue mencionado previamente, el aumento de la edad disminuyó significativamente la transcripción de las moléculas StAR, P450scc, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa-1, P450(11 β)-2, P450(17 α), P450arom y 17 β -HSD-3 (HJ vs. HA; $p < 0.05$; Fig. 30). Sin embargo, la estimulación sensorial fue capaz de atenuar la caída en la transcripción de ciertas enzimas neuroesteroideogénicas, incrementando la expresión de ARNm de StAR, 3 α -

HSD, 5 α -reductasa-1 y P450(17 α) en ratas adultas (HA vs. HA.S.Ep; $p < 0.05$; Fig. 30). No obstante, los niveles de ARNm de estos genes se mantuvieron significativamente menores respecto de los niveles encontrados en ratas jóvenes (HJ vs. HA.S.Ep; $p < 0.05$; Fig. 30).

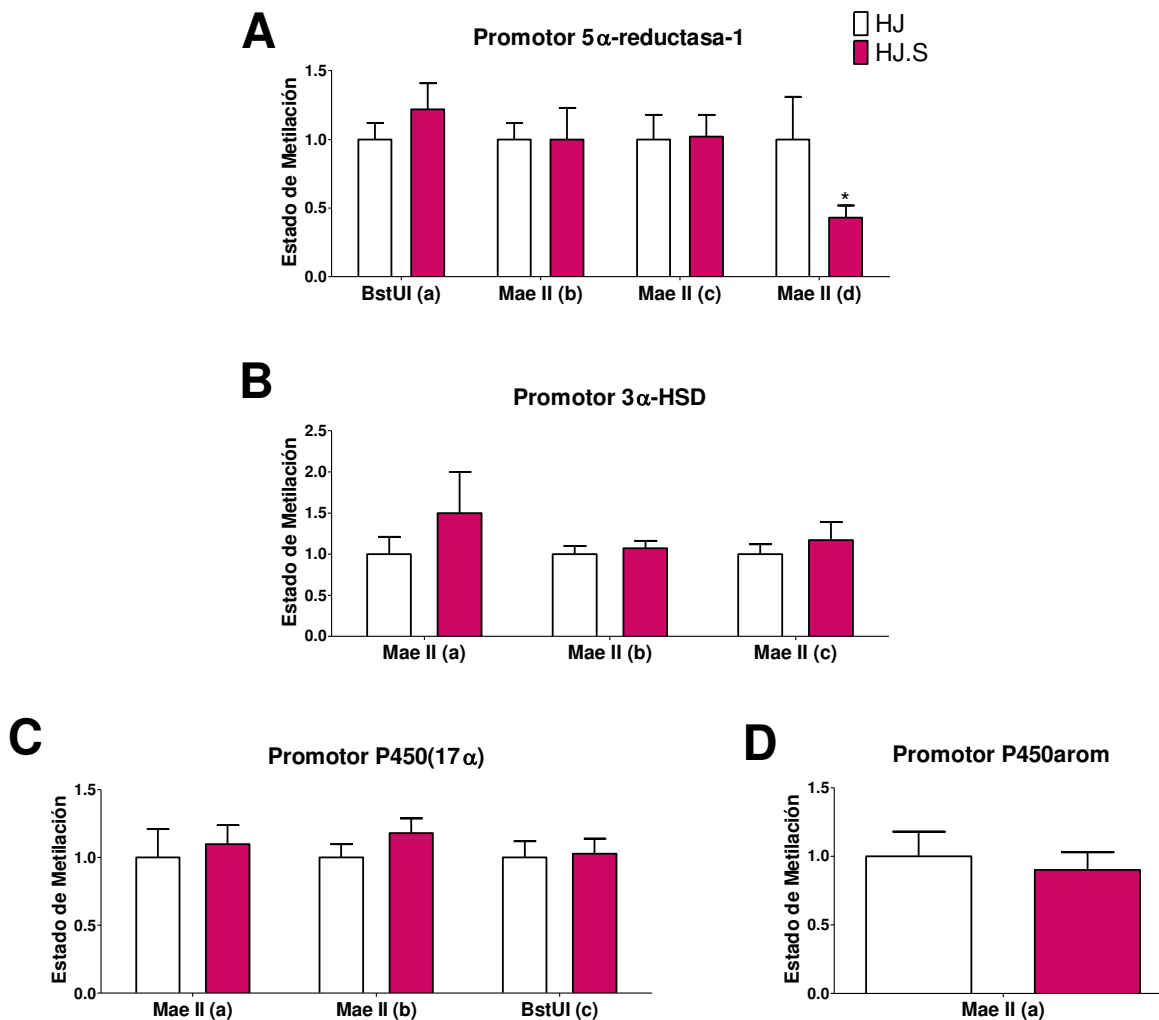


Figura 29 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de las enzimas 5 α -reductasa-1 (A), 3 α -HSD (B), P450(17 α) (C) y P450arom (D) mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas hembra jóvenes adultas expuestas durante 10 días a un ambiente enriquecido. El estado relativo de metilación de los animales pertenecientes al grupo de hembras jóvenes enriquecidas (HJ.S) se indica como un valor relativo respecto a los del grupo de hembras mantenidas en ambiente estándar (HJ). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). * $p < 0.05$ versus HJ.

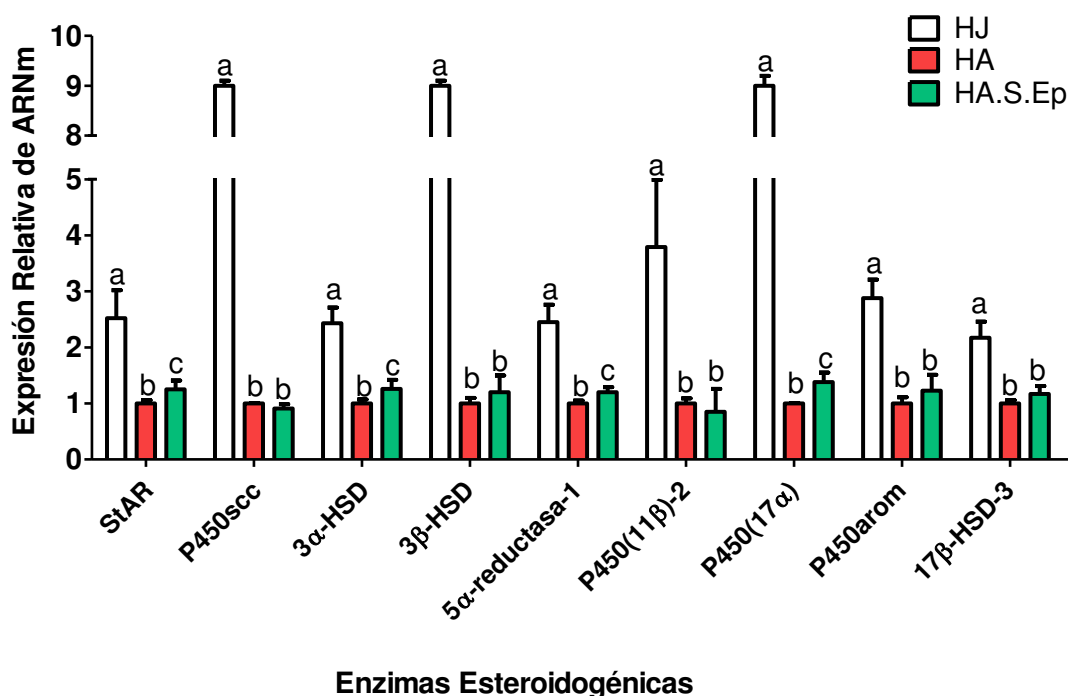


Figura 30 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas hembra jóvenes adultas (HJ) y adultas mayores (HA) mantenidas en un ambiente estándar y ratas adultas mayores expuestas durante 105 días a un ambiente enriquecido (HA.S.Ep). La cantidad de ARNm de los grupos HJ y HA.S.Ep se indica como un valor relativo respecto del grupo HA. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p<0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

4.2.5. La estimulación sensorial prolongada no modifica la expresión génica de los factores neurotróficos y proteínas sinápticas

Se evaluó el efecto de la edad y estimulación sensorial sobre la expresión del ARNm de genes neuronales en el hipocampo de ratas hembra. El envejecimiento produjo una disminución en la expresión de VEGF-A, BDNF y Syp en el hipocampo (HJ vs. HA; $p<0.05$; Fig. 31). Sin embargo, el ambiente enriquecido prolongado no generó cambios en la expresión de los factores neurotróficos y sinápticos mencionados (HA vs. HA.S.Ep; $p>0.05$; Fig. 31).

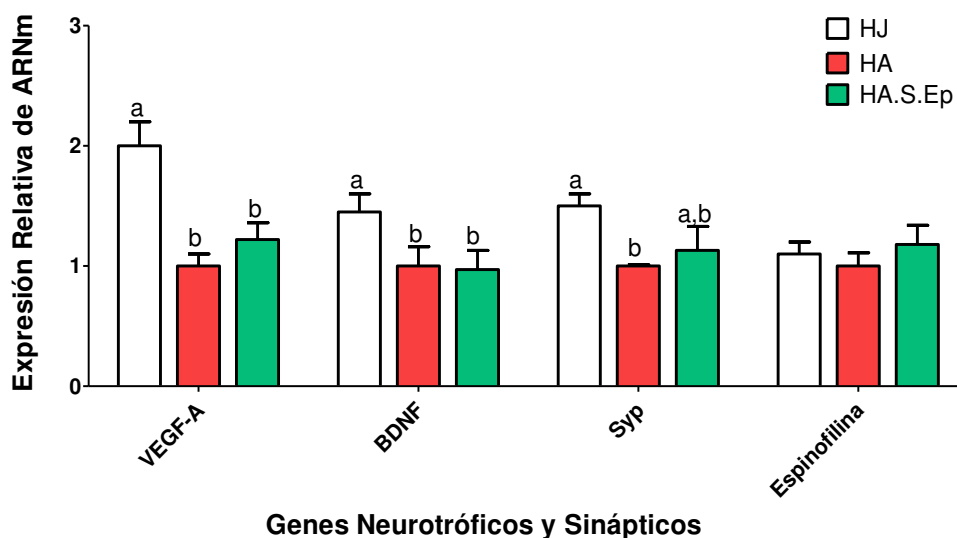


Figura 31 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas neurotróficas y sinápticas en el hipocampo de ratas hembra jóvenes (HJ) y adultas mayores mantenidas en un ambiente estándar (HA) y ratas adultas mayores expuestas durante 105 días a un ambiente enriquecido (HA.S.Ep). La cantidad de ARNm de los grupos HJ y HA.S.Ep se indica como un valor relativo respecto del grupo HA. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p<0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

4.2.6. El ambiente sensorialmente enriquecido modifica el estado de metilación del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1 en el hipocampo de la rata adulta

Las secuencias promotoras de los genes 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD y P450(17 α) fueron analizadas en los grupos HJ, HA y HA.S.Ep para determinar si los cambios producidos por el ambiente enriquecido en la expresión de estas moléculas podrían estar mediados por mecanismos de metilación del ADN.

Como mencionamos previamente, el estado de metilación de determinados sitios CpG de los promotores de las enzimas 5 α -reductasa-1 (sitio b) y 3 α -HSD (sitio a) aumentó en el hipocampo de la rata hembra adulta en comparación con las ratas jóvenes (HJ vs. HA; $p<0.05$; Fig. 32A y Fig. 32B, respectivamente). Sin embargo, el ambiente enriquecido disminuyó el estado de metilación de uno de los sitios CpG del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1 (sitio d) (HA vs. HA.S.Ep; HJ vs. HA.S.Ep; $p<0.05$; Fig. 32A), lo cual podría explicar el aumento en la expresión del ARNm de dicho gen. Por otra parte, el estado de metilación del sitio Mae II (b) continuó aumentado en las ratas adultas enriquecidas comparadas con las hembras jóvenes (HJ vs. HA.S.Ep; $p<0.05$).

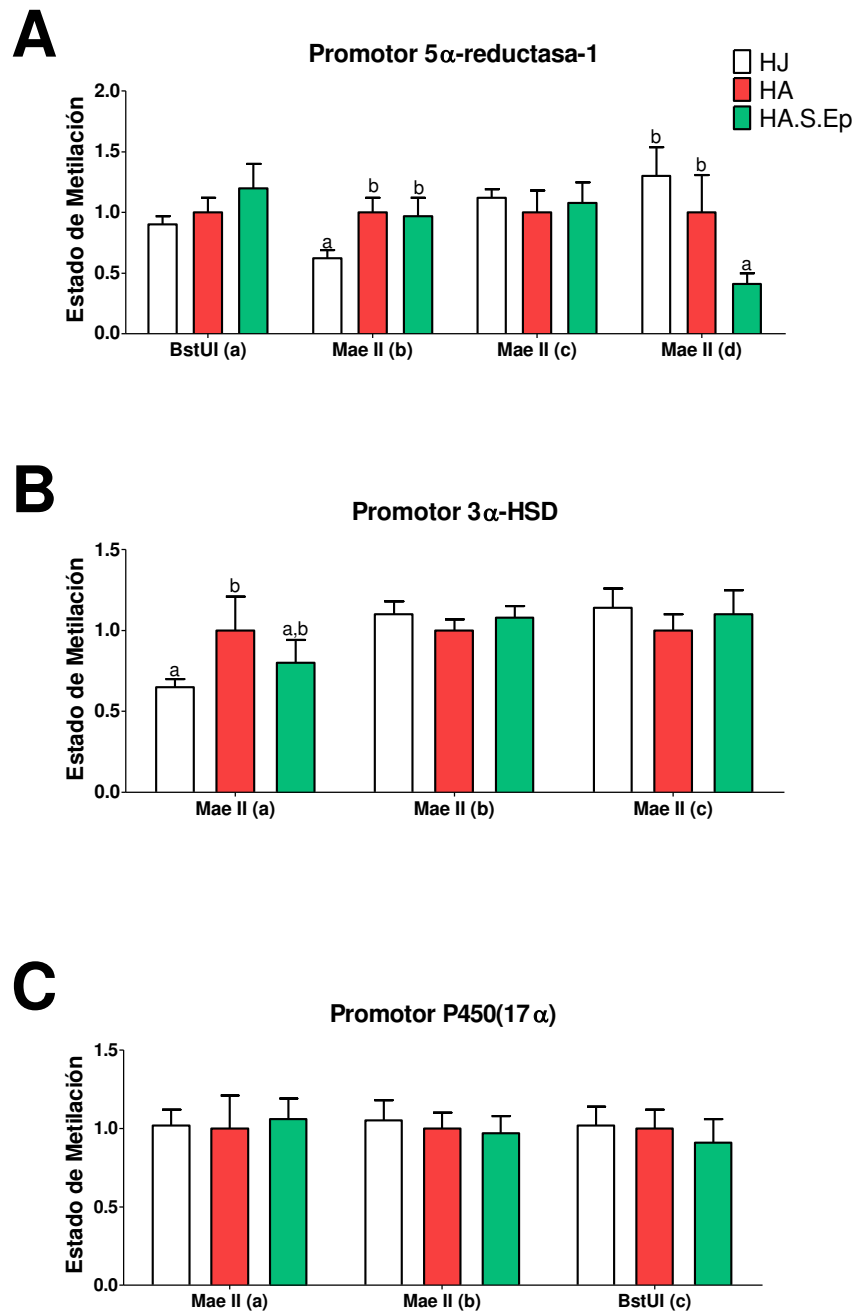


Figura 32 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de las enzimas 5 α -reductasa-1 (A), 3 α -HSD (B) y P450(17 α) (C) mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas hembra jóvenes y adultas mayores mantenidas en un ambiente estándar y ratas adultas mayores expuestas durante 105 días a un ambiente enriquecido. El estado relativo de metilación de los animales pertenecientes a los grupos de hembras jóvenes adultas (HJ) y hembras adultas mayores mantenidas en ambiente sensorialmente enriquecido durante 105 días (HA.S.Ep) se indica como un valor relativo respecto a los del grupo de hembras adultas (HA). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

4.3. Experimento 3. La experiencia materna como moduladora de la esteroidogénesis hipocámpica

4.3.1. La experiencia materna atenúa la disminución de la expresión génica de las enzimas neurosteroidogénicas asociada a la edad en el hipocampo

Para determinar el efecto de la experiencia materna sobre la transcripción de las moléculas esteroidogénicas en el hipocampo, ratas adultas (DPN 450) sometidas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias (HA.M+L) y sin ellas (HA.M-L) fueron comparadas con adultas vírgenes (HA). Para poder estudiar la experiencia materna como un posible atenuador de la caída en la expresión génica de las enzimas neurosteroidogénicas asociada a la edad, se incluyó en este análisis ratas hembra en DPN 90 vírgenes (HJ). Los resultados se muestran en la Fig. 33.

Como ya fue mencionado, el aumento de la edad disminuyó significativamente la transcripción de las moléculas esteroidogénicas (HJ vs. HA; $p < 0.05$). Sin embargo, en los grupos HA.M+L y HA.M-L, la expresión de ARNm de las enzimas P450scc y 5 α -reductasa-1 se encontró aumentada en comparación con ratas adultas vírgenes (HA). La expresión génica de P450arom y P450(11 β)-2 se incrementó en el grupo HA.M+L y disminuyó en HA.M-L comparada con HA ($p < 0.05$; Fig. 33). Cuando se compararon ratas multíparas con y sin sus respectivas lactancias, se encontró que la expresión de ARNm de P450scc, P450arom y P450(11 β)-2 aumentó en HA.M+L comparada con HA.M-L ($p < 0.05$; Fig. 33). Sin embargo, los niveles de ARNm de P450scc, P450arom y 5 α -reductasa-1 se mantuvieron significativamente menores en los grupos HA.M+L y HA-M-L comparados con el grupo HJ ($p < 0.05$; Fig. 33). Sólo el grupo HA.M+L fue capaz de revertir la disminución de la expresión génica de P450(11 β)-2 asociada a la edad (HJ vs. HA.M+L; $p > 0.05$).

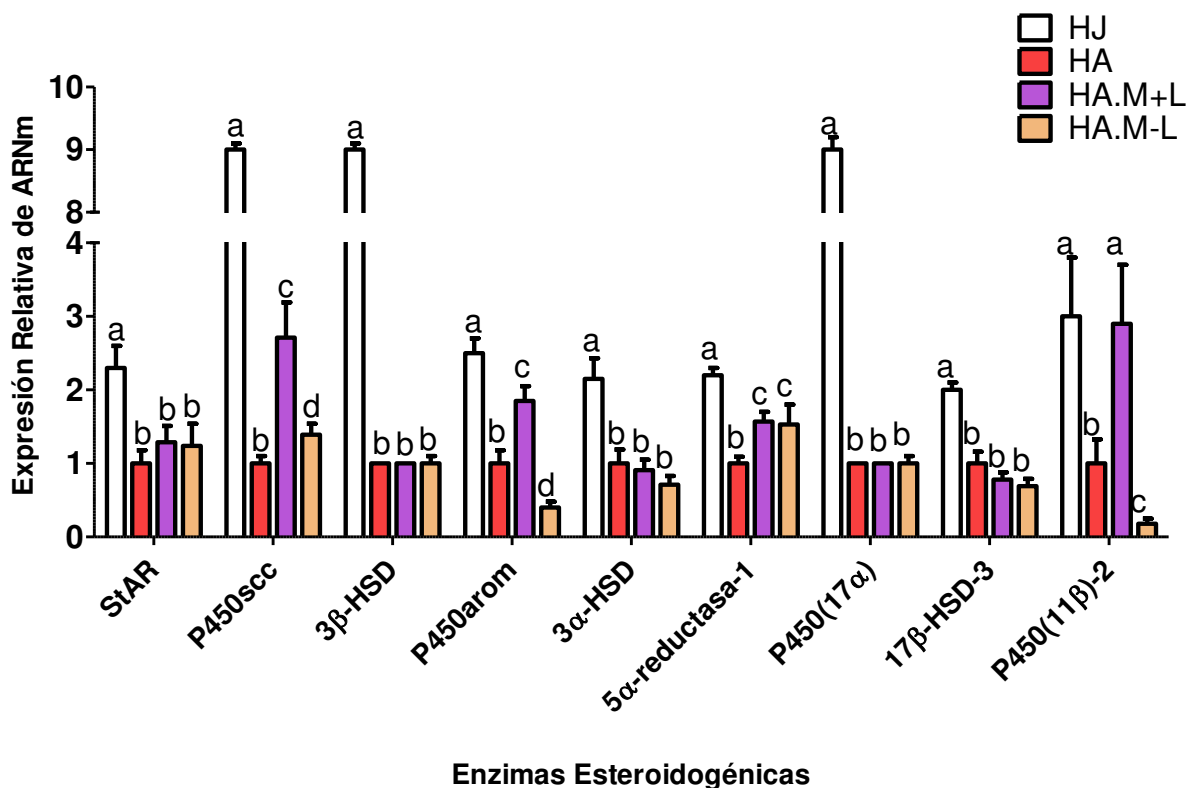


Figura 33 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de ratas jóvenes adultas (HJ) y adultas mayores (HA) vírgenes y ratas adultas mayores expuestas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias (HA.M+L) y sin ellas (HA.M-L). La cantidad de ARNm de los grupos HJ, HA.M+L y HA.M-L se indica como un valor relativo respecto del grupo HA. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=8/grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

4.3.2. La experiencia materna modifica la expresión génica del BDNF y de las proteínas sinápticas

Para determinar el efecto de la preñez y la lactancia sobre las funciones neuronales, se comparó la expresión del ARNm de genes neurotróficos y sinápticos en el hipocampo de ratas pertenecientes a los grupos HJ, HA, HA.M+L y HA.M-L. En la Fig. 34 se indican los resultados. Como mencionamos previamente, el envejecimiento genera una disminución en la expresión de ARNm de BDNF y Syp (HJ vs. HA; $p < 0.05$). Contrariamente, en el grupo HA.M+L se detectó un aumento en la transcripción de BDNF y de las proteínas sinápticas Syp y espinofilina (HA vs. HA.M+L; $p < 0.05$).

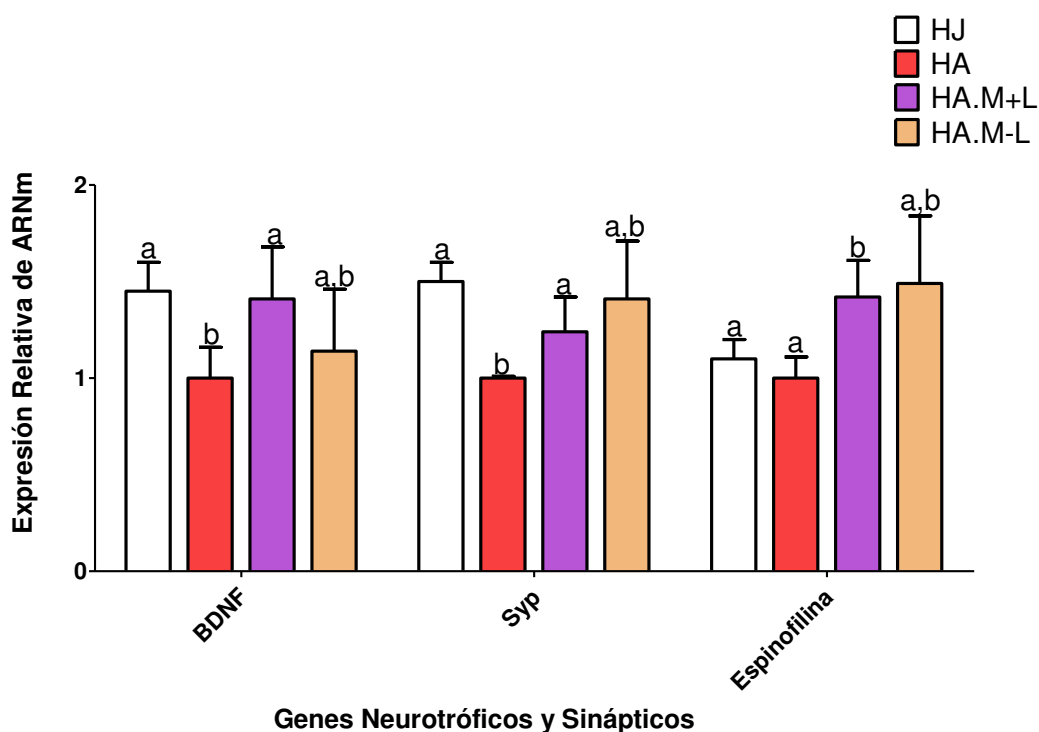


Figura 34 Análisis de la expresión del ARNm mediante RT-PCR de moléculas neurotróficas y sinápticas en el hipocampo de ratas jóvenes adultas (HJ) y adultas mayores (HA) vírgenes y ratas adultas mayores expuestas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias (HA.M+L) y sin ellas (HA.M-L). La cantidad de ARNm de los grupos HJ, HA.M+L y HA.M-L se indica como un valor relativo respecto del grupo HA. Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM ($n=8$ /grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p<0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

4.3.3. La preñez y la lactancia generan una modificación a largo plazo en el estado de metilación de los promotores hipocampales de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1 y P450arom

Para evaluar si los cambios inducidos por la preñez y la lactancia sobre la expresión transcripcional de los genes P450scc, 5 α -reductasa-1, P450arom y P450(11 β)-2 podrían deberse a mecanismos de metilación del ADN, las regiones promotoras de dichos genes fueron evaluadas. Para una mejor y más compleja comparación, se incluyó en este análisis al grupo HJ. Los resultados se indican en la Fig. 35.

En el promotor de la enzima P450scc, se detectó una disminución en el estado de metilación del sitio Mae II (a) en los grupos HJ y HA.M-L comparados con HA ($p<0.05$; Fig. 35A). Sumado a ello, el sitio Mae II (b) disminuyó su nivel de metilación en HA.M-L

comparado con HA y HJ ($p < 0.05$; Fig. 35A). En el promotor de la enzima 5 α -reductasa-1, el estado de metilación del sitio Mae II (b) fue mayor en HA comparado con HJ y HA.M+L ($p < 0.05$; Fig. 35B). Asimismo, un aumento en el estado de metilación de dicho sitio se detectó en HA.M-L comparado con HA.M+L; mientras que el efecto contrario se observó en el sitio Mae II (c) ($p < 0.05$; Fig. 35B). Cuando se analizó la región del exón 1, se encontró una disminución en el nivel de metilación del sitio Mae II (d) en HA.M-L comparado con HJ, HA y HA.M+L ($p < 0.05$; Fig. 35B). En el promotor de la enzima P450arom, un aumento en el estado de metilación del sitio Mae II (a) fue detectado en el grupo HA.M-L comparado con HJ, HA y HA.M+L ($p < 0.05$; Fig. 35D).

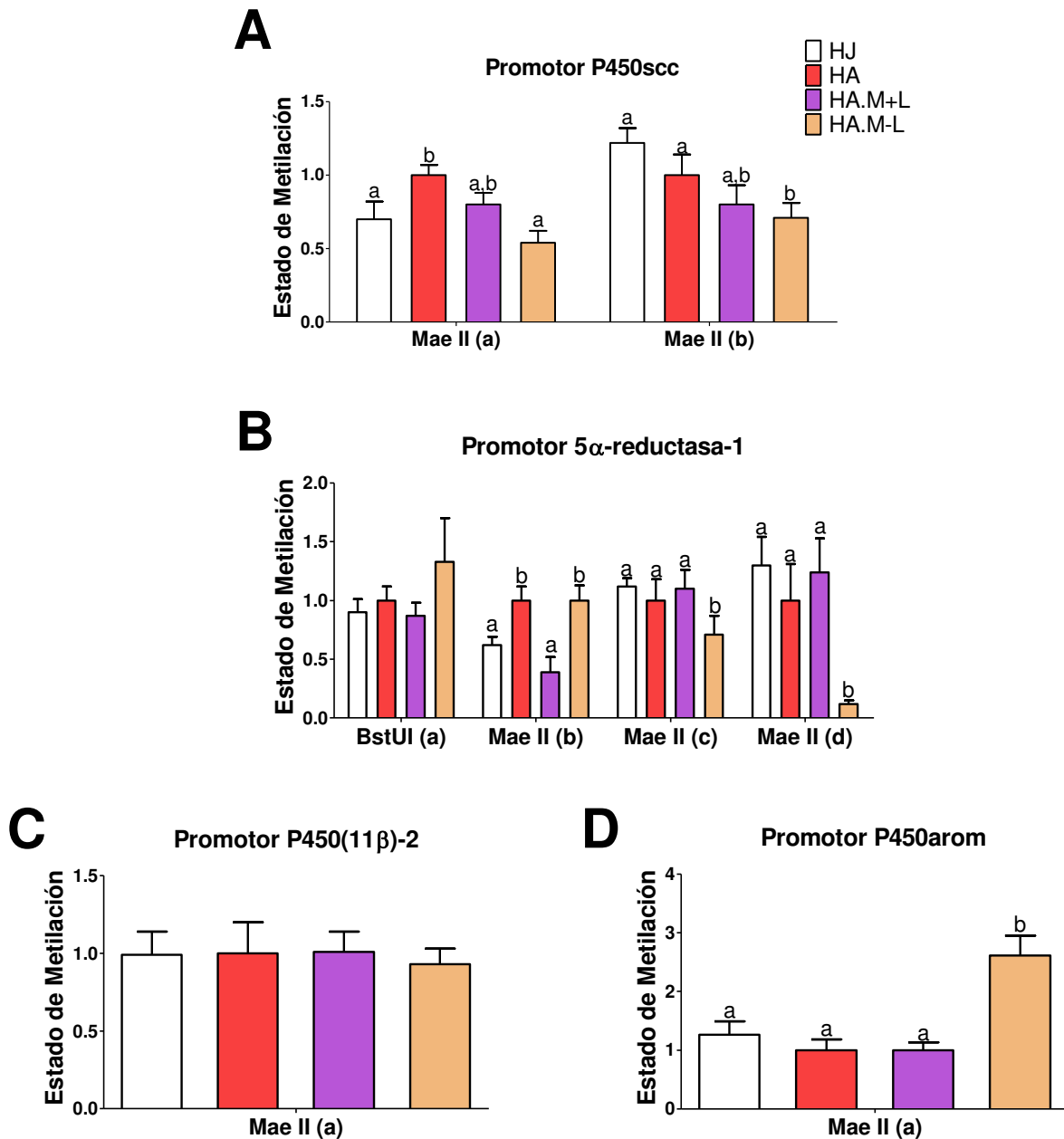


Figura 35 Análisis de metilación de los sitios correspondientes a los promotores de las enzimas P450_{scc} (A), 5 α -reductasa-1 (B), P450(11 β)-2 (C) y P450_{arom} (D) mediante MSRE-PCR en el hipocampo de ratas jóvenes adultas y adultas mayores vírgenes y ratas adultas mayores expuestas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias y sin ellas. El estado relativo de metilación de los animales pertenecientes a los grupos de ratas jóvenes adultas (HJ) vírgenes y ratas adultas mayores expuestas a 3 preñeces con sus respectivas lactancias (HA.M+L) y sin ellas (HA.M-L) se indica como un valor relativo respecto a los del grupo de ratas adultas vírgenes (HA). Las columnas y las barras de error representan la media \pm SEM (n=8/grupo). Diferentes letras indican diferencia significativa con $p < 0.05$ utilizando un ANOVA de una vía seguido del post-test Bonferroni.

5. DISCUSIÓN

"Convendría sentir menos curiosidad por las personas y más por las ideas"

Marie Curie.-

El envejecimiento es un proceso que afecta la plasticidad del cerebro favoreciendo la disfunción general neuronal (Bishop y col., 2010). En contraste, el ambiente enriquecido y la experiencia materna promueven la protección neuronal a través de distintos mecanismos de acción (Beauquis y col., 2010; Franssen y col., 2012; Gatewood y col., 2005; Mora y col., 2007; Sale y col., 2009; Tomizawa y col., 2003). La interacción entre los efectos negativos del envejecimiento y la promoción de los procesos plásticos asociada a la estimulación ambiental pueden mejorar las funciones motoras y cognitivas (Mora y col., 2007). Sumado a ello, los neuroesteroides tienen efectos positivos sobre la neurogénesis, la conectividad sináptica y la performance cognitiva (Charalampopoulos y col., 2008; Mellon, 2007; Reddy, 2010).

El propósito de nuestro estudio fue evaluar el efecto del envejecimiento sobre la memoria episódica y sobre la regulación transcripcional de las moléculas implicadas en la síntesis de neuroesteroides en el hipocampo de la rata hembra y macho. En base a los resultados obtenidos, se pretendió estudiar el ambiente enriquecido y la experiencia materna como posibles activadores de la esteroidogénesis hipocámpica. Para ello, se estudió la expresión del ARNm de los genes neurosteroidogénicos y el estado de metilación de sus promotores. Además, analizamos el efecto de dichos estímulos ambientales sobre la expresión génica de ciertos factores neurotróficos y proteínas sinápticas.

5.1. Experimento 1. Regulación transcripcional de las moléculas implicadas en la vía de síntesis de esteroides hipocampales durante el envejecimiento en ratas hembra y macho

Algunos autores han reportado la disminución de la expresión del ARNm de ciertas enzimas neuroesteroidogénicas (como P450scc, P450arom, P450(17 α) y 3 β -HSD) asociada a la edad (Higo y col., 2009; Ibanez y col., 2003; Kimoto y col., 2010); sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido realizados comparando ratas macho desde estadio neonatal (DPN 0) hasta la edad de jóvenes adultas (DPN 90). En este trabajo, en cambio, utilizamos un modelo óptimo de envejecimiento considerando animales en DPN 450. Así, analizamos la influencia de la edad sobre la expresión de ARNm de las moléculas neuroesteroidogénicas en el hipocampo, comparando ratas hembra y macho jóvenes adultas (DPN 90) y adultas mayores (DPN 450). Mediante RT-PCR encontramos una importante disminución en la transcripción de los genes correspondientes a las enzimas StAR, P450arom, 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, P450(11 β)-2, 17 β -HSD-3, 3 β -HSD, P450(17 α) y P450scc asociada al envejecimiento en el hipocampo de las ratas hembra, pero no de las ratas macho. Mientras que algunas de estas moléculas disminuyeron su expresión 2.5-4 veces, otras lo hicieron 9 veces; lo cual verifica un importante efecto de la edad sobre dicha expresión. Los cambios en la expresión de las enzimas esteroidogénicas detectados con la edad, podrían afectar los niveles de neuroesteroides en los animales adultos mayores. En este sentido, Dong y col. (2001) correlacionaron una disminución en los niveles de proteína y de ARNm de la enzima 5 α -reductasa con una reducción de aproximadamente el 50% de los niveles de alopregnanolona en la corteza frontal de ratones aislados en comparación con ratones mantenidos en grupos. Además se determinó que la administración de inhibidores de la 5 α -reductasa, como el ácido (17 β)17[[bis(1-metiletil) amino]carbonil] androstano-3,5-dieno-3-carboxílico y la Finasterida, producen una disminución en los niveles de alopregnanolona en el cerebro de la rata macho (Cheney y col., 1995; Mukai y col., 2008). En el mismo sentido, el empleo de letrozol, un inhibidor de la aromatasa, reduce significativamente los niveles de E2 en cultivos de células hipocampales (Prange-Kiel y Rune, 2006). Nuestros resultados sugieren que los cambios encontrados en la expresión génica de las enzimas neuroesteroidogénicas en el hipocampo adulto de las hembras podrían estar asociados con la modificación de los niveles de neuroesteroides durante el

desarrollo post-natal (Konkle y McCarthy, 2011). Previamente en nuestro grupo de investigación detectamos una disminución en la expresión de uno de los receptores vinculados a la acción de los estrógenos, el RE α , en el hipocampo de roedores adultos (Moreno-Piovano y col., 2010), sugiriendo que el aumento progresivo de la edad no sólo estaría afectando la síntesis de los neuroesteroides, sino también, las vías de acción de los mismos.

El hecho de que los cambios observados en la expresión de ARNm de las enzimas esteroidogénicas en hembras adultas no sean observados en ratas macho, demuestra que existen importantes dimorfismos sexuales encontrados a nivel de cerebro. Numerosos son los trabajos que resaltan las diferencias neurobiológicas entre las hembras y los machos de una misma especie (Ngun y col., 2011). Distintos autores han reportado diferencias en el tamaño de ciertas regiones cerebrales como el área preóptica, el cuerpo caloso, la amígdala y la corteza cerebral en ratas macho y hembra (Ngun y col., 2011). Sumado a ello, se han descrito diferencias en las propiedades neuroquímicas y en la expresión de ciertos factores neurotróficos. A modo de ejemplo, en la región CA3 del hipocampo la expresión de BDNF fue significativamente mayor en ratas hembra; mientras que en el giro dentado dicha expresión fue significativamente menor comparada con machos (Simpson y Kelly, 2012). Las diferencias también se han reportado a nivel fisiológico y conductual. En roedores, las hembras tienen mejor performance en los test de actividad locomotora, laberinto elevado y reconocimiento de objetos novedosos. En cambio, el rendimiento de los machos es superior en el test de interacción social (Simpson y Kelly, 2012). En humanos, las mujeres han mostrado mayor performance en test de memoria episódica, mientras que los hombres lo han hecho en test de memoria espacial (Ngun y col., 2011). Sumado a ello, la ocurrencia y sintomatología de las enfermedades neurodegenerativas también presenta dimorfismos sexuales. En humanos, las mujeres son más propensas a desarrollar enfermedades como la EA (Gao y col., 1998), la depresión (Kessler y col., 1994) y los desórdenes de ansiedad (Seeman, 1997); mientras que las enfermedades de Parkinson y esquizofrenia son más comunes en hombres (Jablensky, 2000; Van Den Eeden y col., 2003). Históricamente, estas diferencias sexuales se atribuyeron, aunque no exclusivamente, a las diferencias en la secreción de hormonas gonadales, como el E2 y la testosterona (Ngun y col., 2011). En el mismo sentido, algunos autores han resaltado que las diferencias en los niveles cerebrales de ciertas hormonas también podrían estar relacionadas con los dimorfismos sexuales encontrados. En relación a ello, nuestros resultados indican diferencias en la expresión de las enzimas hipocampales implicadas en la síntesis de dichos esteroides en ratas hembra y

macho. La expresión del ARNm de las moléculas StAR, P450_{scc}, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa y P450(17 α) fue significativamente mayor en el hipocampo de ratas hembra en DPN90 comparadas con las ratas macho. Esto podría explicar, al menos en parte, los mayores niveles de dihidroprogesterona, DHEA y alopregnanolona previamente encontrados en esa región del cerebro de ratas hembra en DPN 60 respecto a ratas macho de la misma edad (Caruso y col., 2013). Aunque también se reportó un incremento en los niveles de E2 en las ratas hembra (Caruso y col., 2013); no se encontraron cambios de expresión de la enzima P450_{arom} entre ambos sexos. Contrariamente, mayores niveles de pregnenolona, testosterona y dihidrotestosterona fueron detectados en ratas macho (Caruso y col., 2013). Sin embargo, la expresión génica de algunas de las enzimas implicadas como StAR, P450_{scc} y 17 β -HSD-3 fue mayor en ratas hembra. Estas discrepancias podrían deberse a los modelos animales empleados en cada uno de los trabajos; sumado al hecho de que existen diferentes factores que podrían estar afectando la síntesis de esteroides. Entre ellos, la regulación de la traducción de las enzimas implicadas y los niveles de actividad enzimática. Sería posible que aún cuando los niveles de ARNm estén aumentados, esto no sea reflejado en los niveles proteicos o en la actividad de la misma enzima. Si bien sería interesante determinar las moléculas neuroesteroideogénicas a nivel proteico y evaluar su actividad, existen ciertas limitaciones metodológicas para su detección, considerando la baja expresión de dichas enzimas en el hipocampo y la falta de especificidad de los anticuerpos disponibles.

Basados en los efectos observados durante el envejecimiento, estudiamos si la disminución detectada en la transcripción de los genes correspondientes a las enzimas P450_{scc}, 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, P450_{arom}, P450(11 β)-2 y P450(17 α) en el hipocampo de las ratas hembra podría estar regulada por mecanismos epigenéticos. Para ello, analizamos in silico sitios de unión a factores de transcripción y sitios potencialmente metilables; y evaluamos in vivo el estado de metilación de los promotores de las enzimas mencionadas usando digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y posterior PCR en tiempo real. En las ratas adultas mayores observamos un estado de hipermetilación en sitios particulares de los promotores de P450_{scc}, 5 α -reductasa-1 y 3 α -HSD, lo cual podría explicar la disminución en la expresión del ARNm de dichas enzimas. Aún más interesante resulta el hecho de que el sitio mayormente metilado en el promotor de la enzima P450_{scc} se corresponde con un sitio potencial de unión a SREBP-, Oct-1 y GATA-1. Algunos autores han sugerido que la familia de proteínas GATA estaría implicada en la regulación transcripcional de la enzima P450_{scc} en la placenta y el ovario (Sher y col., 2007; Shih y

col., 2011). Sumado a ello, SREBP- y Oct-1 estarían regulando la expresión de ciertas moléculas esteroideogénicas como StAR (Lavoie y King, 2009) y 3 α -HSD (Penning, 1996). De igual manera, el sitio hallado en el promotor de 3 α -HSD correspondería a un sitio de potencial interacción con el factor de transcripción SREBP-. El hecho de que estos elementos actúen como reguladores de la expresión de las enzimas esteroideogénicas en otros tejidos soporta la idea de que estos sitios sensibles a metilación podrían ser sitios potencialmente regulatorios en el cerebro. En este contexto, nuestro trabajo muestra que los promotores de las enzimas esteroideogénicas P450scc, 5 α -reductasa-1 y 3 α -HSD podrían estar siendo regulados, al menos en parte, por mecanismos de metilación diferencial en el hipocampo de la rata adulta.

Estudios anteriores demostraron que el aumento progresivo de la edad tiene un importante efecto a nivel epigenético. Las alteraciones globales en los niveles de metilación del genoma parecerían ser uno de los hechos más relevantes en células y tejido envejecidos. A modo de ejemplo, Oakes y col. (2003) demostraron un aumento en el estado de metilación de los clusters de ADN ribosomal en células germinales y de hígado en ratas durante la senescencia, lo cual podría ser asociado con una disminución en la expresión de ARN y por tanto, resultaría en problemas de fertilidad y anormalidad en la progenie. Sumado a ello, la hipermetilación de Islas CpG de regiones promotoras fue reportada en numerosos genes como el RE α (Issa y col., 1994; Moreno-Piovanio y col., 2011), el IGF- 2 (Issa y col., 1996), E-caderinas y c-fos (Fraga y Esteller, 2007). Aunque muchos mecanismos han sido propuestos para explicar estos cambios en los patrones de metilación, las causas siguen siendo desconocidas. Los mismos también son observados en diversas enfermedades asociadas a la edad, como algunos tipos de tumores, la EA y otras enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes (Agrawal y col., 2010; Wierda y col., 2010). En consecuencia, las alteraciones en los estados de metilación del genoma no estarían solamente implicadas en los mecanismos básicos del envejecimiento, sino que también, constituirían un factor de riesgo para el desarrollo de patologías crónicas asociadas a la edad.

Con el objetivo de determinar cómo el aumento progresivo de la edad puede también afectar las funciones cognitivas y relacionarlo con la disminución previamente descrita en la expresión de las enzimas neuroesteroideogénicas en el hipocampo, estudiamos la performance de ratas hembra y macho en DPN 90 y DPN 450 en un test de comportamiento que permite evaluar la memoria episódica. La memoria episódica puede ser analizada considerando dos componentes, el componente temporal y el componente espacial. En el

año 2005, Dere y col. describieron por primera vez un protocolo que permitía evaluar simultáneamente en un ensayo de tres etapas la capacidad de los ratones de discernir el orden temporal en el que distintos objetos fueron presentados así como la posición espacial de los mismos, denominado “Test de memoria episódica”. Este test también fue evaluado subsecuentemente en ratas (Chao y col., 2014; Inostroza y col., 2013; Kart-Teke y col., 2006; Li y Chao, 2008); sin embargo, hasta el momento no hay estudios que describan el efecto del envejecimiento en las funciones de la memoria episódica mediante el empleo del test mencionado. Según nuestros resultados, en ratas hembra, el aumento progresivo de la edad no afectó la performance asociada al componente de memoria temporal; sin embargo, la memoria espacial se encontró afectada en ambos estadios post-natales estudiados. En ratas macho, ambos componentes se vieron alterados cuando se compararon animales en día DPN90 vs. DPN450. En relación a ello, ha sido reportado previamente que el envejecimiento produce en roedores un deterioro en la performance espacial y temporal, empleando test como el laberinto de agua de Morris y el test de reconocimiento de objetos (Bennett y col., 2006; Gallagher y Pelleymounter, 1988; Wiescholleck y col., 2014). Aunque los test de comportamiento empleados en estos trabajos son distintos a los presentados aquí, estos antecedentes apoyan la idea de que el aumento progresivo de la edad genera un deterioro cognitivo importante asociado a la memoria espacial y temporal, evaluadas de manera independiente, y por tanto imposibilita la integración de ambas (memoria episódica). También se encontraron diferencias sexuales en el comportamiento asociado a la memoria episódica. Mientras que a los 3 meses de edad los machos mantienen una buena performance en el test empleado; las hembras presentan dificultad con el componente espacial. Por otra parte, en la adultez, las ratas hembra todavía son capaces de discriminar el orden temporal en el que fueron presentados los objetos, sin embargo, no ocurre lo mismo con las ratas macho. Esto se condice con otro trabajo presentado previamente, en el cual se muestra que las hembras mantienen una mejor performance en el test de reconocimiento de objetos (discriminación de objeto novedoso y antiguo); mientras que los machos en el test de memoria espacial (objeto desplazado versus estacionario) (Sutcliffe y col., 2007). Estos resultados estarían indicando que tanto el sexo como la edad generan diferencias en la memoria episódica y esto a su vez, se encuentra acompañado por cambios en los niveles de expresión de las proteínas neuroesteroideogénicas. Considerando la implicancia de los neuroesteroides en las funciones de memoria y aprendizaje; los mismos podrían ser responsables, al menos en parte, de estas diferencias encontrada a nivel cognitivo.

En base a lo expuesto hasta aquí, proponemos que la disminución en los niveles de neuroesteroides asociada a la edad sería el resultado de cambios en la expresión de las enzimas esteroidogénicas en el hipocampo durante el desarrollo post-natal en ratas hembra. Particularmente las enzimas implicadas en la síntesis de alopregnanolona estarían siendo reguladas por un aumento en el estado de metilación de sus regiones regulatorias. Posibles tratamientos que puedan revertir dicho estado de hipermetilación y por tanto aumentar la expresión de las moléculas esteroidogénicas, podrían atenuar la disminución en los niveles de neuroesteroides promoviendo la plasticidad neuronal hipocampal.

5.2. Experimento 2. Los ambientes enriquecidos como moduladores de la esteroidogénesis hipocámpica

Hasta el momento, no hay antecedentes acerca del efecto a corto plazo de los ambientes enriquecidos sobre la esteroidogénesis hipocámpica. En este contexto y con el objetivo de determinar cómo diferentes estímulos podrían regular la expresión de los enzimas neuroesteroideogénicas, ratas hembra jóvenes adultas y adultas mayores fueron expuestas durante 10 días a dos clases de ambientes enriquecidos, uno de ellos con estimulación sensorial y el otro, con estimulación motora. En las ratas jóvenes, la estimulación sensorial generó un aumento en la expresión del ARNm de las enzimas 3α -HSD, 5α -reductasa-1 y P450(17 α) y una disminución en la expresión de la P450arom. La estimulación motora, por su parte, incrementó la expresión génica de las enzimas 3α -HSD, P450(17 α) y P450(11 β)-2. En las ratas adultas, solo la estimulación motora generó un aumento en la expresión génica de P450(11 β)-2.

Numerosos autores reportaron los efectos positivos de la corta exposición de roedores a diferentes estímulos sociales, motores y sensoriales. Bindu y col. (2007) demostraron que ratas de 2 meses de edad con lesiones subviculares ventrales bilaterales expuestas durante 10 días a un ambiente sensorialmente enriquecido son capaces de incrementar la arborización de las dendritas y la densidad de espinas sinápticas. Sumado a ello, se reportó un aumento en las funciones cognitivas y en la concentración de NGF, la supervivencia neuronal y la sinaptogénesis en el giro dentado de ratas expuestas a un ambiente con estimulación sensorial durante tres y/o seis semanas (Birch y col., 2013). Por otra parte, el ambiente enriquecido a corto plazo también se ha relacionado con un incremento en la neurogénesis adulta en modelos de ratones con diabetes tipo 1 (estimulación sensorial) (Beauquis y col., 2010) y EA (estimulación sensorial y motora) (Valero y col., 2011). Incluso se ha reportado un efecto diferencial según los tipos de estímulos ambientales empleados. A modo de ejemplo, ratones expuestos a estímulos motores durante 6 semanas mostraron una mejor performance en la memoria de trabajo que ratones mantenidos en ambientes estimulados sensorialmente (Lambert y col., 2005). En el mismo sentido, nuestros resultados muestran que en ratas jóvenes la exposición breve a distintas clases de ambientes enriquecidos produce diferentes cambios asociados a la expresión de las enzimas neuroesteroideogénicas en el hipocampo, que podrían a su vez relacionarse con alteraciones

en los niveles de determinados neuroesteroides (Cheney y col., 1995; Mukai y col., 2008; Prange-Kiel y Rune, 2006).

La corta exposición de animales adultos mayores a ambientes con estimulación motora y sensorial, en cambio, no generó modificaciones a nivel de la expresión génica de las proteínas esteroidogénicas en el hipocampo. Esto podría deberse al deterioro cognitivo asociado a la edad y la disminución de la plasticidad sináptica (Bishop y col., 2010) que se reportan en dichos animales. Basándonos en ello, decidimos evaluar el efecto del ambiente sensorialmente enriquecido a largo plazo sobre la regulación de la esteroidogénesis hipocámpica en ratas hembra adultas mayores. En este caso, la estimulación sensorial si fue capaz de incrementar la expresión de ARNm de StAR, 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1 y P450(17 α) (1.2-1.4 veces). No obstante, los niveles de ARNm de estos genes se mantuvieron significativamente menores respecto de los niveles encontrados en ratas jóvenes. En el mismo sentido, Munetsuna y col. (2011) describieron un aumento de la expresión de ARNm de las enzimas 3 α -HSD (2.8 veces) y 5 α -reductasa (1.2 veces) en el hipocampo de ratas macho de aproximadamente 4 meses de edad expuestas durante 8 semanas a un ambiente sensorialmente enriquecido. Es importante resaltar, que aún cuando el incremento en la expresión no es demasiado amplio, pequeños cambios en los niveles de ARNm de las enzimas esteroidogénicas han sido relacionados con importantes cambios en el metabolismo de esteroides. En este sentido, Higo y col. (2009) mostraron que el metabolismo de andrógenos y estrógenos fue significativamente mayor en el hipocampo de ratas macho en DPN 10 respecto de los machos en edad adulta, aunque la expresión de ARNm de ciertas enzimas implicadas como 3 β -HSD, P450arom, P450(17 α) y 17 β -HSD aumentó solamente 1.3-1.5 veces. Así, nuestros resultados sugieren que estos, pequeños pero, significativos cambios observados en la expresión génica de las moléculas esteroidogénicas en respuesta a un ambiente enriquecido a largo plazo podrían atenuar la disminución de la síntesis de neuroesteroides asociada a la edad, al menos en parte, en el hipocampo de las ratas hembra.

Diferentes estímulos ambientales pueden inducir modificaciones a nivel epigenético en genes particulares. Weaver y col. (2004) encontraron que el cuidado materno puede alterar el estado de metilación del ADN en el exón 1₇ del receptor de glucocorticoides en la cría adulta. Sumado a ello, Kuzumaki y col. (2011) demostraron que la inducción de la expresión del BDNF está correlacionada con cambios en la metilación de las histonas en el hipocampo de ratones expuestos a un ambiente enriquecido. En el mismo sentido, nuestros resultados muestran cambios en el estado de metilación del gen de la enzima 5 α -reductasa-

1 en el hipocampo de ratas jóvenes adultas y adultas mayores mantenidas en condiciones de enriquecimiento, lo cual se correlaciona con un aumento en la expresión del ARNm de dicho gen. Contrariamente, no se detectaron cambios en el estado de metilación de las enzimas 3 α -HSD, P450(17 α) y P450arom; aunque la expresión génica si se vio modificada. Sin embargo, debido a las limitaciones propias de la técnica algunos sitios potencialmente metilables CG no fueron incluidos en el análisis. Sumado a ello, es posible que la transcripción de dichos genes este regulada por otros mecanismos que no han sido incluidos en este estudio. En tal sentido, la modificación de las histonas ha sido asociada con la represión y activación transcripcional de genes implicados en la síntesis y acción de las hormonas esteroides (Martinez-Arguelles y Papadopoulos, 2010). Por otra parte, algunos autores han analizado la importancia de ciertos factores de transcripción en la regulación de la expresión del ARNm de 3 α -HSD, P450(17 α) y P450arom. A modo de ejemplo, Penning (1996) mostró que los elementos de respuesta a glucocorticoides y el factor de transcripción Oct-1 actúan como reguladores positivos y negativos de la transcripción del gen 3 α -HSD, respectivamente. Sumado a ello, otros factores como SF-1 y GATA han sido implicados en la regulación transcripcional de P450arom y P450(17 α).

Complementariamente y para determinar el efecto de los distintos tipos de estímulos sobre las funciones neurotróficas y sinápticas, evaluamos la expresión de marcadores específicos en ratas sometidas a enriquecimiento social, sensorial y/o motor. Según nuestros resultados, la estimulación sensorial a corto plazo generó un aumento en la expresión de las proteínas sinápticas Syp y espinofilina y el factor neurotrófico BDNF en animales jóvenes adultos, sugiriendo una posible activación en las funciones mencionadas. En el mismo sentido, estudios previos han mostrado cambios en los niveles de expresión del BDNF y Syp tras la exposición a determinados estímulos ambientales. Ratas expuestas, desde los 2 meses de edad y hasta los 12, a ambientes enriquecidos han aumentado los niveles de ARNm de BDNF en corteza cerebral e hipocampo (Ickes y col., 2000). En el mismo sentido, los niveles de Syp se encontraron aumentados en el hipocampo y neocorteza de ratones hembra expuestos a estímulos cognitivos y motores, de manera independiente, durante 6 semanas (Lambert y col., 2005). En nuestro caso, sólo el ambiente sensorialmente enriquecido de corto plazo generó cambios importantes en la expresión génica de los factores estudiados en ratas jóvenes. El hecho de que el mismo efecto no se haya observado en ratas adultas podría estar asociado al deterioro de la plasticidad hipocampal observada en dichos animales. Podría ser posible que animales adultos requieran un mayor estímulo, dado por ejemplo por un mayor tiempo de exposición (superior a los 105 días), que las ratas jóvenes.

En el mismo sentido, la estimulación motora tampoco fue capaz de incrementar la expresión de estos genes, apoyando la idea de que ambos estímulos (sensorial y motor) tienen un efecto diferencial a nivel de cerebro. Resulta interesante de todos modos que el aumento observado en la expresión de BDNF, Syp y espinofilina frente a estímulos sensoriales esté correlacionado con una mayor expresión de las enzimas neuroesteroidogénicas que se encuentran implicadas en la síntesis de alopregnanolona y DHEA. En consecuencia, no podríamos descartar que dichos neuroesteroides pudieran ser los responsables de inducir los cambios observados en la expresión de los genes hipocampales estudiados. En el mismo sentido, estudios previos han demostrado que la expresión de BDNF en el hipocampo de roedores es modificada por los niveles sistémicos de algunas hormonas esteroides como los corticosteroides (Hansson y col., 2006), la progesterona (Younan y col., 2012), el E2 (Moreno-Piovano y col., 2014) y la DHEA (Sakr y col., 2014). El E2 también ha mostrado afectar los niveles de expresión hipocampales de Syp y espinofilina (Frick y col., 2002; Lee y col., 2004).

La importancia de la alopregnanolona sobre las funciones neuronales ha sido ampliamente demostrada. Ratas jóvenes, en las cuales se detectan niveles elevados de alopregnanolona en la corteza (ratas en proestro o preñez tardía) exhibieron mejor performance en el reconocimiento de objetos novedosos respecto de ratas en diestro (Frye, 2009). En el mismo sentido, Escudero y col. (2012) observaron que el tratamiento de ratas ovariectomizadas con E2 o E2 y progesterona tiene efectos amnésicos; mientras que la alopregnanolona es capaz de revertir dicho efecto, sugiriendo que la misma tiene efectos beneficiosos que incluyen la activación de las funciones cognitivas en el hipocampo. Por otra parte, Wang y col. (2010) demostraron que la alopregnanolona revierte los déficits cognitivos y neurogénicos en modelos de ratones con la EA. En el mismo sentido, Singh y col. (2012) reportaron que la alopregnanolona promueve la supervivencia de nuevas células y restaura las funciones cognitivas en ratones adultos. Por su parte, los niveles de DHEA han sido asociados con desórdenes de comportamiento y ansiedad y con el deterioro cognitivo. La DHEA sulfatada también ha sido recientemente relacionada como una mejor habilidad cognitiva en lo que respecta a las funciones ejecutoras, la concentración y la memoria de trabajo. Sumado a ello, numerosos autores han reportado los efectos beneficiosos de la DHEA a nivel pre- y post- sinapsis (Pluchino y col., 2015), sugiriendo un rol fundamental en las funciones neuronales. En el mismo sentido, ha sido reportado que la DHEA promueve la elongación de los axones en neuronas neocorticales de embrión de ratón y la formación de espinas dendríticas en neuronas de rata (Charalampopoulos y col.,

2008). En base a nuestros resultados y a los antecedentes hasta aquí expuestos, proponemos que las mejoras en las funciones de memoria y aprendizaje inducidas por el ambiente enriquecido podrían estar mediadas, al menos en parte, por un aumento en la expresión del ARNm de ciertas enzimas implicadas en la síntesis de alopregnanolona y DHEA. Particularmente, en el caso de la enzima 5 α -reductasa-1 estos cambios estarían mediados por mecanismos de metilación diferencial. Esto permitiría mantener los niveles adecuados de neuroesteroides, promoviendo la plasticidad neuronal hipocampal y previniendo la aparición de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad.

5.3. Experimento 3. La experiencia materna como moduladora de la esteroidogénesis hipocámpica

Para determinar el efecto de la experiencia materna sobre la regulación de la esteroidogénesis hipocámpica, ratas hembra adultas mayores expuestas a 3 preñeces sucesivas con y sin sus respectivas lactancias fueron comparadas con ratas vírgenes de la misma edad. Según nuestros resultados, las hembras multíparas de ambos grupos (HA.M+L y HA.M-L) mostraron un aumento en la transcripción de las enzimas P450scc y 5 α -reductasa-1, en comparación con el grupo de hembras nulíparas. La enzima P450scc está implicada en el primer paso de la síntesis de esteroides y por lo tanto es la enzima limitante; la 5 α -reductasa-1, por su parte, está asociada a la síntesis de alopregnanolona. Por otra parte, la expresión de las enzimas P450arom y P450(11 β)-2, las cuales están implicadas en la síntesis de E2 y corticosterona respectivamente, se encuentra aumentada en el grupo HAM+L y disminuida en HA.M-L comparada con las ratas nulíparas. Los niveles de ARNm de P450scc, P450arom y P450(11 β)-2 también se encuentran aumentados en el grupo HA.M+L comparado con HA.M-L y más aún, el grupo HAM+L fue capaz de revertir la caída de expresión génica asociada a la edad de la enzima P450(11 β)-2. Es importante resaltar que, aunque la remoción de las crías en DPN 0 en el grupo HA.M-L podría resultar en un situación de estrés para la madre, es el único modelo descripto para estudiar la preñez como un evento particular aislado de la lactancia (Neville y col., 2002).

La experiencia materna genera diferentes cambios a nivel fisiológico y conductual. Uno de los puntos más importantes del período reproductivo es el cambio en el perfil hormonal materno (Neville y col., 2002). El E2 y la progesterona están principalmente involucrados en la preñez. En ratas adultas, los niveles de E2 comienzan a aumentar en el día de preñez 14 (40 pg /ml suero) y continúan aumentando hasta el día de preñez 22 (60 pg /ml suero) (Taya y Greenwald, 1981). En cuanto a la progesterona, los niveles llegan a su primer pico máximo en día de preñez 6 (alcanzando los 70 ng /ml suero) y comienzan a aumentar en día 12 hasta el segundo pico en día 16 (100 ng /ml suero) (Taya y Greenwald, 1981) . La oxitocina y la prolactina son las hormonas más importantes durante el período de lactancia. Los niveles séricos de oxitocina aumentan significativamente durante la expulsión de los fetos, y aunque luego disminuyen gradualmente, se mantienen relativamente altos (Higuchi y col., 1985). La prolactina plasmática comienza a aumentar en el día de preñez 22 hasta

alcanzar niveles de aproximadamente 29.2 ng /ml suero; en DPN 1 los niveles aumentan hacia 65.5 ng/ml suero y se mantienen hasta DPN 15, momento en el cual comienza a disminuir gradualmente (Amenomori y col., 1970). Numerosos son los estudios que avalan los efectos beneficiosos de las hormonas esteroides sobre la viabilidad y el funcionamiento neuronal y sobre los procesos de memoria y aprendizaje (Schumacher y col., 2003). Incluso, se han resaltado las funciones neuroprotectoras de otras hormonas implicadas como la oxitocina y la prolactina. En este sentido, diferentes autores han sugerido que los altos niveles hormonales a los cuales están expuestos los animales durante la reproducción podrían explicar los efectos beneficiosos observados a nivel cerebral y por tanto, la preñez y la lactancia podrían considerarse un modelo natural de protección.

Algunos trabajos han reportado la correlación entre las hormonas esteroides y la regulación en la neurosteroidogénesis. En roedores, el aumento de los niveles séricos de E2, progesterona y alopregnanolona durante ciertos días del ciclo estral fue correlacionado con un aumento en los niveles de los mismos esteroides en el hipocampo (Frye y col., 2000; Kato y col., 2013). Sin embargo, no se reportaron cambios de expresión de ARNm de las enzimas 17 β -HSD-1, 17 β -HSD-3, P450(17 α), P450arom, 5 α -reductasa-1, 5 α -reductasa-2 y StAR (Hojo y col., 2014; Kato y col., 2013). En el mismo sentido, Bixo y col. (1997) mostraron un incremento en los niveles cerebrales de progesterona, 5 α -dihidroprogesterona y alopregnanolona en mujeres fértiles comparados con mujeres post-menopáusicas. En ratas ovariectomizadas y adrenalectomizadas, el tratamiento con E2 incrementó los niveles de ARNm y la actividad de la 3 β -HSD y los niveles de progesterona en el hipotálamo (Soma y col., 2005). Sumado a ello, las hormonas ováricas regulan la actividad de la enzima 3 α -HSD en la eminencia media (Bertics y col., 1987) y particularmente el E2 incrementa los niveles de expresión de dicha enzima en el hipocampo (Mitev y col., 2003). Por su parte, Sanchez y col. (2008) demostraron que los niveles de ARNm de ambas isoformas de la 5 α -reductasa aumentaron en el cerebro de ratas hembra y macho mediante la administración de sulpiride, directamente o mediante la hiperprolactinemia. En este contexto, es posible que los cambios previamente descriptos en los niveles de las hormonas reproductivas durante los períodos de preñez y/o lactancia regulen la expresión de las enzimas neurosteroidogénicas P450scc, 5 α -reductasa-1, P450arom y P450(11 β)-2 en el hipocampo de rata.

El E2 y la progesterona, así como la oxitocina y la prolactina, también juegan un rol fundamental en el desarrollo de la conducta materna (Bridges, 1984; Carter, 2003; Grattan y col., 2001). La interacción entre la madre y sus crías (cuidado, alimentación y protección)

durante el parto y la lactancia es también un complejo e importante estímulo. De hecho, Kinsley y Lambert (2008) sugirieron que la interacción entre las hormonas reproductivas y la exposición post-parto de las crías estarían generando una clase de “ambiente enriquecido” y esta combinación sería la responsable del mejoramiento de las funciones de memoria y aprendizaje observado en la madre. Esta comparación del nicho materno con un “ambiente enriquecido” se hace considerando a este ambiente como una combinación compleja de estímulos sociales, sensoriales y motores (Lambert y col., 2005), los mismos observados durante la interacción madre-crías. Recientemente, la relación entre dichos estímulos y la esteroidogénesis hipocampal ha sido descrita (Munetsuna y col., 2011). En el mismo sentido, hemos reportado en la sección anterior que los estímulos sensoriales y motores producen cambios en la expresión de las enzimas neuroesteroídicas. En base a ello, proponemos que el “ambiente enriquecido” generado por las exposiciones sucesivas a niveles elevados de distintas hormonas asociadas a la preñez y a la lactancia y la interacción de la madre con las crías estaría afectando la expresión de los genes esteroidogénicos en el hipocampo de la rata. La correlación entre los cambios de expresión de estos genes y los niveles de esteroides en el cerebro de rata fue previamente descrita por diferentes autores (Cheney y col., 1995; Dong y col., 2001; Mukai y col., 2008; Prange-Kiel y Rune, 2006), aún cuando las diferencias en los niveles de expresión génica no resultaron altas (Higo y col., 2009). En este sentido, es posible que los cambios hallados en los niveles de ARNm de las enzimas en el hipocampo de ratas multíparas estén relacionados con alteraciones en la síntesis de los esteroides alopregnanolona, E2 y corticosterona, en dicha región.

El neuroesteroide alopregnanolona ha sido particularmente estudiado durante la reproducción. El apareamiento induce la síntesis de alopregnanolona en el cerebro medio y en el hipocampo; de hecho, la administración de alopregnanolona en el cerebro incrementa la lordosis en roedores (Frye, 2009). Durante la preñez, la alopregnanolona aumenta hasta sus niveles máximos en día 19-20 y disminuye antes del parto en el cerebro de rata (Frye y col., 2011). Sumado a ello, ha sido descrito un incremento en la actividad hipotalámica de la 5 α -reductasa, en la expresión del ARNm de dicha enzima en el tronco cerebral y en la transcripción de la enzima 3 α -HSD en el núcleo paraventricular (Brunton, 2015). Brunton y col. (2008) propusieron que la respuesta del eje Hipotalámico-Pituitaria-Adrenal durante un estadio tardío de preñez es desencadenada por la alopregnanolona y la atenuación de dicho eje en respuesta a diferentes estresores es el que provee una primera línea de defensa para proteger al feto de alguna situación adversa, pero también estaría implicado en las

adaptaciones del sistema inmune y el re-balance metabólico. Sumado a ello, los niveles de alopregnanolona también aumentan en el cerebro fetal, donde promueve el desarrollo y la neuroprotección. Como ejemplo, la alopregnanolona juega un rol fundamental en reducir el impacto de hipoxia, la cual puede ser experimentada durante un nacimiento difícil y resulta en el daño cerebral excitotóxico (Brunton y col., 2014). Basado en ello, proponemos que sucesivas experiencias reproductivas estarían incrementando los niveles de alopregnanolona en el hipocampo de rata mediante la activación transcripcional de la enzima 5 α -reductasa-1 y dicho efecto podría persistir incluso después de un período de tiempo determinado luego del último evento reproductivo.

Numerosos autores han descripto los efectos beneficiosos de la lactancia en diferentes modelos animales. A modo de ejemplo, Yang y col. (1999) encontraron una disminución en el número de carcinomas mamarios inducidos por N-metil-N-nitrosourea asociada a la lactancia en ratas. En el mismo sentido, Russo y Russo (1980) demostraron que la preñez y la lactancia disminuyen la susceptibilidad de la glándula mamaria a desarrollar cáncer asociado a 7,12-dimetilbenz(a)antraceno en la rata y a pesar de que la lactancia no se requiere para una protección completa, los animales que no han dado de lactar son más propensos a desarrollar tumores benignos. Sumado a ello, se ha descripto la lactancia como un modelo natural de neuroprotección ya que previene el daño celular crónico y agudo del hipocampo inducido por excitotoxicidad (Morales, 2011; Vanoye-Carlo y col., 2008). También han sido descripto cambios en la arquitectura dendrítica (Kinsley y col., 2006; Pawluski y Galea, 2006), la plasticidad sináptica (Tomizawa y col., 2003) y la proliferación celular (Leuner y col., 2007) en el hipocampo. En el mismo sentido, encontramos que la lactancia es necesaria para la activación transcripcional de las principales enzimas implicadas en la síntesis de E2 y corticosterona y exacerba el efecto de la preñez incrementando la expresión de ARNm de la enzima asociada a la síntesis de alopregnanolona en el hipocampo de la rata. Sumado a ello, la lactancia aumentó la expresión génica de los factores BDNF, Syp y espinofilina, sugiriendo que la misma también resultaría crítica para las mejoras de las funciones sinápticas y neurotróficas. Como señalamos en la sección 5.2., tanto los cambios en los niveles sistémicos de los esteroides como los estímulos sensoriales y motores pueden modificar la expresión de BDNF, Syp y/o espinofilina en el hipocampo de roedores. Basándonos en ello, el cambio de expresión en los marcadores mencionados en el grupo HA.M+L podría explicarse considerando el aumento descripto de la expresión de las enzimas neuroesteroideogénicas, que podrían implicar cambios en la síntesis de alopregnanolona, E2 y corticosteroides en el cerebro, y el

“ambiente enriquecido materno” generado por el aumento en los niveles de las hormonas reproductivas y la interacción madre-crías.

Algunos autores han descripto que diferentes estímulos como un ambiente enriquecido y un ambiente materno adecuado modifican el estado de metilación de ciertos genes implicados en la síntesis o acción de los esteroides (Kuzumaki y col., 2011; Weaver y col., 2004). En el mismo sentido, en este trabajo reportamos previamente cambios en los niveles de metilación de la enzima 5 α -reductasa-1 en el hipocampo de la rata hembra asociados a un ambiente estimulado sensorialmente. De igual manera, encontramos que sucesivas experiencias reproductivas generan cambios en los patrones de metilación de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1 y P450arom en el hipocampo y estos cambios se correlacionan con alteraciones en la expresión de los ARNm. Los niveles de metilación del gen correspondiente a la enzima 5 α -reductasa-1 se vieron disminuidos en los grupos HA.M+L y HA.M-L, aunque los sitios regulatorios afectados fueron distintos. Lo que resulta aún más interesante es el hecho de que estos sitios también resultaron afectados por el envejecimiento y el ambiente enriquecido. En todos los casos, los cambios en los niveles de metilación se relacionaron con diferencias de expresión génica, sugiriendo a estos sitios como sitios de regulación de la transcripción. La preñez, por su parte, también generó cambios en el patrón de metilación de los promotores de las enzimas P450scc y P450arom. El sitio correspondiente a la enzima P450scc es un potencial sitio de unión a los factores de transcripción SREBP-, Oct-1 y GATA-1, que también presentó cambios en los niveles de metilación asociados al envejecimiento. Por otra parte, el sitio correspondiente al promotor de la enzima P450arom se corresponde con una secuencia CLS (Stocco, 2008). Como mencionamos en la Introducción, esta región puede ser reconocida por CREB y por Cebp. La mutación de este elemento produce una importante disminución de la actividad promotora inducida por cAMP, lo cual sugiere que este sitio juega un rol fundamental en la activación de transcripción de dicho gen (Fitzpatrick y Richards, 1994; Michael y col., 1997). De esta manera, la hipermetilación de este sitio podría estar disminuyendo la expresión de la P450arom en el hipocampo de las ratas multíparas. Apoyando estos resultados, Vanselow y col. (2005) previamente demostraron que el promotor 2 de la P450arom está regulado por mecanismos de metilación en el cuerpo lúteo y las células de la granulosa en bovinos.

Contrariamente, en el gen correspondiente a la enzima P450(11 β)-2 no se detectaron cambios en el estado de metilación. Debido a las limitaciones de la técnica algunos sitios CG no pudieron ser incluidos en el análisis, sumado al hecho de que otros mecanismos de

regulación epigenéticos, como la modificación de las histonas, podrían estar afectando los niveles de expresión (Martínez-Argüelles y Papadopoulos, 2010). En el mismo sentido, algunos autores también han evaluado la función de ciertos factores de transcripción implicados en la regulación de dicho gen. En humanos, por ejemplo, un elemento de respuesta a cAMP, denominado Ad5, fue identificado como un importante elemento en cis. Ad5 es capaz de unirse a los factores de activación transcripcional, ATF-1, ATF-2, y a CREB. La habilidad de estos factores para activar la transcripción depende de su estado de fosforilación (Bassett y col., 2004). SF-1 es otro factor implicado en la regulación de la transcripción del gen P450(11 β)-2 humano, mediante la unión al elemento Ad4. Ambos sitios, Ad4 y Ad5, fueron también descritos en rata (Bassett y col., 2004).

Los neuroesteroides juegan un rol fundamental en las funciones del cerebro. El E2 incrementa la supervivencia y recuperación neuronal y promueve la neurogénesis en animales adultos; es esencial para la plasticidad sináptica y ha sido asociado con el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas (Rune y Frotscher, 2005; Schumacher y col., 2003). Por su parte, la alopregnanolona previene el deterioro cognitivo en ratas (Escudero y col., 2012), promueve la proliferación de progenitores neuronales (Wang et al., 2005) e inhibe la apoptosis celular (Yawno y col., 2009). La alopregnanolona también promueve la supervivencia celular y restablece las funciones cognitivas en modelos animales de envejecimiento y en modelos transgénicos de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Singh y col., 2012). La corticosterona como un neuroesteroide ha sido mucho menos estudiada que el E2 y la alopregnanolona. Los niveles plasmáticos de corticosterona han sido asociados a los procesos de estrés y de ansiedad (Komatsuzaki y col., 2012) y diferentes efectos positivos y negativos han sido descritos en el cerebro de roedores. Resulta interesante resaltar que los glucocorticoides están implicados en la formación de la memoria (Lupien y Lepage, 2001) y algunos autores han reportado que los corticosteroides activan la consolidación de la misma en el hipocampo de roedores (Cottrell y Nakajima, 1977; Kelemen y col., 2014; Micheau y col., 1984). En este contexto, proponemos que las mejoras en las funciones neuronales y cognitivas asociadas a la preñez y a la lactancia podrían estar mediadas, al menos en parte, por mecanismos de metilación/demetilación, que estaría produciendo cambios en los niveles de ARNm de las diferentes enzimas implicadas en la síntesis de alopregnanolona, E2 y corticosterona en el hipocampo.

6. CONCLUSIONES

“Dime como vives y te diré como envejeces”

Anónimo

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

- ✓ **El aumento progresivo de la edad afecta negativamente la performance cognitiva asociada a la memoria episódica y modifica la transcripción de los genes implicados en la síntesis de neuroesteroides, aumentando los niveles de metilación de ciertos promotores.** Particularmente, produce una disminución en la expresión de ARNm de StAR, P450scc, 5 α -reductasa-1, 3 α -HSD, 3 β -HSD, P450(11 β)-2, P450(17 α), P450arom y 17 β -HSD-3 en el hipocampo de ratas hembra, pero no de ratas macho. Dicho envejecimiento, a su vez, se ve acompañado por el aumento en el estado de metilación de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa y 3 α -HSD, las cuales se encuentran implicadas en la síntesis de alopregnanolona. Sumado a ello, existen dimorfismos sexuales relacionados con la expresión génica de las proteínas neuroesteroidogénicas.

- ✓ **La exposición breve a ambientes con estimulación sensorial y motora modifica de manera diferencial la expresión de las moléculas neuroesteroidogénicas, factores neurotróficos y proteínas sinápticas en el hipocampo de la rata hembra joven y adulta. Sumado a ello, la exposición prolongada a un ambiente sensorialmente enriquecido atenúa la disminución de la expresión de ciertas moléculas esteroidogénicas en animales adultos. Tanto en ratas jóvenes como adultas, el ambiente enriquecido genera cambios en los patrones de metilación.** En la rata hembra joven, la estimulación sensorial generó un aumento en la expresión del ARNm de las enzimas 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1 y P450(17 α) y una disminución de P450arom. Sumado a ello, disminuyó el estado de metilación del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1 y aumentó la expresión de los genes BDNF, Syp y espinofilina. La estimulación motora, por su parte, incrementó la expresión génica de las enzimas 3 α -HSD, P450(17 α) y P450(11 β)-2. En la rata adulta, sólo se verificó un aumento en la expresión de P450(11 β)-2. La estimulación sensorial prolongada fue capaz de atenuar la caída en la transcripción de ciertas enzimas neuroesteroidogénicas, incrementando la expresión de ARNm de StAR, 3 α -HSD, 5 α -reductasa-1 y P450(17 α) en ratas adultas. Además, disminuyó el estado de metilación del promotor de la enzima 5 α -reductasa-1. Sin embargo, no se detectaron cambios de expresión en los factores neurotróficos y las proteínas sinápticas.

- ✓ **La experiencia materna afecta la transcripción de las enzimas neuroesteroidogénicas, modificando el estado de metilación de ciertos promotores implicados, e incrementa la expresión de factores neurotróficos y sinápticos en las ratas adultas.** La combinación de preñez y lactancia generó un aumento en la expresión de ARNm de las enzimas P450scc, 5 α -reductasa-1, P450arom y P450(11 β)-2 y una disminución en el estado de metilación de la enzima 5 α -reductasa-1. Sumado a ello, incrementó la expresión génica del BDNF, Syp y espinofilina. La preñez en ausencia de lactancia también fue capaz de aumentar la transcripción de P450scc y 5 α -reductasa-1; pero produjo una disminución de P450arom y P450 (β 11)-2. Sumado a ello, la preñez disminuyó el estado de metilación de los sitios estudiados de los promotores de las enzimas P450scc y 5 α -reductasa-1; pero aumento el de la P450arom.

Los resultados obtenidos en esta tesis intentan contribuir al conocimiento de los factores fisiológicos que modulan la acción neuroesteroidogénica en una importante estructura del cerebro relacionada con la memoria: el hipocampo. De manera especial analizamos de qué manera la edad (en ambos sexos), el ambiente enriquecido y la experiencia materna pueden modificar la capacidad transcripcional de las vías esteroidogénicas en el hipocampo y si lo hacen a través de modificaciones epigenéticas como los mecanismos diferenciales de metilación del ADN. Estos hallazgos contribuyen con el estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos negativos asociados al envejecimiento y el rol de los tratamientos conductuales como factores atenuantes de dichos efectos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addis, D.R.; Wong, A.T. y Schacter, D.L. (2007). Remembering the past and imagining the future: common and distinct neural substrates during event construction and elaboration. *Neuropsychologia*. 45: 1363-1377.
- Agis-Balboa, R.C.; Pinna, G.; Pibiri, F.; Kadriu, B.; Costa, E. y Guidotti, A. (2007). Down-regulation of neurosteroid biosynthesis in corticolimbic circuits mediates social isolation-induced behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 18736-18741.
- Agrawal, A.; Tay, J.; Yang, G.E.; Agrawal, S. y Gupta, S. (2010). Age-associated epigenetic modifications in human DNA increase its immunogenicity. *Aging*. 2: 93-100.
- Amaral, D. y Witter, M. (1995). Hippocampal Formation. En *The rat Nervous System* G. Paxinos, ed. (Sydney, Australia: Academic Press), pp. 443-493.
- Amenomori, Y.; Chen, C.L. y Meites, J. (1970). Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. *Endocrinology*. 86: 506-510.
- Antequera, F. y Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 11995-11999.
- Azcoitia, I.; Leonelli, E.; Magnaghi, V.; Veiga, S.; Garcia-Segura, L.M. y Melcangi, R.C. (2003). Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiology of aging*. 24: 853-860.
- Barnes, C.A. (1988). Aging and the physiology of spatial memory. *Neurobiology of aging*. 9: 563-568.
- Bassett, M.H.; White, P.C. y Rainey, W.E. (2004). The regulation of aldosterone synthase expression. *Molecular and cellular endocrinology*. 217: 67-74.
- Bassett, M.H.; Zhang, Y.; White, P.C. y Rainey, W.E. (2000). Regulation of human CYP11B2 and CYP11B1: comparing the role of the common CRE/Ad1 element. *Endocrine research*. 26: 941-951.
- Battaglia, F.P. y Pennartz, C.M. (2011). The construction of semantic memory: grammar-based representations learned from relational episodic information. *Frontiers in computational neuroscience*. 5: 36.
- Beauquis, J.; Roig, P.; De Nicola, A.F. y Saravia, F. (2010). Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PloS one*. 5: e13993.

- Bellantoni, M.F.; Vittone, J.; Campfield, A.T.; Bass, K.M.; Harman, S.M. y Blackman, M.R. (1996). Effects of oral versus transdermal estrogen on the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in younger and older postmenopausal women: a clinical research center study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 81: 2848-2853.
- Bennett, J.C.; McRae, P.A.; Levy, L.J. y Frick, K.M. (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiology of learning and memory*. 85: 139-152.
- Bertics, S.J.; Bertics, P.J.; Clarke, J.L. y Karavolas, H.J. (1987). Distribution and ovarian control of progestin-metabolizing enzymes in various rat hypothalamic regions. *Journal of steroid biochemistry*. 26: 321-328.
- Biagini, G.; Longo, D.; Baldelli, E.; Zoli, M.; Rogawski, M.A.; Bertazzoni, G. y Avoli, M. (2009). Neurosteroids and epileptogenesis in the pilocarpine model: evidence for a relationship between P450_{scc} induction and length of the latent period. *Epilepsia*. 50 Suppl 1: 53-58.
- Binder, D.K. y Scharfman, H.E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 22: 123-131.
- Bindu, B.; Alladi, P.A.; Mansooralikhan, B.M.; Srikumar, B.N.; Raju, T.R. y Kutty, B.M. (2007). Short-term exposure to an enriched environment enhances dendritic branching but not brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of rats with ventral subicular lesions. *Neuroscience*. 144: 412-423.
- Birch, A.M.; McGarry, N.B. y Kelly, A.M. (2013). Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*. 23: 437-450.
- Birnie, M.; Morrison, R.; Camara, R. y Strauss, K.I. (2013). Temporal changes of cytochrome P450 (Cyp) and eicosanoid-related gene expression in the rat brain after traumatic brain injury. *BMC genomics*. 14: 303.
- Bishop, N.A.; Lu, T. y Yankner, B.A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 464: 529-535.
- Bixo, M.; Andersson, A.; Winblad, B.; Purdy, R.H. y Backstrom, T. (1997). Progesterone, 5alpha-pregnane-3,20-dione and 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *Brain research*. 764: 173-178.

- Blanchard, Y.; Seenundun, S. y Robaire, B. (2007). The promoter of the rat 5alpha-reductase type 1 gene is bidirectional and Sp1-dependent. *Molecular and cellular endocrinology*. 264: 171-183.
- Bologa, L.; Sharma, J. y Roberts, E. (1987). Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures. *Journal of neuroscience research*. 17: 225-234.
- Bridges, R.S. (1984). A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology*. 114: 930-940.
- Brinton, R.D. (2001). Cellular and molecular mechanisms of estrogen regulation of memory function and neuroprotection against Alzheimer's disease: recent insights and remaining challenges. *Learn Mem*. 8: 121-133.
- Brinton, R.D. (2013). Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nature reviews. Endocrinology*. 9: 241-250.
- Bruce, S.; Hannula-Jouppi, K.; Lindgren, C.M.; Lipsanen-Nyman, M. y Kere, J. (2008). Restriction site-specific methylation studies of imprinted genes with quantitative real-time PCR. *Clinical chemistry*. 54: 491-499.
- Brunton, P.J. (2015). Neuroactive steroids and stress axis regulation: Pregnancy and beyond. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
- Brunton, P.J.; Russell, J.A. y Douglas, A.J. (2008). Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *Journal of neuroendocrinology*. 20: 764-776.
- Brunton, P.J.; Russell, J.A. y Hirst, J.J. (2014). Allopregnanolone in the brain: protecting pregnancy and birth outcomes. *Progress in neurobiology*. 113: 106-136.
- Calhoun, M.E.; Fletcher, B.R.; Yi, S.; Zentko, D.C.; Gallagher, M. y Rapp, P.R. (2008). Age-related spatial learning impairment is unrelated to spinophilin immunoreactive spine number and protein levels in rat hippocampus. *Neurobiology of aging*. 29: 1256-1264.
- Cardounel, A.; Regelson, W. y Kalimi, M. (1999). Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. *Proc Soc Exp Biol Med*. 222: 145-149.
- Carter, C.S. (2003). Developmental consequences of oxytocin. *Physiology & behavior*. 79: 383-397.
- Caruso, D.; Pesaresi, M.; Abbiati, F.; Calabrese, D.; Giatti, S.; Garcia-Segura, L.M. y Melcangi, R.C. (2013). Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive

- steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 38: 2278-2290.
- Cikos, S.; Bukovska, A. y Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC molecular biology*. 8: 113.
- Clark, S.J. y Melki, J. (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*. 21: 5380-5387.
- Clyne, C.D.; Zhang, Y.; Slutsker, L.; Mathis, J.M.; White, P.C. y Rainey, W.E. (1997). Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Mol Endocrinol*. 11: 638-649.
- Compagnone, N.A.; Bulfone, A.; Rubenstein, J.L. y Mellon, S.H. (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology*. 136: 2689-2696.
- Compagnone, N.A. y Mellon, S.H. (1998). Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 4678-4683.
- Compagnone, N.A. y Mellon, S.H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*. 21: 1-56.
- Condon, J.C.; Pezzi, V.; Drummond, B.M.; Yin, S. y Rainey, W.E. (2002). Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology*. 143: 3651-3657.
- Conn, P.M. (2006). Age-related changes in hormones and their receptors. En *Handbook of Models for Human Aging* P.M. Conn, ed. (San Diego, California, Estados Unidos de Norteamérica: Elsevier), p. 537.
- Cottrell, G.A. y Nakajima, S. (1977). Effect of corticosteroids in the hippocampus on passive avoidance behavior in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 7: 277-280.
- Croll, S.D.; Ip, N.Y.; Lindsay, R.M. y Wiegand, S.J. (1998). Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain research*. 812: 200-208.
- Crowley, W.F., Jr.; Filicori, M.; Spratt, D.I. y Santoro, N.F. (1985). The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent progress in hormone research*. 41: 473-531.
- Chao, O.Y.; Nikolaus, S.; Huston, J.P. y de Souza Silva, M.A. (2014). The neurokinin-3 receptor agonist senktide facilitates the integration of memories for object, place and

- temporal order into episodic memory. *Neurobiology of learning and memory*. 114: 178-185.
- Charalampopoulos, I.; Alexaki, V.I.; Tsatsanis, C.; Minas, V.; Dermitzaki, E.; Lasaridis, I.; Vardouli, L.; Stournaras, C.; Margioris, A.N.; Castanas, E. y col. (2006). Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1088: 139-152.
- Charalampopoulos, I.; Remboutsika, E.; Margioris, A.N. y Gravanis, A. (2008). Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 19: 300-307.
- Cheney, D.L.; Uzunov, D.; Costa, E. y Guidotti, A. (1995). Gas chromatographic-mass fragmentographic quantitation of 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one (allopregnanolone) and its precursors in blood and brain of adrenalectomized and castrated rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 15: 4641-4650.
- Cheng, L.C.; Pai, T.W. y Li, L.A. (2012). Regulation of human CYP11B1 and CYP11B2 promoters by transposable elements and conserved cis elements. *Steroids*. 77: 100-109.
- Chia, W.J.; Jenner, A.M.; Farooqui, A.A. y Ong, W.Y. (2008). Changes in cytochrome P450 side chain cleavage expression in the rat hippocampus after kainate injury. *Experimental brain research*. 186: 143-149.
- Chung, B.C.; Matteson, K.J.; Voutilainen, R.; Mohandas, T.K. y Miller, W.L. (1986). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83: 8962-8966.
- Dalla Valle, L.; Vianello, S.; Belvedere, P. y Colombo, L. (2002). Rat cytochrome P450c17 gene transcription is initiated at different start sites in extraglandular and glandular tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 82: 377-384.
- Dere, E.; Huston, J.P. y De Souza Silva, M.A. (2005). Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain research. Brain research protocols*. 16: 10-19.
- Dere, E.; Pause, B.M. y Pietrowsky, R. (2010). Emotion and episodic memory in neuropsychiatric disorders. *Behavioural brain research*. 215: 162-171.
- di Michele, F.; Longone, P.; Romeo, E.; Lucchetti, S.; Brusa, L.; Pierantozzi, M.; Bassi, A.; Bernardi, G. y Stanzione, P. (2003). Decreased plasma and cerebrospinal fluid content of neuroactive steroids in Parkinson's disease. *Neurological sciences : official journal of the*

- Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology. 24: 172-173.
- Do Rego, J.L.; Seong, J.Y.; Burel, D.; Leprince, J.; Luu-The, V.; Tsutsui, K.; Tonon, M.C.; Pelletier, G. y Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in neuroendocrinology*. 30: 259-301.
- Dong, E.; Matsumoto, K.; Uzunova, V.; Sugaya, I.; Takahata, H.; Nomura, H.; Watanabe, H.; Costa, E. y Guidotti, A. (2001). Brain 5alpha-dihydroprogesterone and allopregnanolone synthesis in a mouse model of protracted social isolation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 2849-2854.
- Escudero, C.; Casas, S.; Giuliani, F.; Bazzocchini, V.; Garcia, S.; Yunes, R. y Cabrera, R. (2012). Allopregnanolone prevents memory impairment: effect on mRNA expression and enzymatic activity of hippocampal 3-alpha hydroxysteroid oxidoreductase. *Brain research bulletin*. 87: 280-285.
- Feng, J.; Yan, Z.; Ferreira, A.; Tomizawa, K.; Liauw, J.A.; Zhuo, M.; Allen, P.B.; Ouimet, C.C. y Greengard, P. (2000). Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 9287-9292.
- Fitzpatrick, S.L. y Richards, J.S. (1994). Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *Mol Endocrinol*. 8: 1309-1319.
- Flood, J.F. y Roberts, E. (1988). Dehydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice. *Brain research*. 448: 178-181.
- Fraga, M.F. y Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in genetics : TIG*. 23: 413-418.
- Franssen, R.A.; Rzucidlo, A.M.; Franssen, C.L.; Hampton, J.E.; Benkovic, S.A., Jr.; Bardi, M.; Kinsley, C.H. y Lambert, K.G. (2012). Reproductive experience facilitates recovery from kainic acid-induced neural insult in female Long-Evans rats. *Brain research*. 1454: 80-89.
- Frick, K.M. (2009). Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Hormones and behavior*. 55: 2-23.
- Frick, K.M. y Benoit, J.D. (2010). Use it or lose it: environmental enrichment as a means to promote successful cognitive aging. *TheScientificWorldJournal*. 10: 1129-1141.

- Frick, K.M. y Fernandez, S.M. (2003). Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of aging*. 24: 615-626.
- Frick, K.M.; Fernandez, S.M. y Bulinski, S.C. (2002). Estrogen replacement improves spatial reference memory and increases hippocampal synaptophysin in aged female mice. *Neuroscience*. 115: 547-558.
- Frye, C.A. (2009). Neurosteroids' effects and mechanisms for social, cognitive, emotional, and physical functions. *Psychoneuroendocrinology*. 34 Suppl 1: S143-161.
- Frye, C.A.; Hirst, J.J.; Brunton, P.J. y Russell, J.A. (2011). Neurosteroids for a successful pregnancy. *Stress*. 14: 1-5.
- Frye, C.A.; Petralia, S.M. y Rhodes, M.E. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 67: 587-596.
- Furukawa, A.; Miyatake, A.; Ohnishi, T. y Ichikawa, Y. (1998). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *Journal of neurochemistry*. 71: 2231-2238.
- Gallagher, M. y Pellemounter, M.A. (1988). Spatial learning deficits in old rats: a model for memory decline in the aged. *Neurobiology of aging*. 9: 549-556.
- Gao, S.; Hendrie, H.C.; Hall, K.S. y Hui, S. (1998). The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Archives of general psychiatry*. 55: 809-815.
- Gatewood, J.D.; Morgan, M.D.; Eaton, M.; McNamara, I.M.; Stevens, L.F.; Macbeth, A.H.; Meyer, E.A.; Lomas, L.M.; Kozub, F.J.; Lambert, K.G. y col. (2005). Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain research bulletin*. 66: 91-98.
- Ghoumari, A.M.; Baulieu, E.E. y Schumacher, M. (2005). Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience*. 135: 47-58.
- Gomez-Sanchez, C.E.; Qi, X.; Velarde-Miranda, C.; Plonczynski, M.W.; Parker, C.R.; Rainey, W.; Satoh, F.; Maekawa, T.; Nakamura, Y.; Sasano, H. y col. (2014). Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Molecular and cellular endocrinology*. 383: 111-117.
- Gouras, G.K.; Xu, H.; Gross, R.S.; Greenfield, J.P.; Hai, B.; Wang, R. y Greengard, P. (2000). Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97: 1202-1205.
- Grattan, D.R.; Pi, X.J.; Andrews, Z.B.; Augustine, R.A.; Kokay, I.C.; Summerfield, M.R.; Todd, B. y Bunn, S.J. (2001). Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: implications for behavior. *Hormones and behavior*. 40: 115-124.
- Guennoun, R.; Labombarda, F.; Gonzalez Deniselle, M.C.; Liere, P.; De Nicola, A.F. y Schumacher, M. (2015). Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 146: 48-61.
- Gursoy, E.; Cardounel, A. y Kalimi, M. (2001). Pregnenolone protects mouse hippocampal (HT-22) cells against glutamate and amyloid beta protein toxicity. *Neurochemical research*. 26: 15-21.
- Hall, C.B.; Lipton, R.B.; Sliwinski, M.; Katz, M.J.; Derby, C.A. y Verghese, J. (2009). Cognitive activities delay onset of memory decline in persons who develop dementia. *Neurology*. 73: 356-361.
- Hammer, F.; Compagnone, N.A.; Vigne, J.L.; Bair, S.R. y Mellon, S.H. (2004). Transcriptional regulation of P450scc gene expression in the embryonic rodent nervous system. *Endocrinology*. 145: 901-912.
- Hammond, J.; Le, Q.; Goodyer, C.; Gelfand, M.; Trifiro, M. y LeBlanc, A. (2001). Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *Journal of neurochemistry*. 77: 1319-1326.
- Hansson, A.C.; Sommer, W.H.; Metsis, M.; Stromberg, I.; Agnati, L.F. y Fuxe, K. (2006). Corticosterone actions on the hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression are mediated by exon IV promoter. *Journal of neuroendocrinology*. 18: 104-114.
- Hattiangady, B.; Rao, M.S.; Shetty, G.A. y Shetty, A.K. (2005). Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Experimental neurology*. 195: 353-371.
- Higo, S.; Hojo, Y.; Ishii, H.; Kominami, T.; Nakajima, K.; Poirier, D.; Kimoto, T. y Kawato, S. (2009). Comparison of sex-steroid synthesis between neonatal and adult rat hippocampus. *Biochemical and biophysical research communications*. 385: 62-66.
- Higuchi, T.; Honda, K.; Fukuoka, T.; Negoro, H. y Wakabayashi, K. (1985). Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. *The Journal of endocrinology*. 105: 339-346.

- Hojo, Y.; Hattori, T.A.; Enami, T.; Furukawa, A.; Suzuki, K.; Ishii, H.T.; Mukai, H.; Morrison, J.H.; Janssen, W.G.; Kominami, S. y col. (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 865-870.
- Hojo, Y.; Murakami, G.; Mukai, H.; Higo, S.; Hatanaka, Y.; Ogiue-Ikeda, M.; Ishii, H.; Kimoto, T. y Kawato, S. (2008). Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Molecular and cellular endocrinology*. 290: 31-43.
- Hojo, Y.; Okamoto, M.; Kato, A.; Higo, S.; Sakai, F.; Soya, H.; Yamazaki, T. y S., K. (2014). Neurosteroid synthesis in adult female rat hippocampus, including androgens and allopregnanolone. *J Steroids Hormon Sci* S4: 002.
- Hung, C.F. y Penning, T.M. (1999). Members of the nuclear factor 1 transcription factor family regulate rat 3alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase (3alpha-HSD/DD AKR1C9) gene expression: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Mol Endocrinol*. 13: 1704-1717.
- Hunter, R.G.; McCarthy, K.J.; Milne, T.A.; Pfaff, D.W. y McEwen, B.S. (2009). Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 20912-20917.
- Ibanez, C.; Guennoun, R.; Liere, P.; Eychenne, B.; Pianos, A.; El-Etr, M.; Baulieu, E.E. y Schumacher, M. (2003). Developmental expression of genes involved in neurosteroidogenesis: 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase in the rat brain. *Endocrinology*. 144: 2902-2911.
- Ickes, B.R.; Pham, T.M.; Sanders, L.A.; Albeck, D.S.; Mohammed, A.H. y Granholm, A.C. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental neurology*. 164: 45-52.
- Inostroza, M.; Brotons-Mas, J.R.; Laurent, F.; Cid, E. y de la Prida, L.M. (2013). Specific impairment of "what-where-when" episodic-like memory in experimental models of temporal lobe epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 33: 17749-17762.
- Ishunina, T.A.; van Beurden, D.; van der Meulen, G.; Unmehopa, U.A.; Hol, E.M.; Huitinga, I. y Swaab, D.F. (2005). Diminished aromatase immunoreactivity in the hypothalamus, but not in the basal forebrain nuclei in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 26: 173-194.

- Issa, J.P.; Ottaviano, Y.L.; Celano, P.; Hamilton, S.R.; Davidson, N.E. y Baylin, S.B. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature genetics*. 7: 536-540.
- Issa, J.P.; Vertino, P.M.; Boehm, C.D.; Newsham, I.F. y Baylin, S.B. (1996). Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 11757-11762.
- Jablensky, A. (2000). Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 250: 274-285.
- Kart-Teke, E.; De Souza Silva, M.A.; Huston, J.P. y Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of learning and memory*. 85: 173-182.
- Kato, A.; Hojo, Y.; Higo, S.; Komatsuzaki, Y.; Murakami, G.; Yoshino, H.; Uebayashi, M. y Kawato, S. (2013). Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Frontiers in neural circuits*. 7: 149.
- Kelemen, E.; Barendt, M.; Born, J. y Inostroza, M. (2014). Hippocampal corticosterone impairs memory consolidation during sleep but improves consolidation in the wake state. *Hippocampus*. 24: 510-515.
- Kessler, R.C.; McGonagle, K.A.; Nelson, C.B.; Hughes, M.; Swartz, M. y Blazer, D.G. (1994). Sex and depression in the National Comorbidity Survey. II: Cohort effects. *Journal of affective disorders*. 30: 15-26.
- Kimoto, T.; Ishii, H.; Higo, S.; Hojo, Y. y Kawato, S. (2010). Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus. *Endocrinology*. 151: 5795-5806.
- Kinsley, C.H. y Lambert, K.G. (2008). Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring. *Journal of neuroendocrinology*. 20: 515-525.
- Kinsley, C.H.; Trainer, R.; Stafisso-Sandoz, G.; Quadros, P.; Marcus, L.K.; Hearon, C.; Meyer, E.A.; Hester, N.; Morgan, M.; Kozub, F.J. y col. (2006). Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Hormones and behavior*. 49: 131-142.
- Klempin, F. y Kempermann, G. (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 257: 271-280.

- Koenig, H.L.; Schumacher, M.; Ferzaz, B.; Thi, A.N.; Ressouches, A.; Guennoun, R.; Jung-Testas, I.; Robel, P.; Akwa, Y. y Baulieu, E.E. (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*. 268: 1500-1503.
- Komatsuzaki, Y.; Hatanaka, Y.; Murakami, G.; Mukai, H.; Hojo, Y.; Saito, M.; Kimoto, T. y Kawato, S. (2012). Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. *PloS one*. 7: e34124.
- Komulainen, P.; Pedersen, M.; Hanninen, T.; Bruunsgaard, H.; Lakka, T.A.; Kivipelto, M.; Hassinen, M.; Rauramaa, T.H.; Pedersen, B.K. y Rauramaa, R. (2008). BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study. *Neurobiology of learning and memory*. 90: 596-603.
- Konkle, A.T. y McCarthy, M.M. (2011). Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*. 152: 223-235.
- Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H. y Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 16: 2027-2033.
- Kuzumaki, N.; Ikegami, D.; Tamura, R.; Hareyama, N.; Imai, S.; Narita, M.; Torigoe, K.; Niikura, K.; Takeshima, H.; Ando, T. y col. (2011). Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus*. 21: 127-132.
- Kwon, S.E. y Chapman, E.R. (2011). Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron*. 70: 847-854.
- Labrie, F.; Luu-The, V.; Lin, S.X.; Simard, J. y Labrie, C. (2000). Role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 11: 421-427.
- Lambert, T.J.; Fernandez, S.M. y Frick, K.M. (2005). Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiology of learning and memory*. 83: 206-216.
- Lau, C.F.; Ho, Y.S.; Hung, C.H.; Wuwongse, S.; Poon, C.H.; Chiu, K.; Yang, X.; Chu, L.W. y Chang, R.C. (2014). Protective effects of testosterone on presynaptic terminals against oligomeric beta-amyloid peptide in primary culture of hippocampal neurons. *BioMed research international*. 2014: 103906.
- Launer, L.J.; Andersen, K.; Dewey, M.E.; Letenneur, L.; Ott, A.; Amaducci, L.A.; Brayne, C.; Copeland, J.R.; Dartigues, J.F.; Kragh-Sorensen, P. y col. (1999). Rates and risk factors

- for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia. Neurology.* 52: 78-84.
- Lavaque, E.; Mayen, A.; Azcoitia, I.; Tena-Sempere, M. y Garcia-Segura, L.M. (2006). Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system. *Journal of neurobiology.* 66: 308-318.
- Laviola, G.; Hannan, A.J.; Macri, S.; Solinas, M. y Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of disease.* 31: 159-168.
- Lavoie, H.A. y King, S.R. (2009). Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med (Maywood).* 234: 880-907.
- Lee, C.K.; Weindruch, R. y Prolla, T.A. (2000). Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature genetics.* 25: 294-297.
- Lee, S.J.; Romeo, R.D.; Svenningsson, P.; Campomanes, C.R.; Allen, P.B.; Greengard, P. y McEwen, B.S. (2004). Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females. *Neuroscience.* 127: 983-988.
- LeFevre, J. y McClintock, M.K. (1988). Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biology of reproduction.* 38: 780-789.
- Leuner, B.; Mirescu, C.; Noiman, L. y Gould, E. (2007). Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids. *Hippocampus.* 17: 434-442.
- Li, J.S. y Chao, Y.S. (2008). Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. *Neurobiology of learning and memory.* 89: 192-198.
- Lin, C.J.; Martens, J.W. y Miller, W.L. (2001). NF-1C, Sp1, and Sp3 are essential for transcription of the human gene for P450c17 (steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) in human adrenal NCI-H295A cells. *Mol Endocrinol.* 15: 1277-1293.
- Lin, H.K. y Penning, T.M. (1995). Cloning, sequencing, and functional analysis of the 5'-flanking region of the rat 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase gene. *Cancer research.* 55: 4105-4113.
- Liu, S.; Wu, H.; Xue, G.; Ma, X.; Wu, J.; Qin, Y. y Hou, Y. (2013). Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer's disease-like rats. *Neural regeneration research.* 8: 2800-2810.

- Lopez-Rodriguez, A.B.; Acaz-Fonseca, E.; Giatti, S.; Caruso, D.; Viveros, M.P.; Melcangi, R.C. y Garcia-Segura, L.M. (2015). Correlation of brain levels of progesterone and dehydroepiandrosterone with neurological recovery after traumatic brain injury in female mice. *Psychoneuroendocrinology*. 56: 1-11.
- Lu, K.H. (1983). Changes in ovarian function and gonadotrophin and prolactin secretion in aging female rats. En *Neuroendocrinology of aging* J. Meites, ed. (Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica: Plenum Press), pp. 103–122.
- Lu, K.H.; Hopper, B.R.; Vargo, T.M. y Yen, S.S. (1979). Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biology of reproduction*. 21: 193-203.
- Luchetti, S.; Bossers, K.; Van de Bilt, S.; Agrapart, V.; Morales, R.R.; Frajese, G.V. y Swaab, D.F. (2011a). Neurosteroid biosynthetic pathways changes in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 32: 1964-1976.
- Luchetti, S.; Huitinga, I. y Swaab, D.F. (2011b). Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis. *Neuroscience*. 191: 6-21.
- Lupien, S.J. y Lepage, M. (2001). Stress, memory, and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. *Behavioural brain research*. 127: 137-158.
- Macbeth, A.H.; Scharfman, H.E.; Maclusky, N.J.; Gautreaux, C. y Luine, V.N. (2008). Effects of multiparity on recognition memory, monoaminergic neurotransmitters, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Hormones and behavior*. 54: 7-17.
- Mackenzie, F. y Ruhrberg, C. (2012). Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development*. 139: 1371-1380.
- MacKenzie, S.M.; Clark, C.J.; Fraser, R.; Gomez-Sanchez, C.E.; Connell, J.M. y Davies, E. (2000). Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *Journal of molecular endocrinology*. 24: 321-328.
- Magnaghi, V.; Cavarretta, I.; Zucchi, I.; Susani, L.; Rupprecht, R.; Hermann, B.; Martini, L. y Melcangi, R.C. (1999). Po gene expression is modulated by androgens in the sciatic nerve of adult male rats. *Brain research. Molecular brain research*. 70: 36-44.
- Maguire, E.A.; Mummery, C.J. y Buchel, C. (2000). Patterns of hippocampal-cortical interaction dissociate temporal lobe memory subsystems. *Hippocampus*. 10: 475-482.
- Markham, J.A. y Juraska, J.M. (2002). Aging and sex influence the anatomy of the rat anterior cingulate cortex. *Neurobiology of aging*. 23: 579-588.

- Martinez-Arguelles, D.B. y Papadopoulos, V. (2010). Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids*. 75: 467-476.
- Matthews, R.P.; Guthrie, C.R.; Wailes, L.M.; Zhao, X.; Means, A.R. y McKnight, G.S. (1994). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Molecular and cellular biology*. 14: 6107-6116.
- Mattson, M.P. y Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews. Neuroscience*. 7: 278-294.
- Maze, I. y Nestler, E.J. (2011). The epigenetic landscape of addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1216: 99-113.
- Melcangi, R.C.; Celotti, F.; Castano, P. y Martini, L. (1993). Differential localization of the 5 alpha-reductase and the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in neuronal and glial cultures. *Endocrinology*. 132: 1252-1259.
- Mellon, S.H. (2007). Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacology & therapeutics*. 116: 107-124.
- Mellon, S.H.; Gong, W. y Schonemann, M.D. (2008). Endogenous and synthetic neurosteroids in treatment of Niemann-Pick Type C disease. *Brain research reviews*. 57: 410-420.
- Mellon, S.H.; Griffin, L.D. y Compagnone, N.A. (2001). Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain research. Brain research reviews*. 37: 3-12.
- Michael, M.D.; Michael, L.F. y Simpson, E.R. (1997). A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Molecular and cellular endocrinology*. 134: 147-156.
- Micheau, J.; Destrade, C. y Soumireu-Mourat, B. (1984). Time-dependent effects of posttraining intrahippocampal injections of corticosterone on retention of appetitive learning tasks in mice. *European journal of pharmacology*. 106: 39-46.
- Middleton, L.E.; Mitnitski, A.; Fallah, N.; Kirkland, S.A. y Rockwood, K. (2008). Changes in cognition and mortality in relation to exercise in late life: a population based study. *PloS one*. 3: e3124.
- Miller, W.L. (1995). Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 55: 607-616.
- Missaghian, E.; Kempna, P.; Dick, B.; Hirsch, A.; Alikhani-Koupaei, R.; Jegou, B.; Mullis, P.E.; Frey, B.M. y Fluck, C.E. (2009). Role of DNA methylation in the tissue-specific

- expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *The Journal of endocrinology*. 202: 99-109.
- Mitev, Y.A.; Darwish, M.; Wolf, S.S.; Holsboer, F.; Almeida, O.F. y Patchev, V.K. (2003). Gender differences in the regulation of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and sensitivity to neurosteroid-mediated stress protection. *Neuroscience*. 120: 541-549.
- Molkentin, J.D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 275: 38949-38952.
- Mora, F.; Segovia, G. y del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain research reviews*. 55: 78-88.
- Morales, T. (2011). Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats. *Journal of neuroendocrinology*. 23: 994-1001.
- Moreno-Piovano, G. (2013). Factores que modulan la acción neotrófica de los estrógenos en el hipocampo del adulto in vivo. (Santa Fe, Argentina, Universidad Nacional del Litoral).
- Moreno-Piovano, G.; Dudiuk, C.; Rossetti, M.F.; Varayoud, J.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2010). Age-related changes in hippocampal estrogen receptor alpha in female mice. (Córdoba, Argentina), p. p. 146.
- Moreno-Piovano, G.; Varayoud, J.; Rossetti, M.F.; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2011). La disminución de la expresión del receptor de estrógenos alfa (ERA) asociada al envejecimiento está ligada a procesos epigenéticos de metilación de ADN. (Mar del Plata, Argentina), pp. pp. 104-105.
- Moreno-Piovano, G.S.; Varayoud, J.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2014). Long-term ovariectomy increases BDNF gene methylation status in mouse hippocampus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 144 Pt B: 243-252.
- Morrison, J.H.; Brinton, R.D.; Schmidt, P.J. y Gore, A.C. (2006). Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26: 10332-10348.
- Mukai, Y.; Higashi, T.; Nagura, Y. y Shimada, K. (2008). Studies on neurosteroids XXV. Influence of a 5alpha-reductase inhibitor, finasteride, on rat brain neurosteroid levels and metabolism. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 31: 1646-1650.

- Munetsuna, E.; Hattori, M.; Komatsu, S.; Sakimoto, Y.; Ishida, A.; Sakata, S.; Hojo, Y.; Kawato, S. y Yamazaki, T. (2009a). Social isolation stimulates hippocampal estradiol synthesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 379: 480-484.
- Munetsuna, E.; Hattori, M.; Sakimoto, Y.; Ishida, A.; Sakata, S.; Hojo, Y.; Kawato, S. y Yamazaki, T. (2011). Environmental enrichment alters gene expression of steroidogenic enzymes in the rat hippocampus. *General and comparative endocrinology*. 171: 28-32.
- Munetsuna, E.; Hojo, Y.; Hattori, M.; Ishii, H.; Kawato, S.; Ishida, A.; Kominami, S.A. y Yamazaki, T. (2009b). Retinoic acid stimulates 17beta-estradiol and testosterone synthesis in rat hippocampal slice cultures. *Endocrinology*. 150: 4260-4269.
- Nelson, J.F.; Karelus, K.; Bergman, M.D. y Felicio, L.S. (1995). Neuroendocrine involvement in aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. *Neurobiology of aging*. 16: 837-843; discussion 855-836.
- Neville, M.C.; McFadden, T.B. y Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 7: 49-66.
- Ngun, T.C.; Ghahramani, N.; Sanchez, F.J.; Bocklandt, S. y Vilain, E. (2011). The genetics of sex differences in brain and behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*. 32: 227-246.
- Nicholson, D.A.; Yoshida, R.; Berry, R.W.; Gallagher, M. y Geinisman, Y. (2004). Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24: 7648-7653.
- Nithianantharajah, J. y Hannan, A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*. 7: 697-709.
- Nomura, M.; Morohashi, K.; Kirita, S.; Nonaka, Y.; Okamoto, M.; Nawata, H. y Omura, T. (1993). Three forms of rat CYP11B genes: 11 beta-hydroxylase gene, aldosterone synthase gene, and a novel gene. *Journal of biochemistry*. 113: 144-152.
- Oakes, C.C.; Smiraglia, D.J.; Plass, C.; Trasler, J.M. y Robaire, B. (2003). Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 1775-1780.
- Pause, B.M.; Zlomuzica, A.; Kinugawa, K.; Mariani, J.; Pietrowsky, R. y Dere, E. (2013). Perspectives on episodic-like and episodic memory. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 7: 33.
- Pawluski, J.L. y Galea, L.A. (2006). Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. *Journal of neurobiology*. 66: 71-81.

- Payne, A.H. y Hales, D.B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*. 25: 947-970.
- Penning, T.M. (1996). 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: three dimensional structure and gene regulation. *The Journal of endocrinology*. 150 Suppl: S175-187.
- Penning, T.M. y Drury, J.E. (2007). Human ald-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of biochemistry and biophysics*. 464: 241-250.
- Penning, T.M.; Ma, H. y Jez, J.M. (2001). Engineering steroid hormone specificity into ald-keto reductases. *Chemico-biological interactions*. 130-132: 659-671.
- Pluchino, N.; Drakopoulos, P.; Bianchi-Demicheli, F.; Wenger, J.M.; Petignat, P. y Genazzani, A.R. (2015). Neurobiology of DHEA and effects on sexuality, mood and cognition. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 145: 273-280.
- Prange-Kiel, J. y Rune, G.M. (2006). Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience*. 138: 765-772.
- Reddy, D.S. (2010). Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in brain research*. 186: 113-137.
- Religa, P.; Cao, R.; Religa, D.; Xue, Y.; Bogdanovic, N.; Westaway, D.; Marti, H.H.; Winblad, B. y Cao, Y. (2013). VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Scientific reports*. 3: 2053.
- Richardson, S.J.; Senikas, V. y Nelson, J.F. (1987). Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 65: 1231-1237.
- Rosenzweig, M.R.; Bennett, E.L.; Hebert, M. y Morimoto, H. (1978). Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain research*. 153: 563-576.
- Rossetti, M.F.; Varayoud, J.; Moreno-Piovano, G.S.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2015). Environmental enrichment attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes and reduces the methylation state of the steroid 5alpha-reductase type 1 gene in the rat hippocampus. *Molecular and cellular endocrinology*.
- Roumen, L.; Sanders, M.P.; Pieterse, K.; Hilbers, P.A.; Plate, R.; Custers, E.; de Gooyer, M.; Smits, J.F.; Beugels, I.; Emmen, J. y col. (2007). Construction of 3D models of the CYP11B family as a tool to predict ligand binding characteristics. *Journal of computer-aided molecular design*. 21: 455-471.
- Rune, G.M. y Frotscher, M. (2005). Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience*. 136: 833-842.

- Russo, J. y Russo, I.H. (1980). Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. II. Pregnancy interruption as a risk factor in tumor incidence. *The American journal of pathology*. 100: 497-512.
- Sakr, H.F.; Khalil, K.I.; Hussein, A.M.; Zaki, M.S.; Eid, R.A. y Alkhateeb, M. (2014). Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on memory and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in a rat model of vascular dementia. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 65: 41-53.
- Sale, A.; Berardi, N. y Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends in neurosciences*. 32: 233-239.
- Sanchez, P.; Torres, J.M.; Vilchez, P.; Del Moral, R.G. y Ortega, E. (2008). Effects of sulpiride on prolactin and mRNA levels of steroid 5alpha-reductase isozymes in adult rat brain. *Neurochemical research*. 33: 820-825.
- Schumacher, M.; Weill-Engerer, S.; Liere, P.; Robert, F.; Franklin, R.J.; Garcia-Segura, L.M.; Lambert, J.J.; Mayo, W.; Melcangi, R.C.; Parducz, A. y col. (2003). Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in neurobiology*. 71: 3-29.
- Seeman, M.V. (1997). Psychopathology in women and men: focus on female hormones. *The American journal of psychiatry*. 154: 1641-1647.
- Seenundun, S. y Robaire, B. (2005). Cloning and characterization of the 5alpha-reductase type 2 promoter in the rat epididymis. *Biology of reproduction*. 72: 851-861.
- Segovia, G.; Porras, A.; Del Arco, A. y Mora, F. (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mechanisms of ageing and development*. 122: 1-29.
- Sher, N.; Yivgi-Ohana, N. y Orly, J. (2007). Transcriptional regulation of the cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 gene (CYP11A1) revisited: binding of GATA, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating protein (AP)-1 proteins to a distal novel cluster of cis-regulatory elements potentiates AP-2 and steroidogenic factor-1-dependent gene expression in the rodent placenta and ovary. *Mol Endocrinol*. 21: 948-962.
- Sherwin, B.B. (2006). Estrogen and cognitive aging in women. *Neuroscience*. 138: 1021-1026.
- Sherwin, B.B. y Henry, J.F. (2008). Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review. *Frontiers in neuroendocrinology*. 29: 88-113.

- Shetty, A.K.; Hattiangady, B. y Shetty, G.A. (2005). Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia*. 51: 173-186.
- Shih, M.C.; Chiu, Y.N.; Hu, M.C.; Guo, I.C. y Chung, B.C. (2011). Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. *Molecular and cellular endocrinology*. 336: 80-84.
- Shimamura, A.P.; Berry, J.M.; Mangels, J.A.; Rusting, C.L. y Jurica, P.J. (1995). Memory and cognitive abilities in university professors: evidence for successful aging. *Psychological science*. 6: 271-277.
- Sierra, A. (2004). Neurosteroids: the StAR protein in the brain. *Journal of neuroendocrinology*. 16: 787-793.
- Sierra, A.; Lavaque, E.; Perez-Martin, M.; Azcoitia, I.; Hales, D.B. y Garcia-Segura, L.M. (2003). Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *The European journal of neuroscience*. 18: 1458-1467.
- Silandre, D.; Delalande, C.; Durand, P. y Carreau, S. (2007). Three promoters PII, PI.f, and PI.tr direct the expression of aromatase (cyp19) gene in male rat germ cells. *Journal of molecular endocrinology*. 39: 169-181.
- Simpson, J. y Kelly, J.P. (2012). An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behavioural brain research*. 229: 289-300.
- Singh, C.; Liu, L.; Wang, J.M.; Irwin, R.W.; Yao, J.; Chen, S.; Henry, S.; Thompson, R.F. y Brinton, R.D. (2012). Allopregnanolone restores hippocampal-dependent learning and memory and neural progenitor survival in aging 3xTgAD and nonTg mice. *Neurobiology of aging*. 33: 1493-1506.
- Soma, K.K.; Sinchak, K.; Lakhter, A.; Schlinger, B.A. y Micevych, P.E. (2005). Neurosteroids and female reproduction: estrogen increases 3beta-HSD mRNA and activity in rat hypothalamus. *Endocrinology*. 146: 4386-4390.
- Sperk, G. (1994). Kainic acid seizures in the rat. *Progress in neurobiology*. 42: 1-32.
- Stocco, C. (2008). Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*. 73: 473-487.
- Sutcliffe, J.S.; Marshall, K.M. y Neill, J.C. (2007). Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural brain research*. 177: 117-125.

- Sze, C.I.; Troncoso, J.C.; Kawas, C.; Mouton, P.; Price, D.L. y Martin, L.J. (1997). Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 56: 933-944.
- Tajima, S. y Suetake, I. (1998). Regulation and function of DNA methylation in vertebrates. *Journal of biochemistry*. 123: 993-999.
- Taya, K. y Greenwald, G.S. (1981). In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the pregnant rat. *Biology of reproduction*. 25: 683-691.
- Taylor, S.L.; Trudeau, D.; Arnold, B.; Wang, J.; Gerrow, K.; Summerfeldt, K.; Holmes, A.; Zamani, A.; Brocardo, P.S. y Brown, C.E. (2015). VEGF can protect against blood brain barrier dysfunction, dendritic spine loss and spatial memory impairment in an experimental model of diabetes. *Neurobiology of disease*. 78: 1-11.
- Toescu, E.C.; Verkhratsky, A. y Landfield, P.W. (2004). Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends in neurosciences*. 27: 614-620.
- Tomizawa, K.; Iga, N.; Lu, Y.F.; Moriwaki, A.; Matsushita, M.; Li, S.T.; Miyamoto, O.; Itano, T. y Matsui, H. (2003). Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nature neuroscience*. 6: 384-390.
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annual review of psychology*. 53: 1-25.
- Valero, J.; Espana, J.; Parra-Damas, A.; Martin, E.; Rodriguez-Alvarez, J. y Saura, C.A. (2011). Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APP(Sw,Ind) transgenic mice. *PloS one*. 6: e16832.
- Van Den Eeden, S.K.; Tanner, C.M.; Bernstein, A.L.; Fross, R.D.; Leimpeter, A.; Bloch, D.A. y Nelson, L.M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American journal of epidemiology*. 157: 1015-1022.
- van Praag, H.; Kempermann, G. y Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*. 1: 191-198.
- Vanoye-Carlo, A.; Morales, T.; Ramos, E.; Mendoza-Rodriguez, A. y Cerbon, M. (2008). Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Hormones and behavior*. 53: 112-123.
- Vanselow, J.; Pohland, R. y Furbass, R. (2005). Promoter-2-derived Cyp19 expression in bovine granulosa cells coincides with gene-specific DNA hypo-methylation. *Molecular and cellular endocrinology*. 233: 57-64.

- Vanselow, J.; Spitschak, M.; Nimz, M. y Furbass, R. (2010). DNA methylation is not involved in preovulatory down-regulation of CYP11A1, HSD3B1, and CYP19A1 in bovine follicles but may have a role in permanent silencing of CYP19A1 in large granulosa lutein cells. *Biology of reproduction*. 82: 289-298.
- Vergheze, J.; Lipton, R.B.; Katz, M.J.; Hall, C.B.; Derby, C.A.; Kuslansky, G.; Ambrose, A.F.; Sliwinski, M. y Buschke, H. (2003). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. *The New England journal of medicine*. 348: 2508-2516.
- Vierk, R.; Brandt, N. y Rune, G.M. (2014). Hippocampal estradiol synthesis and its significance for hippocampal synaptic stability in male and female animals. *Neuroscience*. 274: 24-32.
- von Kanel, T.; Gerber, D.; Schaller, A.; Baumer, A.; Wey, E.; Jackson, C.B.; Gisler, F.M.; Heinimann, K. y Gallati, S. (2010). Quantitative 1-step DNA methylation analysis with native genomic DNA as template. *Clinical chemistry*. 56: 1098-1106.
- Wallace, M.; Frankfurt, M.; Arellanos, A.; Inagaki, T. y Luine, V. (2007). Impaired recognition memory and decreased prefrontal cortex spine density in aged female rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1097: 54-57.
- Wang, J.M.; Johnston, P.B.; Ball, B.G. y Brinton, R.D. (2005). The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25: 4706-4718.
- Wang, J.M.; Singh, C.; Liu, L.; Irwin, R.W.; Chen, S.; Chung, E.J.; Thompson, R.F. y Brinton, R.D. (2010). Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107: 6498-6503.
- Weaver, I.C.; Cervoni, N.; Champagne, F.A.; D'Alessio, A.C.; Sharma, S.; Seckl, J.R.; Dymov, S.; Szyf, M. y Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*. 7: 847-854.
- Wierda, R.J.; Geutskens, S.B.; Jukema, J.W.; Quax, P.H. y van den Elsen, P.J. (2010). Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 14: 1225-1240.
- Wiescholleck, V.; Emma Andre, M.A. y Manahan-Vaughan, D. (2014). Early age-dependent impairments of context-dependent extinction learning, object recognition, and object-place learning occur in rats. *Hippocampus*. 24: 270-279.

- Wise, E.A.; Riley, J.L., 3rd y Robinson, M.E. (2000). Clinical pain perception and hormone replacement therapy in postmenopausal women experiencing orofacial pain. *The Clinical journal of pain*. 16: 121-126.
- Yaffe, K.; Sawaya, G.; Lieberburg, I. y Grady, D. (1998). Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *Jama*. 279: 688-695.
- Yang, J.; Yoshizawa, K.; Nandi, S. y Tsubura, A. (1999). Protective effects of pregnancy and lactation against N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in female Lewis rats. *Carcinogenesis*. 20: 623-628.
- Yawno, T.; Hirst, J.J.; Castillo-Melendez, M. y Walker, D.W. (2009). Role of neurosteroids in regulating cell death and proliferation in the late gestation fetal brain. *Neuroscience*. 163: 838-847.
- Yen, S.S.C. (1999). The human menstrual cycle: Neuroendocrine regulation. En *Reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management* S.S.C. Yen, R.B. Jaffe, y R.L. Barbieri, eds. (Philadelphia, Estados Unidos de Norteamérica: W.B.Saunders), pp. 191–217.
- Younan, N.; El-attar, S. y Sabry, D. (2012). Progesterone as a neuroprotective treatment in brain ischemic injury in ovariectomized rats: relation to brain derived neurotrophic factor, synaptic plasticity and astrocytes. *Med. J. Cairo Univ*. 80: 67-80.
- Yu, L.; Romero, D.G.; Gomez-Sanchez, C.E. y Gomez-Sanchez, E.P. (2002). Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Molecular and cellular endocrinology*. 190: 9-17.
- Zandi, P.P.; Carlson, M.C.; Plassman, B.L.; Welsh-Bohmer, K.A.; Mayer, L.S.; Steffens, D.C. y Breitner, J.C. (2002). Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *Jama*. 288: 2123-2129.
- Zhang, L.; Rubinow, D.R.; Xiang, G.; Li, B.S.; Chang, Y.H.; Maric, D.; Barker, J.L. y Ma, W. (2001). Estrogen protects against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. *Neuroreport*. 12: 1919-1923.
- Zhang, Q.G.; Wang, R.; Tang, H.; Dong, Y.; Chan, A.; Sareddy, G.R.; Vadlamudi, R.K. y Brann, D.W. (2014). Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. *Molecular and cellular endocrinology*. 389: 84-91.
- Zhang, X. y Ho, S.M. (2011). Epigenetics meets endocrinology. *Journal of molecular endocrinology*. 46: R11-32.

URL de sitios web que fueron citados en esta tesis:

- <http://www.informatics.jax.org/greenbook/figures/figure13-11.shtml>.
- <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>