

Lucía López Rodríguez
Tesina de Grado - Lic .en Ciencias Biológicas

Patrón de distribución y
análisis cuantitativo de la
expresión de la proteína **HIG-1**
(Hypoxia induced gene 1) en
Sistema Nervioso Central
de rata

Tutora Dra. Gabriela Bedó
Co-tutora MSc María José Zuluaga
Facultad de Ciencias UdelaR
2015

CONTENIDO

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1 Desarrollo y maduración del SNC.....	5
1.1 Rol de la apoptosis en el desarrollo y maduración del SNC	5
1.2 Señales que regulan la apoptosis: Vía mitocondrial.....	6
2. Proteína HIG-1 (Hypoxia-induced gene 1).....	8
2.1 Identificación y características generales.....	8
2.2 Regulación de HIG-1.....	9
2.3 Posible función de HIG-1 frente al estrés celular y la apoptosis.....	9
2.4 HIG-1 y la integridad mitocondrial.....	10
2.5 HIG-1 durante la etapa postnatal	10
3 Núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media	10
3.2 SDN- MPOA y regulación de la vía mitocondrial de apoptosis.....	12
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Diseño experimental	15
1 Animales	16
2 Determinación del patrón de expresión de la proteína HIG-1 por inmunohistoquímica	16
2.1 Preparación del tejido.....	16
2.2 Cortes	16
2.3 Inmunohistoquímica en cortes "free floating" y tinción con DAB.....	17
2.4 Análisis cuantitativo de las imágenes.....	17
2.5 Análisis estadístico	18
3 Determinación de la localización de la proteína HIG-1 y otros marcadores en SNC por inmunofluorescencia.....	18
4 Cuantificación de la proteína HIG-1 en SNC por Western Blot	20
4.1 Extracción y cuantificación de proteínas.....	20

4.2 Ensayo de Western Blot	20
4.3 Análisis de los resultados obtenidos de Western Blot	23
4.4 Análisis estadístico	23
RESULTADOS.....	24
1 Determinación del patrón de expresión de la proteína HIG-1 en SNC	24
1.1 Caracterización del patrón general de expresión de HIG-1 por inmunohistoquímica	24
1.2 Determinación de los tipos celulares que expresan la proteína HIG-1 mediante inmunofluorescencia.....	28
2 Cuantificación de la proteína HIG-1 en SNC por Western Blot	32
2.1 Búsqueda de proteína para corregir datos.....	32
2.2 Análisis preliminar de los niveles de HIG-1 en crías machos P1 y machos P42	34
2.3 Análisis de los niveles de expresión HIG-1 en áreas del SNC en función de la edad y el sexo.....	34
3 Determinación de la expresión de la proteína HIG-1 en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media por inmunohistoquímica	38
3.1 Identificación del núcleo y confirmación del dimorfismo.....	38
3.2 Análisis de la expresión de Caspasa 3- activada en el SDN-MPOA.....	40
3.3 Análisis semicuantitativo de los niveles de HIG-1.....	41
3.4 Definición de los tipos celulares en los que se expresa HIG-1 en el SDN-MPOA	44
DISCUSIÓN	46
1 Determinación del patrón y los niveles de expresión de la proteína HIG-1 en SNC.....	46
2 Linajes celulares que presentan expresión de HIG-1	50
3 Expresión de la proteína HIG-1 en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica	50
4 Rol de HIG-1 en el desarrollo del SNC	53
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
AGRADECIMIENTOS.....	56
Análisis de los niveles de expresión HIG-1 en áreas del SNC en función de la edad y el sexo	65
Caracterización del patrón general de expresión de HIG-1 por inmunohistoquímica	70

RESUMEN

HIG-1 (Hypoxia-induced gene 1) es una proteína de 10,8 kDa, ubicada en la membrana de la cresta mitocondrial interna. Esta proteína se expresa en numerosos tejidos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y en respuesta a varios tipos de estrés. Se ha sugerido que cumple un rol en procesos de diferenciación y en la señalización de muerte o supervivencia celular. Trabajos recientes han demostrado un efecto antiapoptótico resultante de la inhibición de la liberación de citocromo C y la actividad de caspasas.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la expresión del gen *Hig-1* en el SNC durante el desarrollo en ratas, analizándose los niveles y distribución del ARNm y la proteína. Pese a estos avances poco se sabe de su rol en el desarrollo normal del Sistema Nervioso Central.

En el presente estudio nos propusimos profundizar en la caracterización de los niveles de expresión de HIG-1 en diferentes áreas del SNC, durante el desarrollo normal, como aproximación al significado funcional de la proteína. Los resultados indican que esta proteína presenta un patrón de distribución amplio pero no ubicuo con altos niveles de expresión en áreas en la que fue cuantificada. Entre ellas se encuentran corteza parietal, hipocampo, amígdala, nervio óptico, cuerpo caloso, núcleo endopiriforme, entre otras. En algunas regiones como la corteza parietal y el diencéfalo, los niveles aumentan hacia el día 15 de edad. Sin embargo, no todas las regiones presentan el mismo patrón temporal, un ejemplo de ello es la médula espinal que presenta mayores niveles en el día 5 y luego descienden hacia el día 15.

A su vez, se analizó particularmente la expresión de HIG-1 en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media de rata (SDN- MPOA). Este núcleo, cuyo volumen es ocho veces mayor en machos adultos que en hembras, es un ejemplo de área que sufre remodelación mediante la vía mitocondrial de apoptosis fundamentalmente durante la etapa postnatal, por lo que se propuso analizar una vinculación con los niveles de proteína HIG-1. El análisis en el núcleo dimórfico mostró que los niveles de proteína HIG-1 varían con respecto al sexo y a la edad y que esta variación (cuantificada entre los 5 y los 8 días de vida posnatal, momento en que ocurren los cambios en tamaño y número de neuronas en el núcleo analizado), se correlaciona negativamente con los niveles de apoptosis en dicho núcleo.

Los altos niveles de expresión y la particular distribución de HIG-1, sugieren que esta proteína podría tener un rol en vías de señalización durante la maduración funcional del SNC.

INTRODUCCIÓN

1 Desarrollo y maduración del SNC

El desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) involucra procesos de maduración, diferenciación y plasticidad. Algunos de los mecanismos que participan en estos procesos son la apoptosis, la diferenciación celular, la neurogénesis, la migración neuronal, la proliferación y la remodelación de las sinapsis ¹⁻⁵.

En particular, el proceso de maduración del SNC se observa desde el período embrionario hasta el periodo postnatal ⁶. Es un proceso secuencial que ocurre de acuerdo a un gradiente de maduración morfológico. En este sentido, las regiones más caudales como el cerebro posterior presentan una maduración temprana respecto a áreas más rostrales como el cerebro anterior. A su vez, maduran antes las regiones mediales que las laterales ⁶. El proceso de maduración determina los subtipos de neuronas, la citoarquitectura regional, la variación en la distribución de los neurotransmisores y los patrones de comunicación neuronal de una región, es decir que definen la especialización funcional de la misma ⁷.

La especificidad funcional de los grupos celulares depende en definitiva de la localización anatómica y de sus conexiones particulares, y a nivel celular, es consecuencia del conjunto de proteínas que expresa ⁸.

En ratas, las primeras dos semanas de vida postnatal son críticas para el desarrollo del SNC, ya que las crías presentan un escaso desarrollo al nacer. Durante este período, ocurre una acelerada maduración de los sistemas motores y sensoriales que se asocia a procesos de organización y diferenciación neuronal así como a eventos de remodelación topográfica de las conexiones neuronales tanto a nivel cortical como subcortical ^{9,10}. Estos procesos de maduración postnatales se asocian a cambios en la expresión génica con un patrón secuencial y temporal en distintas regiones del SNC ¹¹.

1.1 Rol de la apoptosis en el desarrollo y maduración del SNC

Hace treinta años, Kerr y colaboradores observaron que células sometidas a un tipo de muerte celular no necrótica, desarrollaban características morfológicas específicas que provocaban su muerte y definieron a este evento como "apoptosis" ¹². La apoptosis se caracteriza por la remoción ordenada y eficiente de células con preservación de las membranas a lo largo de todo el proceso, el cual finaliza con la formación de cuerpos apoptóticos que pueden posteriormente ser fagocitados ¹³. Durante el proceso apoptótico se debe mantener el suministro energético.

La muerte celular fisiológica por apoptosis es un proceso esencial en el desarrollo y la morfogénesis normal del cerebro ya que influye sobre el establecimiento y el mantenimiento de la arquitectura del tejido ^{14,15}. Durante el desarrollo del SNC se forman numerosas estructuras celulares que más tarde son eliminadas por apoptosis. Esto permite una mayor

flexibilidad, ya que estructuras primordiales pueden ser adaptadas para diferentes funciones en diferentes etapas de la vida. La apoptosis también actúa como parte de un control de calidad para la reparación tisular frente a injurias o infecciones ¹⁶.

La regulación de la apoptosis es de interés tanto en el desarrollo normal como en procesos patológicos. Existe gran cantidad de evidencia de que un proceso ordenado de muerte celular se produce en las poblaciones neuronales durante el desarrollo normal y, que la activación anormal de este proceso subyace en muchas enfermedades neurodegenerativas ¹⁷⁻²⁰.

Dada la importancia que tiene la apoptosis en el desarrollo normal, resulta necesario para la célula tener mecanismos eficaces, superpuestos y redundantes para regularla y restringirla.

1.2 Señales que regulan la apoptosis: Vía mitocondrial

Estudios realizados en distintos tipos celulares, sistemas experimentales y especies han permitido una mejor comprensión de los procesos moleculares y celulares que regulan la muerte apoptótica ^{3,13,21,22}. En este sentido, se determinaron dos vías apoptóticas, ambas presentes en células nerviosas: la vía intrínseca o mitocondrial que como su nombre lo indica tiene como eje la disfunción mitocondrial y, la vía extrínseca o desencadenada por la activación de receptores de muerte localizados en la membrana celular ¹³. En este trabajo nos centraremos en el rol que tiene la vía intrínseca o mitocondrial en el desarrollo del SNC.

La pérdida de la homeostasis intracelular, manifestada a través de cambios en el pH, alteraciones del citoesqueleto, incremento en las concentraciones de calcio, estrés oxidativo, entre otros, puede alterar las propiedades de la membrana mitocondrial. Esto ocasiona un incremento de su permeabilidad y la consecuente liberación de tres elementos que pueden desencadenar cascadas apoptóticas: citocromo C, Smac/ DIABLO (activador secundario mitocondrial de caspasas/proteína de unión a IAP-proteínas inhibidoras de apoptosis- con bajo punto isoeléctrico) y AIF (factor inductor de apoptosis) ¹³.

El citocromo C es una proteína que normalmente participa en los procesos de fosforilación oxidativa y producción de ATP, a través del transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. La alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial por las condiciones señaladas antes permite la liberación del Citocromo C al citoplasma, donde su función cambia radicalmente, interactuando con el dominio WD40 presente en la proteína Apaf-1 y con la procaspasa 9, conformando con estas dos proteínas un complejo denominado apoptosoma ²³. Este proceso requiere la presencia de ATP y marca el inicio de una cascada apoptótica, a través de la activación de la caspasa 9. La caspasa 9 que funciona como una caspasa iniciadora, activa a su vez a las caspasas 3, 6 ó 7, que son efectoras, para que éstas actúen sobre sus blancos ¹³.

Se han propuesto una serie de mecanismos que podrían ser responsables de la liberación de estas proteínas pro-apoptóticas. Entre ellas, se ha propuesto una pérdida de potencial de membrana mitocondrial. A su vez, se ha sugerido que la afluencia de fluido al interior de la membrana también podría ser responsable de la liberación de proteínas pro-apoptóticas ^{24,25}. Sin embargo, estas hipótesis se han visto debilitadas debido a las evidencias, que muestran que la liberación de Citocromo C puede producirse previo a la pérdida de potencial de membrana ²⁶⁻²⁸.

1.2.1 Miembros de la familia Bcl-2 participan en la regulación de la apoptosis en neuronas

Otro mecanismo que permite explicar la liberación mitocondrial de proteínas durante la apoptosis, se basa en la interacción de miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 pueden prevenir la liberación del citocromo C ^{26,27,29,30}. Sin embargo estas proteínas antiapoptóticas interactuando con los miembros proapoptóticos de la misma familia de proteínas, como Bax, pueden oligomerizar para formar canales mitocondriales a través de los cuales pueden pasar las proteínas pro-apoptóticas ^{31,32}.

Los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 interactúan con miembros pro-apoptóticos para regular la liberación del Citocromo C de la mitocondria y la muerte celular. Existen aproximadamente diez miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, sin embargo Bax ha demostrado ser el más importante para el desarrollo neuronal. Bax regula de forma Bcl-X_L dependiente la supervivencia neuronal. Bax se expresa en niveles relativamente altos tanto en el cerebro del embrión como del adulto y es capaz de formar heterodímeros con Bcl-X_L ³³⁻³⁵.

Datos obtenidos por Roth & D'sa (2001) muestran que la interacción intracelular entre Bax y Bcl-X_L parece regular la supervivencia de neuronas durante el desarrollo del cerebro.

1.2.2 Caspasa-3 es activada durante la muerte neuronal programada

La acción de los miembros de la familia Bcl-2 es con frecuencia mediada por la activación de caspasas ¹⁶. El fenotipo apoptótico típicamente requiere la activación de una o más caspasas efectoras tales como las caspasas 3, 6, y 7 ³⁶. La caspasa-3 se expresa en el SNC en desarrollo y su activación regula la apoptosis neuronal. Estas proteínas están presentes en las células como zimógenos y al recibir un estímulo sufren escisión proteolítica y activación (Ver fig. 1). Se ha demostrado que la activación de caspasa-3 es dependiente de la expresión de Apaf-1 y caspasa-9 ³.

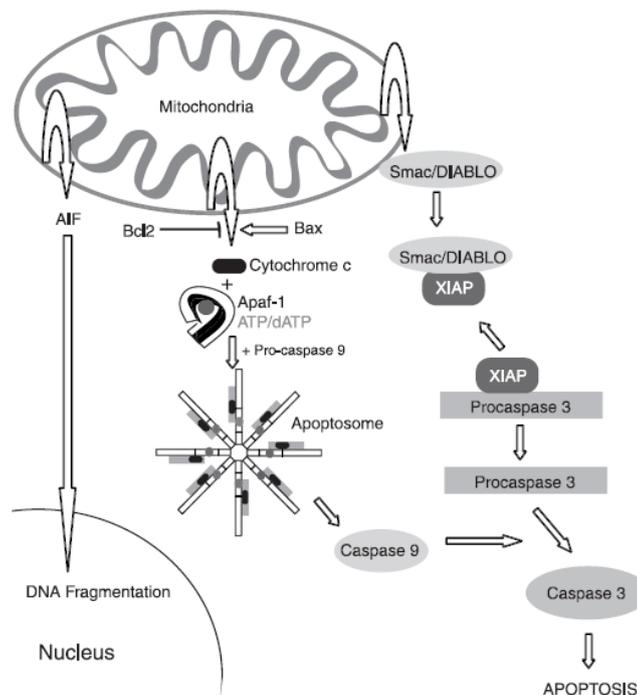


Fig. 1. Esquema de la vía mitocondrial de apoptosis. Moléculas implicadas en la liberación de la mitocondria de factores apoptóticos y de la cascada de moléculas efectoras que se produce corriente abajo (Modificado de ³⁷).

Los procesos vinculados a la remodelación del SNC y en particular aquellos que implican muerte celular como la apoptosis, deben de estar rigurosamente regulados. Esto se debe a que si se desregulan, por ejemplo, en una célula progenitora, se está definiendo el destino de una progenie entera. Por lo tanto, deben de existir mecanismos generales y específicos, a distintas escalas de regulación con el fin de controlar un mismo proceso. Las moléculas implicadas en la remodelación del SNC mediante apoptosis que se presentaron anteriormente son comunes a muchos linajes celulares. Presumimos entonces, que deben de existir además señales que aún no se conocen que pueden ser más específicas y, dado que la mitocondria tiene un rol tan activo en la muerte celular, estas señales podrían estar vinculadas a dicho organelo.

2. Proteína HIG-1 (Hypoxia-induced gene 1)

2.1 Identificación y características generales.

Hypoxia-induced gene 1 (HIG-1/HIGD1A/HIMP-1) es una proteína producto de la expresión del gen *Hig-1*, gen inducido por hipoxia. Esta proteína se sitúa en la membrana interna de la mitocondria. La confirmación de las predicciones acerca de su estructura y localización se obtuvieron de estudios de Wang y colaboradores en células pancreáticas α TC1.6 de ratón, en las que identificaron la proteína HIMP1 homóloga a HIG-1: describieron una proteína con dos dominios transmembrana, un bucle ubicado hacia el interior de la mitocondria y los dominios N-terminal y C-terminal hacia el espacio entre ambas membranas ³⁸.

El gen *hig-1* fue identificado inicialmente, junto a *hig-2*, mediante la técnica RDA (representational differences analysis) como un gen cuya expresión se inducía en condiciones de hipoxia y bajos niveles de glucosa en cultivo de células tumorales de cérvix humanas ³⁹. En rata, el gen fue descrito en nuestro laboratorio como *Hig-1*, gen inducido por hipoxia (AY062253). El locus se sitúa en el cromosoma 8 en el brazo q32 y se describió un ARN mensajero de 447 pares de bases ⁴⁰. Asimismo, posee varias secuencias con alta homología localizadas en distintos cromosomas (cromosoma 3, 7, 10, 12, 17 y X) y algunas de las cuales serían pseudogenes (extraído de la base de datos GenBank). Con respecto a sus propiedades fisicoquímicas, su peso molecular es de 10,8 kDa y su punto isoeléctrico es 9,8.

Pertenece a una familia génica única cuyos dominios transmembrana y el bucle son altamente conservados en eucariotas ³⁸. Esto posiblemente indique que estos dominios interactúan, ya sea entre ellos para formar una estructura oligomérica, tal como un canal, o con algún otro componente de la membrana mitocondrial interna ^{38,41}. Estas proteínas tienen una topología de membrana similar a la de algunas proteínas que forman los canales de potasio. La región N-terminal juega un rol crítico en la función de la proteína, la delección de 26 aminoácidos de esta región lleva a la pérdida de algunas de sus funciones ⁴².

Otros estudios describieron este gen con el nombre de *Himp-1* (Hypoglycemia/ Hypoxia Inducible Mitochondrial Protein) en células pancreáticas de ratón, y se propuso que su función estaría vinculada al aumento de la supervivencia celular en condiciones de hipoxia y bajas concentraciones de glucosa ³⁸. En este último estudio los niveles de expresión de HIMP-1 en

distintos tejidos de ratón fueron determinados mediante ensayos de Western Blot. Se observó que la proteína se expresaba de forma ubicua en varios tejidos, observándose una mayor expresión en el corazón³⁸. Este estudio fue posteriormente ampliado y se analizaron los niveles de expresión de distintas formas de *Hig* en varios tejidos, observándose que en cerebro la forma que presentó mayor nivel de expresión fue *Higd1a*⁴².

El grado de conservación de este gen en los eucariotas, tanto vertebrados como invertebrados, es consistente con la hipótesis de una función esencial que ha sido conservada en la evolución.

2.2 Regulación de HIG-1

La región promotora de este gen en ratones, posee dos regiones HRE (Hypoxia Response Element), elementos reconocidos por el factor de transcripción HIF-1, respondiendo a hipoxia. También responde a SNAP (un donador de NO), DFO y CoCl₂, miméticos de hipoxia que actúan inhibiendo la actividad de proлил- hidroxilasas y por tanto estabilizando a HIF-1⁴². Previamente, Salnikow y colaboradores habían mostrado que, en fibroblastos provenientes de embriones de ratones expuestos a níquel, *Hig-1* se indujo y, que esta inducción es dependiente de HIF-1. Células deficientes en HIF-1 no indujeron la expresión de HIG-1 en estas condiciones⁴³.

También se observó que el silenciamiento de HIF-1 α con siRNA inhibe la expresión de *Higd1a* inducida por la hipoxia⁴².

En nuestro laboratorio, se describió también una región HRE en el promotor del gen, tanto en rata⁴⁰ como en pez cebra⁴⁴. Para el caso de la rata se encontró esta secuencia con el consenso 5'ACGTG(C/T) 3'⁴⁵. En pez zebra se encontró un HRE canónico en la posición -1384/-1380⁴⁴.

A su vez, se ha descrito un ARNm antisentido en el SNC de rata, cuyo rol en la regulación de la expresión de este gen aún no ha sido esclarecida⁴⁰.

2.3 Posible función de HIG-1 frente al estrés celular y la apoptosis

Como mencionamos anteriormente, la proteína HIG-1 se expresa en condiciones de estrés celular generadas por hipoxia y/o bajos niveles de glucosa^{38,39}. Asimismo, cuando se sobreexpresa, aumenta la supervivencia de las células³⁸. Estos resultados sugieren que la expresión de HIG-1 estaría siendo influida por eventos que ocurren frente a una pérdida de homeostasis intracelular y el resultado de su activación sería la supervivencia de la célula. Sin embargo, sus modos de acción, las proteínas con las que interactúa y su mecanismo de inducción aún no se han dilucidado completamente.

No obstante, se han sugerido posibles mecanismos por los cuales la proteína HIG-1 podría estar influyendo sobre los procesos apoptóticos. En este sentido, se describió que la apoptosis inducida por hipoxia mediante la activación de caspasa 9, se produce de forma Citocromo C dependiente o independiente⁴⁶. Debido a que HIG-1 es una proteína mitocondrial y que estaría vinculada al aumento de la supervivencia celular, An y colaboradores buscaron relaciones entre la expresión de HIG-1 y la liberación del Citocromo C durante la apoptosis. Observaron que en macrófagos RAW transfectados con *Hig-1* se produce una inhibición de la liberación del Citocromo C, sugiriendo que HIG-1 opera bloqueando la vía mitocondrial de muerte celular. Dado que esta vía es crítica para la apoptosis en muchos tipos de células, HIG-1 podría tener un efecto anti-apoptótico generalizado⁴².

Por otra parte, se observó en humanos, que frente a condiciones de estrés severo, la proteína HIGD1A, se transloca al núcleo ⁴⁷. Varios factores mitocondriales como AIF ⁴⁸ y GAPDH ⁴⁹ o, FKBP51 ⁵⁰ también se translocan al núcleo frente a condiciones de estrés severo y, la función nuclear de estos factores es modular las vías de muerte celular. Por lo tanto, HIGD1A también podría tener una función nuclear, vinculada a la regulación fina de los destinos de las células en condiciones de estrés severo ⁴⁷.

2.4 HIG-1 y la integridad mitocondrial

Otros investigadores analizando el rol de HIG-1 en cultivos celulares de neuroblastomas, observaron que HIG-1 es un regulador de la enzima γ -secretasa, y se vincula con el mantenimiento de la función mitocondrial participando en la supresión de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) ⁵¹.

Estudios posteriores profundizaron en el rol de HIG-1 en el mantenimiento de la integridad mitocondrial, demostrando que HIG-1 regula la fusión mitocondrial (necesaria para mantener la integridad morfológica y funcional de las mitocondrias), mediante la inhibición del clivaje de OPA-1 ⁵².

Algunos autores sugieren que mediante la regulación de la homeostasis mitocondrial, HIGD1A puede permitir a los tejidos en donde se expresa, resistir los estímulos externos tales como la hipoxia ⁵².

2.5 HIG-1 durante la etapa postnatal

Estudios previos en el laboratorio sobre la expresión génica durante el desarrollo y la remodelación del SNC en rata, mostraron cambios en la expresión de este gen, durante el desarrollo postnatal ⁴⁰.

Los resultados de experimentos de RT-PCR semicuantitativa mostraron que la expresión del ARNm de *hig-1* aumenta en los primeros días de vida postnatal desde el día 1 de vida (P1) al 15 (P15) en la médula espinal. El aumento del ARNm entre P1 y P8 es significativo, siendo la expresión de P1 aproximadamente un 40% de la expresión encontrada para P8.

Se observó también por hibridación *in situ* que el patrón de distribución del mensajero de *Hig-1* en el cerebro es amplio y mayoritariamente neuronal tanto en P1 como P8. En cambio en la médula, el patrón de distribución mostró diferencias entre P1 y P8, centrándose mayoritariamente en áreas correspondientes a la lámina II y III del asta dorsal y la lámina IX del asta ventral en P1, y tornándose más generalizada hacia P8 ⁴⁰. A su vez se analizó mediante inmunofluorescencia el patrón de distribución de la proteína en médula espinal de ratas machos P1, P8, P15 y P90. Se observó la presencia de la misma mayoritariamente en neuronas en P1 y P8, cambiando el patrón hacia células astrocitarias en P90 ⁵³. En todas las edades la proteína parece abundante y presenta patrones particulares por lo que es posible pensar que tenga un significado funcional, sea por su relación con la vía mitocondrial de la apoptosis o por otras interacciones con la función mitocondrial.

3 Núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media

Un ejemplo de área que sufre remodelación mediante la vía mitocondrial de apoptosis fundamentalmente durante la etapa postnatal, es el núcleo sexualmente dimórfico del área

preóptica media de rata (SDN- MPOA), cuyo volumen es hasta ocho veces mayor en machos adultos que en hembras ⁵⁴ (Fig. 2).

3.1 Formación y función del núcleo

Pese a que originalmente el SDN-MPOA se definió en base a densidad celular e intensidad de tinción, recientemente se lo ha descrito por criterios de citoarquitectura como parte de un núcleo definido: el núcleo preóptico medial (MPN). El SDN-MPOA abarca tres partes del MPN, la división central (MPNc), la anteroventral (MPNav), y parte de la división medial ⁵⁵. Los dimorfismos sexuales observados en el MPNc y MPNav son, en gran parte, los responsables del dimorfismo sexual observado en el volumen del SDN-MPOA (Davis *et al.*, 1996).

Las funciones fisiológicas del SDN-MPOA aún no se han determinado completamente. Sin embargo, se observó que lesiones bilaterales discretas en este núcleo, retrasan la aparición y disminuyen el comportamiento sexual masculino en ratas macho adultas "naive" ⁵⁶, lo que sugiere que el SDN-MPOA está involucrado en la modulación del comportamiento sexual de machos ⁵⁷.

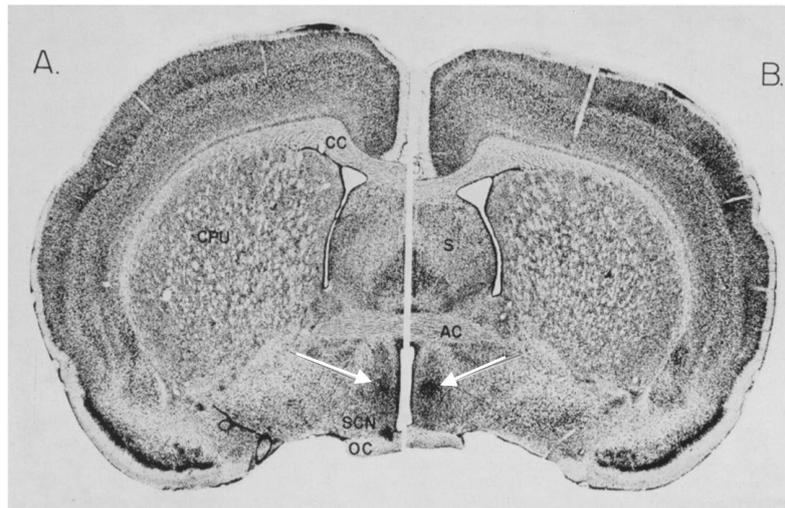


Fig. 2. Núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media. Secciones coronales de cerebro de ratas adultas, las flechas indican al núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media. A. Hembra. B. Macho. AC: Comisura Anterior. CC: Cuerpo Calloso. CPU: Caudado Putamen. OC: Quiasma óptico. S. Septum. SNC: Núcleo supraquiasmático (Modificado de Gorski *et al.*, 1978).

La diferencia de volumen entre machos y hembras en este núcleo se debe a un mayor número de células en machos, y se establece en los primeros días de vida postnatal ^{58,59} (ver Fig. 3), debido a una mayor tasa de células apoptóticas en hembras que en machos ^{59,60}. La diferencia en volumen y en número de células se establece ya en el día 1 de vida postnatal y en el día 5 es muy marcado. Algunos investigadores han mostrado que el volumen del SDN-MPOA de rata y la tasa de células apoptóticas en dicho núcleo, se pueden ver afectados por el efecto hormonal en neonatos. Su tamaño disminuye en machos castrados en el período neonatal ⁵⁴. Por el contrario, en las ratas hembras tratadas con propionato de testosterona (TP) durante el período perinatal o postnatal se incrementa el volumen de SDN-MPOA al mismo que el de machos normales ^{54,58}. Este mismo tratamiento en hembras en la edad adulta ya no es efectivo para cambiar el tamaño del SDN-MPOA, mientras que la inyección de 17 β -estradiol en ratas

hembra en el período postnatal aumenta el tamaño del núcleo en la edad adulta ⁶¹, indicando que los efectos de los andrógenos aromatizados (estrógenos) durante el período perinatal son importantes en el establecimiento del dimorfismo sexual del SDN-MPOA ⁶⁰.

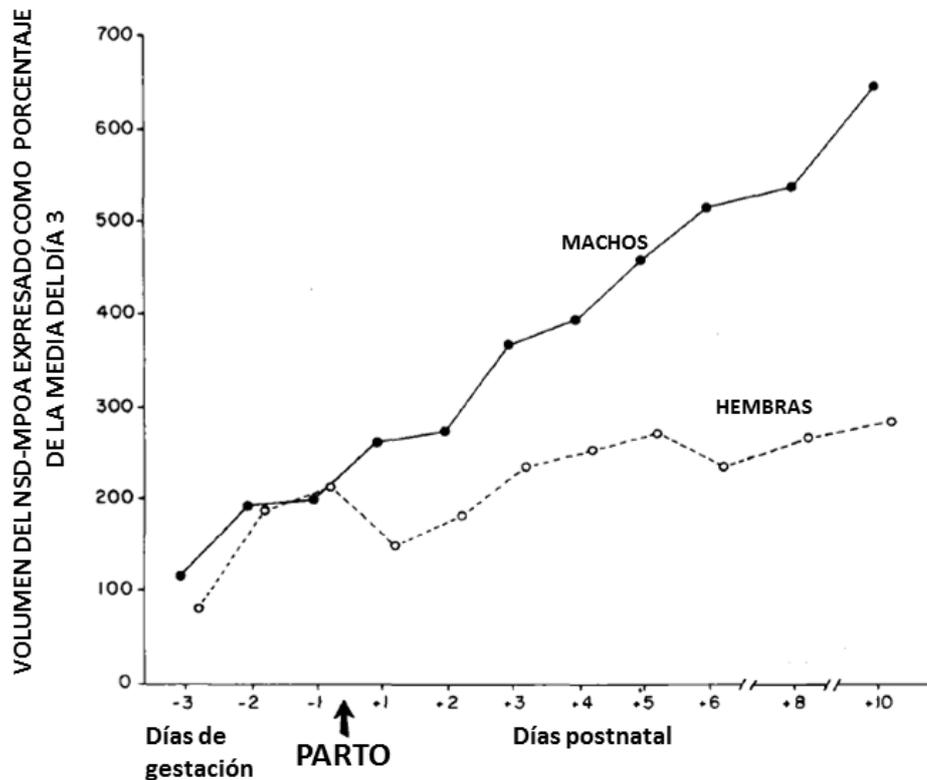


Fig. 3. Cambios en el volumen del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media (SDN-MPOA) en crías machos y hembras desde el día 20 de gestación (-3) hasta el día 10 postnatal (+10). Los datos se presentan como porcentajes del volumen medio observado en machos y hembras sacrificados 3 días antes del día del nacimiento (20 días después de la fertilización) (Modificado de Gorski, 1984).

3.2 SDN- MPOA y regulación de la vía mitocondrial de apoptosis

Como mencionamos anteriormente, el proceso de apoptosis sería uno de los mecanismos involucrados en la formación de varios núcleos con dimorfismo sexual como el SDN-MPOA durante la etapa postnatal ⁵⁹. En este sentido, estudios previos han reportado que la vía mitocondrial de muerte celular regulada por Bcl-2 y Bax desempeñaría un papel crítico en la formación de varios núcleos con dimorfismo sexual ⁴.

En el caso de SDN-MPOA se ha observado que la mayor parte de las células inmunoreactivas para caspasa-3-activa en ratas postnatales también mostraron inmunoreactividad para NeuN, un marcador específico neuronal ⁶², siendo este mecanismo responsable de las diferencias sexuales en el número de células apoptóticas en la SDN-MPOA (Fig. 4) ⁶⁰. Esto indica que la muerte celular neuronal, como resultado del control mitocondrial de la apoptosis durante el desarrollo, contribuye significativamente a las diferencias de sexo en el número de células en la SDN-MPOA en la edad adulta.

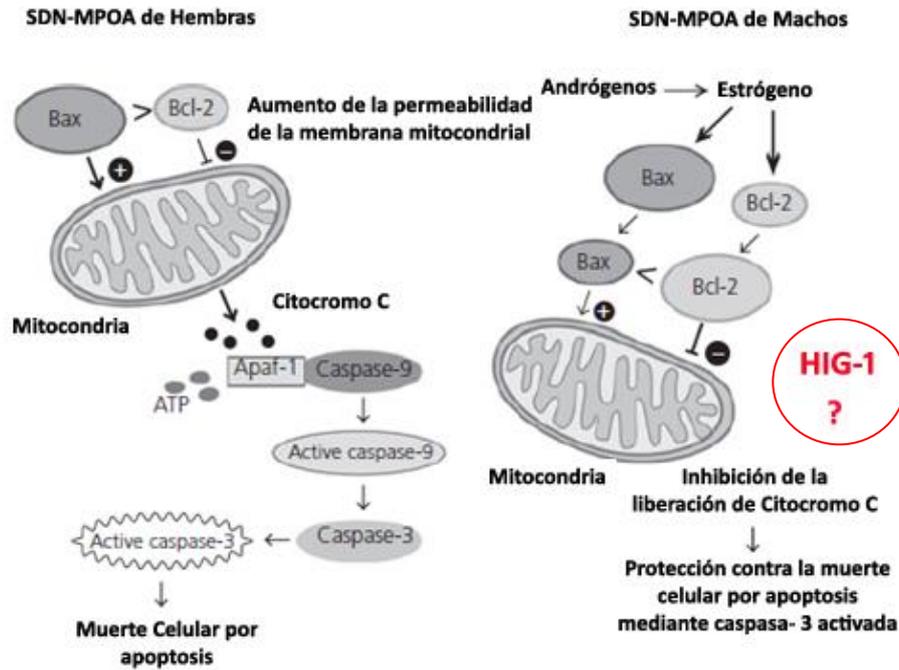


Fig. 4. Esquema que ilustra uno de los mecanismos posiblemente responsables de la creación del dimorfismo sexual en el número de células que forman el área preóptica media. Modificado de Tsukahara, 2009.

Por lo visto anteriormente la proteína HIG-1 cumpliría una o más funciones de señalización en el SNC y probablemente estaría asociada a un rol citoprotector. Proponemos que conocer con mayor detalle los niveles de expresión y el patrón de distribución puede contribuir a la comprensión de su significado. En particular, en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media, núcleo sexualmente dimórfico debido a una masiva muerte celular por apoptosis en la hembra, HIG-1 podría funcionar como señal citoprotectora expresándose diferencialmente en machos.

HIPÓTESIS

Asumiendo que importantes procesos de remodelación y maduración ocurren a lo largo de las dos primeras semanas de vida en la rata, proponemos la siguiente hipótesis:

Los niveles de expresión de HIG-1 varían de acuerdo al sexo, la edad y la región del SNC en las dos primeras semanas de vida.

La proteína HIG-1, dado su rol en la inhibición de la apoptosis, presenta un patrón de expresión dimórfico en el SDN-MPOA, siendo mayor en los machos que presentan menor número de células apoptóticas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los niveles de expresión y el patrón de distribución de la proteína HIG-1 en el SNC de ratas de distintas edades y de acuerdo al sexo.

Objetivos específicos

Analizar la presencia de la proteína HIG-1 en algunas regiones del cerebro de crías de rata de 5 y 8 días de vida y de ambos sexos mediante inmunohistoquímica.

Determinar los tipos celulares que expresan la proteína HIG-1 mediante inmunofluorescencia.

Cuantificar por Western Blot los niveles de expresión de HIG-1 en médula, corteza y diencéfalo de crías de rata de 1, 5, 8 y 15 días de edad, de ambos sexos y en machos de 42 días de edad.

Corroborar el dimorfismo sexual en el área del NSD-MPOA, en animales de 5 y 8 días.

Corroborar el patrón de expresión sexualmente dimórfico de caspasa-3-activada en el SDN-MPOA de animales de 8 días.

Determinar si existe un patrón de expresión dimórfico de HIG-1 en el SDN-MPOA, en animales de 5 y 8 días de edad mediante inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA), y en la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias y sus protocolos se ajustan a las disposiciones vigentes en la Ley Nº 18611 y fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal.

Diseño experimental

Como se muestra en la fig. 5, el trabajo utilizó el modelo de rata y en particular, crías de 1, 5, 8, y 15 días de edad, de ambos sexos, y machos de 42 días de edad para realizar los experimentos en relación a los objetivos planteados.

Por un lado, se cuantificaron los niveles de la proteína HIG-1 en el SNC mediante Western Blot, utilizando muestras extraídas de médula, corteza parietal y diencéfalo de animales de las edades indicadas.

Por otro lado, se estudió el patrón de distribución de la proteína HIG-1 en el cerebro de crías de rata de 5 y 8 días de vida, mediante inmunohistoquímica. El protocolo de inmunohistoquímica con cortes en flotación y revelando con Diaminobencidina (DAB), fue empleado para estudiar el patrón de distribución de la proteína en el cerebro y para cuantificar los niveles de la misma en el SDN-MPOA. A su vez, se utilizó la misma técnica sobre cortes en portaobjeto y revelado con fluorescencia, para estudiar en qué tipos celulares se expresa la proteína.

En todos los casos se procesó la información de las imágenes y los datos se analizaron estadísticamente.

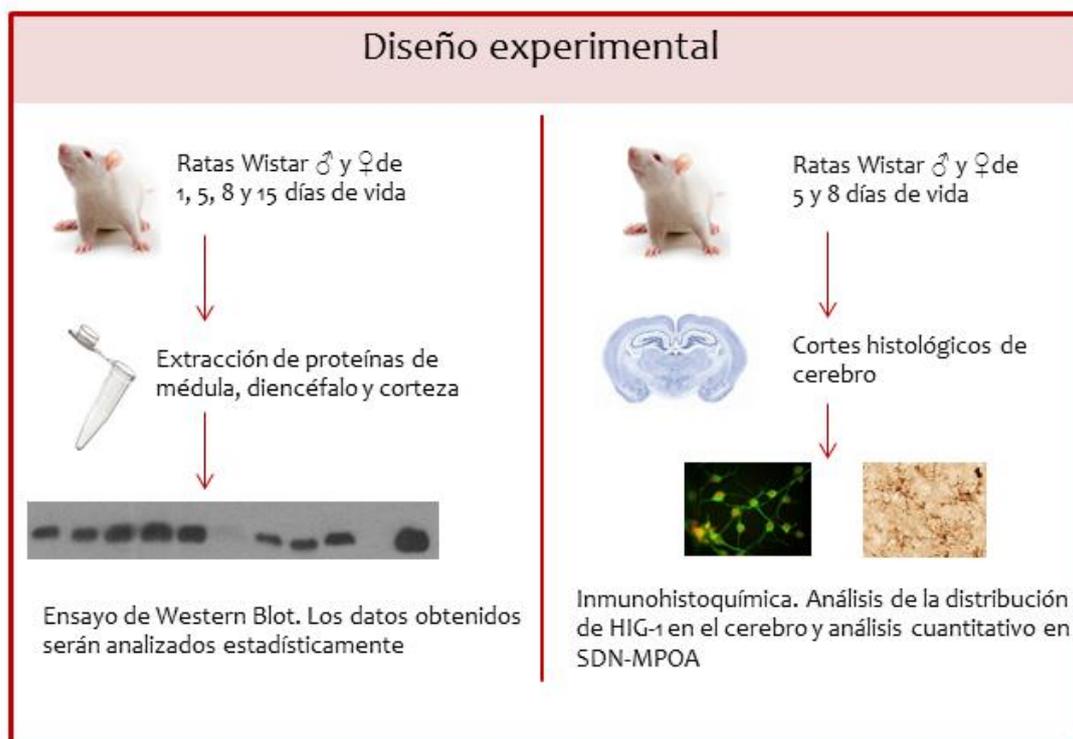


Fig. 5. Diseño experimental. Esquema que resume la estrategia general para el análisis de la expresión de HIG-1 en el SNC de crías de rata de 1, 5, 8 y 15 días de edad.

1 Animales

Se utilizaron crías de ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) de 1, 5, 8 y 15 días de edad (P1, P5, P8 y P15 respectivamente), de ambos sexos, y machos de 42 días de edad provenientes de camadas igualadas a 8 individuos (4 hembras y 4 machos) en el día del nacimiento (día 1 post-parto). Los animales fueron alojados bajo temperatura y humedad controladas ($22\pm 1^\circ\text{C}$ y 65%, respectivamente), en un ciclo de 12 h de luz-oscuridad (luces se encienden a las 0500 h) y con alimento y agua *ad libitum*, en el Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias.

2 Determinación del patrón de expresión de la proteína HIG-1 por inmunohistoquímica

2.1 Preparación del tejido

Las crías se anestesiaron con pentobarbital (80mg/kg) y se perfundieron de forma transcardíaca con solución salina fosfatada 0.05 M (PBS pH 7.5) heparinizada (0,5%), seguida de solución de paraformaldehído al 4% en PBS. El cerebro se removió y sumergió para su fijación en una solución de paraformaldehído al 4% durante 48 hs, seguido de una solución de sacarosa al 15% y 30% para criopreservar el tejido que luego fue congelado en isopentano y conservado a -80°C .

2.2 Cortes

Los cortes de las áreas de interés del cerebro, se realizaron en criostato (Cryocut E. Reichert-Jung).

Los cortes para inmunohistoquímica con tinción DAB fueron de 40 μm de espesor, se recibieron en una solución "antifreeze" y se conservaron a -20°C hasta su uso. En tanto que los cortes para inmunofluorescencia fueron de 25 μm y se recibieron directamente sobre portaobjetos tratados con polilisina o portaobjetos cargados (Starfrost). Fueron conservados a -20°C hasta su uso.

Debido a que en esta edad la mielinización no está completa aún, se seleccionó los grosores de cortes considerando que se preservara la integridad del tejido pero a la vez se garantizara que la penetración del anticuerpo fuera efectiva. Una serie de secciones por animal fue utilizada para la inmunohistoquímica con el anticuerpo específico para la proteína HIG-1 mientras que la serie adyacente se coloreó por la técnica de Nissl para la identificación de las áreas.

2.3 Inmunohistoquímica en cortes "free floating" y tinción con DAB

Los cortes obtenidos previamente fueron incubados con un anticuerpo contra HIG-1 y revelados con Diaminobencidina (DAB) para determinar en qué regiones del cerebro se expresa HIG-1. Para ello se bloquearon los sitios inespecíficos y las peroxidasas endógenas (ver protocolo en Anexo). Se incubó posteriormente con el anticuerpo policlonal específico contra la proteína HIG-1 (citado en el ítem Materiales y Métodos en la Tabla 1) a una concentración 1:3000 durante 48 horas a 4°C , y luego, con un anticuerpo secundario biotilado anti IgG de conejo hecho en burro a una concentración 1:600, durante 90 min a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el Complejo Avidina-Biotina, (Vectastain® Elite® ABCKit de Vector Laboratories) a una concentración de 1:600 por el lapso de 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. El uso de anticuerpo biotilado y complejo avidina-biotina promueve una amplificación de la señal. Los cortes se revelaron con una solución de DAB 0.02% /Peróxido de Hidrógeno 0.003%, hasta que se obtuvo la coloración deseada. Por último, se montaron sobre portas, se deshidrataron en soluciones de alcohol de concentraciones crecientes y se sellaron con montante Entellan (Ver Protocolo en Anexo).

Para el análisis de los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica, se utilizó el software FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). En varias regiones del cerebro se realizó un análisis cualitativo estimándose la menor o mayor expresión de la proteína HIG-1 en base a la cantidad e intensidad de la señal. En cambio, en base a los objetivos propuestos, los niveles de proteína en el SDN-MPOA, entre machos y hembras, de 5 y 8 días de vida fueron analizados de forma cuantitativa.

2.4 Análisis cuantitativo de las imágenes

Para el análisis de los niveles de HIG-1 en el SDN-MPOA resulta necesario en primer lugar definir con precisión el lugar donde se encuentra el núcleo. Dado que en las imágenes de inmunohistoquímica, no resultaron evidentes los límites del núcleo, se utilizaron cortes con tinción de Nissl, que tiñe los corpúsculos de Nissl, acumulaciones basófilas presentes en el citoplasma de las células nerviosas y, que permitió identificar claramente el núcleo (Ver fig de la introducción). Una vez que se obtuvieron los cortes con el SDN-MPOA se buscó entre los utilizados en inmunohistoquímica, el corte siguiente en base a referencias anatómicas.

Mediante el programa Adobe® Photoshop® 7.0, se procedió a superponer las imágenes provenientes de la tinción de Nissl y las de inmunohistoquímica, de manera que al superponerlas se pudo delimitar el núcleo.

Para la cuantificación de la señal positiva, que reflejaría expresión de proteína HIG-1 en el núcleo, se procesó la imagen como se describe en detalle en el anexo. En esencia, sobre la imagen en escala de grises se fijó un umbral de intensidad, a partir del cual se cuantificaría como inmunoreactividad positiva. Sobre este umbral mínimo se cuantificó en un rango en la escala de grises que se interpreta como la expresión de la proteína HIG-1. A su vez, se fijó un rango dentro del anterior con los niveles más altos (es decir, señal más intensa), que se utilizó para fijar un umbral al que llamamos “intenso” correspondiente a regiones que presentarían mayor expresión de HIG-1.

El dato que se obtiene es un valor de área: el área que se encuentra en los rangos fijados anteriormente. Este valor de área posteriormente se expresa como un porcentaje, respecto al área total de SDN-MPOA (Ver Ec. 1), tanto del lado izquierdo como del derecho y estos datos de ambos lados son sumados y tomados como un valor único para una muestra. En el caso que se tenga más de un corte, en el sentido antero-posterior, se promediarán esos datos. Estos valores de promedio, serán a su vez promediados entre los individuos (n=3), tanto para los animales de 5 y 8 días de vida

$$\% \text{ del área con señal positiva para HIG1 de una muestra} = \frac{\text{Área inmunoreactiva}}{\text{Área total del NSD - MPOA}} \times 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de área del SDN-MPOA con inmunoreactividad positiva para HIG-1

2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con test de ANOVA de dos vías con el fin de analizar si existen diferencias significativas de acuerdo al sexo o la edad en los niveles de HIG-1 en el SDN-MPOA.

3 Determinación de la localización de la proteína HIG-1 y otros marcadores en SNC por inmunofluorescencia

Se optó por esta técnica para caracterizar más claramente la señal de HIG-1 y permitir la co-localización con otros anticuerpos para definir en qué tipos celulares se expresa. Para ello, se sometieron cortes de 20-25 μm a un tratamiento para exponer los epítopes (Ver protocolo en anexo). Luego, se bloquearon los cortes con una solución de PBS 1X Tween 0,1%- BSA 4%. Posteriormente, se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo primario específico para HIG-1 (Ver tabla 1), a una concentración 1:400 durante toda la noche a 4°C. Se incubó con un anticuerpo secundario Alexa 488 anti IgG de conejo hecho en cabra a una concentración 1:1000. Luego se montó (ver protocolo en Anexo), con un montante que contiene 50% de glicerol, PBS 1X y DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A su vez, se buscaba identificar en qué tipo de subpoblaciones celulares se expresa HIG-1. Con este fin, se utilizan anticuerpos que marcan proteínas específicas de determinados linajes celulares. Estas proteínas son GFAP (Proteína ácida fibrilar glial), un marcador específico de astrocitos y, β -3-Tubulina un tipo de tubulina que sólo se expresa en neuronas (durante el desarrollo fetal y postnatal, y sus niveles decrecen hacia la edad adulta). Estos anticuerpos han sido generados en especies distintas, lo que permite el uso de anticuerpos secundarios contra IgGs de distintas especies, unidos a fluoróforos que tienen distintos espectros de excitación y

emisión (ver tabla 1). También se marcaron los núcleos con DAPI, un intercalante del ADN que fluoresce cuando es excitado en 358 nm (UV) y emite en 461 nm (azul/ cian).

Estas cuatro marcas permitirán mostrar en qué regiones del cerebro se expresa HIG-1, en qué linajes celulares y, en qué localización subcelular, citoplasma o núcleo.

Por otro lado como parte del análisis de los niveles de HIG-1 en el SDN-MPOA se buscó corroborar el dimorfismo sexual en el número de células apoptóticas en este núcleo, utilizando un anticuerpo específico para Caspasa-3-activada.

Las imágenes de los cortes de inmunofluorescencia fueron obtenidas mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i con una cámara Nikon Digital Sight DS-5Mc y un Microscopio Confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemania) y analizadas con los Software LAS AF y FIJI.

4 Cuantificación de la proteína HIG-1 en SNC por Western Blot

4.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Las crías fueron sacrificadas por decapitación y se procedió a disecar la médula, corteza parietal y el diencéfalo de crías P1, P5, P8 y P15 de ambos sexos (n=3). A su vez, se utilizaron muestras de las mismas regiones provenientes de animales de 42 días de edad (P42) (n=2), para un análisis preliminar de los niveles de HIG-1.

Las muestras obtenidas fueron homogeneizadas en buffer de extracción de proteínas, "Urea Cracking Buffer" ("Urea Cracking Buffer" 10mM, PMSF 1mM, β -mercaptoetanol 1% y Cocktail inhibidor de proteasa Sigma-Aldrich #catálogo P2714 1%), y conservadas a -20°C (Ver protocolo en anexo). Además, las muestras de médula fueron tratadas con acetona para reducir los lípidos que pudieran contener (Ver protocolo en anexo).

Las proteínas obtenidas se cuantificaron utilizando el reactivo de Bradford (Quick Start™ Bradford 1X Dye reagent de Bio-Rad Laboratories). Para ello, se utilizaron dos diluciones seriadas 1:10 y 1:20 que se sembraron por duplicado en una placa de 96 pocillos, utilizando un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (Albumin fraktion V pH 7,0 de AppliChem), de concentración conocida, en un rango de 0 a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se aplicaron 5 μL de muestra y 150 μL del reactivo de Bradford y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

4.2 Ensayo de Western Blot

Las proteínas obtenidas, provenientes de médula, corteza parietal y diencéfalo fueron analizadas mediante ensayo de Western Blot. En cada ensayo, se sembraron las proteínas provenientes de una región en particular, de individuos de cada una de las edades y de ambos sexos. Cada ensayo contó además con una muestra que se usó posteriormente para la normalización de los datos, proveniente de corteza parietal de macho de 15 días de edad. Cada ensayo se realizó dos veces a modo de duplicado técnico, partiendo desde la cuantificación de las proteínas.

4.2.1 Separación de las proteínas en base a su Peso Molecular

El ensayo de Western Blot se inicia con una electroforesis de las muestras de proteínas por la técnica SDS-PAGE. Las concentraciones que se utilizaron para los geles son: 3,75 % para el gel concentrador y, 12% para el gel separador, y se sembró en cada pocillo 15 μg de proteínas. (Ver en anexo preparación de los geles y las muestras).

Se utilizó un Buffer de Corrida que contiene Buffer Tris (25mM)-Glicina (192 mM) pH=8,3. La técnica se realizó en una cuba ENDURO™ Electrophoresis Systems de Labnet con un voltaje de 300 V y una intensidad de 25 mA, por el lapso de 1h- 1h 10 min.

4.2.2 Transferencia de las proteínas a una membrana

Una vez separadas las proteínas en base a su peso molecular, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Biorad Laboratories 0.45 μm) en la cuba de transferencia TE 22

Tank Transfer Unit de de Amersham Biosciences, con un Buffer de transferencia (Tris 25 mM Glicina 192 mM Etanol 20%), en el que se equilibró la membrana y el gel durante 10 min, y se transfirió durante 1 hora y 30min a 4°C (Ver protocolo en anexo). El voltaje y la intensidad que se utilizaron fueron de 100 V y 300 mA, respectivamente.

Finalmente, se procedió a teñir la membrana con Rojo Ponceau, y el gel con Azul de Coomassie para evidenciar la eficiencia de la transferencia. La membrana teñida se escaneó para una posterior cuantificación de la cantidad de proteína efectivamente cargada en cada carril.

4.2.3 Inmunoensayo con anticuerpo anti-HIG-1

La membrana con las proteínas transferidas, se bloqueó durante toda una noche a 4°C con una solución Tris (20 mM)- NaCl (500 mM)- Leche 5% (TBS-Leche 5%) pH= 7,5. Se incubó con un anticuerpo específico contra la proteína HIG-1 de ratón generado en conejo, (ver Tabla 1) a una concentración 1:1000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa, a una concentración 1:5000, en la misma solución que el anticuerpo primario. El revelado es basado en la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario y se utilizó un sustrato luminiscente con kit ECL (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de Thermo Scientific). La detección se hizo por autorradiografía y la señal se cuantificó con el software ImageJ (Ver ítem 2.2.5)

4.2.4 Búsqueda de proteína para corregir

Para la cuantificación de la expresión de la proteína en base a la señal de Western Blot es recomendable utilizar la señal de una proteína que permita corregir los datos en cuanto a uniformidad de carga de proteína. Para ello, se ensayaron cuatro proteínas provenientes de vías diferentes y de expresión constitutiva, que se esperaba no variasen su expresión en las distintas regiones del cerebro, ni a lo largo de las diferentes edades. Se incubaron las membranas con anticuerpos específicos para Histona 1, Actina, GAPDH (Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa) y, GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial) (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en las técnicas western Blot e Inmunohisquímica. Se presentan la especificidad de los mismos y las diluciones de uso según la técnica. En el caso de los anticuerpos secundarios se presenta además a qué fluorosforo o enzima están acoplados.

Proteína	Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución	Acoplada a
HIG-1	α -HIG-1 cedido por Dr. Steiner (University of Chicago)	WB. 1:1000	Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) Peroxidase conjugate. Developed in Goat.(Sigma)	1:5000	Peroxidasa
		IHQ DAB 1:3000	Anti- Rabbit IgG peroxidase conjugate. Developed in Donkey.	1:600	Biotilnado acoplado a peroxidasa
		IHQ Fluor 1:400	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	1:1000	Alexa 488
GFAP	GFAP de Neomarkers (Thermo Fisher, Lab Vision, USA).	WB. 1:400	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:5000	Peroxidasa
		IHQ Fluor 1:400	Rhodamine antimouse IgG antibody (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)	1:1000	Rhodamina
GAPDH	Mouse anti-GAPDH (Invitrogen)	WB. 1:2000	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:5000	Peroxidasa
Actina	Actina (Sigma-Aldrich)	WB. 1:5000	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:5000	Peroxidasa
B-3-Tubulina	Beta-3-Tubulina (TU-20) mAb (Cell Signaling Technology)	WB. 1:1000	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:5000	Peroxidasa
		IHQ Fluor 1:100 1:200 1:300 1:400 1:600	Rhodamine antimouse IgG antibody (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)	1:250	Rhodamina
		IHQ Fluor	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	1:1000	Alexa 488
Histona-1	Histone H1 (FL-219): sc-10806 (Santa Cruz Biotechnology, INC).	WB. 1:100 1:200	Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) Peroxidase conjugate. Developed in Goat. (Sigma)	1:5000	Peroxidasa
Caspasa-3 activada	Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody (Cell Signaling Technology)	WB. 1:1000	Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) Peroxidase conjugate. Developed in Goat. (Sigma)	1:5000	Peroxidasa
		IHQ Fluor 1:1000 1:1500	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	1:1000	Alexa 488

4.3 Análisis de los resultados obtenidos de Western Blot

Los datos obtenidos mediante Western Blot, fueron analizados con el programa Image J. El valor obtenido de densidad óptica de la señal en la autorradiografía de una muestra determinada, fue corregido con respecto al valor obtenido de densidad óptica del carril correspondiente, en la tinción de la membrana con Rojo Ponceau (total de proteína cargada en el carril) (Ver Ec. 2).

$$\text{Dens. ópt. corr. de una muestra} = \frac{\text{Dens. ópt. la señal autorradiográfica}}{\text{Dens. ópt. de un carril } n \text{ en la membrana teñida}}$$

Ecuación 2. Corrección de carga realizada a cada una de las muestras

Este nuevo valor así obtenido, fue normalizado con el obtenido mediante la ecuación 1 para una muestra que estuvo presente en todos los ensayos de western blot. Esta muestra corresponde a una corteza parietal de un macho de 15 días de vida (Ver Ec. 3). Esta muestra no es procesada como parte del n.

$$\text{Valor norm. para una muestra} = \frac{\text{Dens. ópt. corregida de una muestra}}{\text{Dens. ópt. corregida para muestra Corteza}}$$

Ecuación 3. Normalización de los datos obtenidos mediante Western Blot

Una vez obtenido el valor normalizado para cada una de las muestras, éste se promedió con su duplicado técnico. De esta manera se obtuvo un valor único, corregido y normalizado, para cada región del cerebro a analizar, de cada uno de los individuos y para cada edad. A este nuevo valor se lo llamó “Niveles de expresión de HIG-1 en una muestra” (Ver Ec. 4).

$$\text{Niv. de exp. de HIG1 en una muestra} = \frac{\text{Valor norm. de una muestra} + \text{Valor norm del dupl. técnico}}{2}$$

Ecuación 4. Valor final obtenido para cada muestra de los niveles de HIG-1

Se calcularon los promedios de las muestras de los tres individuos de una edad, de un mismo sexo, y de una misma región. Esto se realizó para cada una de las edades, para ambos sexos y para cada una de las regiones. Estos datos son los que se presentan en gráficas (ver ítem Resultados).

4.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey con un $p \leq 0.05$, con el fin de determinar si existen diferencias en la expresión de HIG-1 entre las edades.

RESULTADOS

1 Determinación del patrón de expresión de la proteína HIG-1 en SNC

1.1 Caracterización del patrón general de expresión de HIG-1 por inmunohistoquímica

Con el fin de identificar qué áreas del SNC expresan HIG-1 durante la etapa postnatal, secciones correspondientes a cerebros de crías fueron analizados por técnicas inmunohistoquímicas con un anticuerpo específico para HIG-1. Se determinó el patrón de distribución de la proteína en machos y hembras de 5 y 8 días de edad.

Se observó que la misma tiene una amplia distribución que abarca muchas regiones del cerebro, destacándose algunas regiones con una expresión más notoria. En la distribución general no se encontraron diferencias entre ambos sexos ni entre las dos edades analizadas. En la tabla 2 se resumen algunas de las regiones analizadas, se presentan regiones del SNC con y sin expresión de HIG-1.

Como puede observarse en las fotografías de cortes revelados con DAB (Fig. 6A-E) regiones como el núcleo endopiriforme, la amígdala basolateral, el caudado putamen, el pallidum ventral y el nervio óptico mostraron una expresión notoria de la proteína, mientras que otras áreas del cerebro no presentaron señal (Ver fig. 6 F).

A nivel del tronco encefálico se encontraron varios núcleos con expresión de HIG-1 (Ver fig. 7). Entre ellos, se destacan los colículos inferiores, núcleo mesencefálico del par V, núcleo del lemnisco lateral, núcleo del pontis oralis, núcleo del cuerpo trapezoide, núcleo motor del V par, núcleos del Raffe, núcleo de la oliva, y varios núcleos de la formación reticulada.

Al analizar en detalle varias de las regiones con inmunoreactividad positiva para HIG-1, pudimos constatar un patrón de distribución diferencial de acuerdo a la morfología celular. En este sentido, en regiones como el hipocampo, amígdala, corteza y corteza piriforme observamos que la proteína se expresaba en células de tipo neuronal. En tanto, regiones que se caracterizan por la presencia de sustancia blanca, como el cuerpo calloso y nervio óptico, el patrón de distribución es específico para ciertas células que, en base a su morfología, podríamos sugerir que son astrocitos. Esta descripción de los linajes celulares que expresaron HIG-1 fue preliminar, en base a la morfología celular, luego se emprendió la confirmación mediante colocalización con marcadores de los distintos linajes mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Tabla 2. Regiones del SNC con presencia/ ausencia de expresión de HIG-1.

Región del SNC	HIG-1	Región del SNC	HIG-1
Hipocampo	+	Tronco encefálico	+
Caudado putamen	+	Colículos inferiores	+
Corteza piriforme	+	Núcleo mesencefálico del par V	+
Núcleo endopiriforme	+	Núcleo del lemnisco lateral	+
Amígdala	+	Pontis oralis	+
Pallidum ventral	+	Núcleo del cuerpo trapezoide	+
Comisura anterior	+	Núcleo motor del V par	+
Cuerpo caloso	+	Núcleos dorsal del Raffe	+
Nervio óptico	+	Núcleos de la oliva	+
Área preóptica media	+	Pedúculo cerebeloso medio	+
SDN-MPOA	+	Acueducto de Silvio	+
Corteza parietal	+	Núcleo sensorial del V par	+
Región de la Corteza cerebral	-	Núcleo tegmental ventral	+
Sustancia blanca cerebral profunda	-	Núcleo reticular pontino	+
Haz medial del cerebro anterior	-	Tracto rubroespinal	+
		Raíz sensorial del nervio trigémino	+

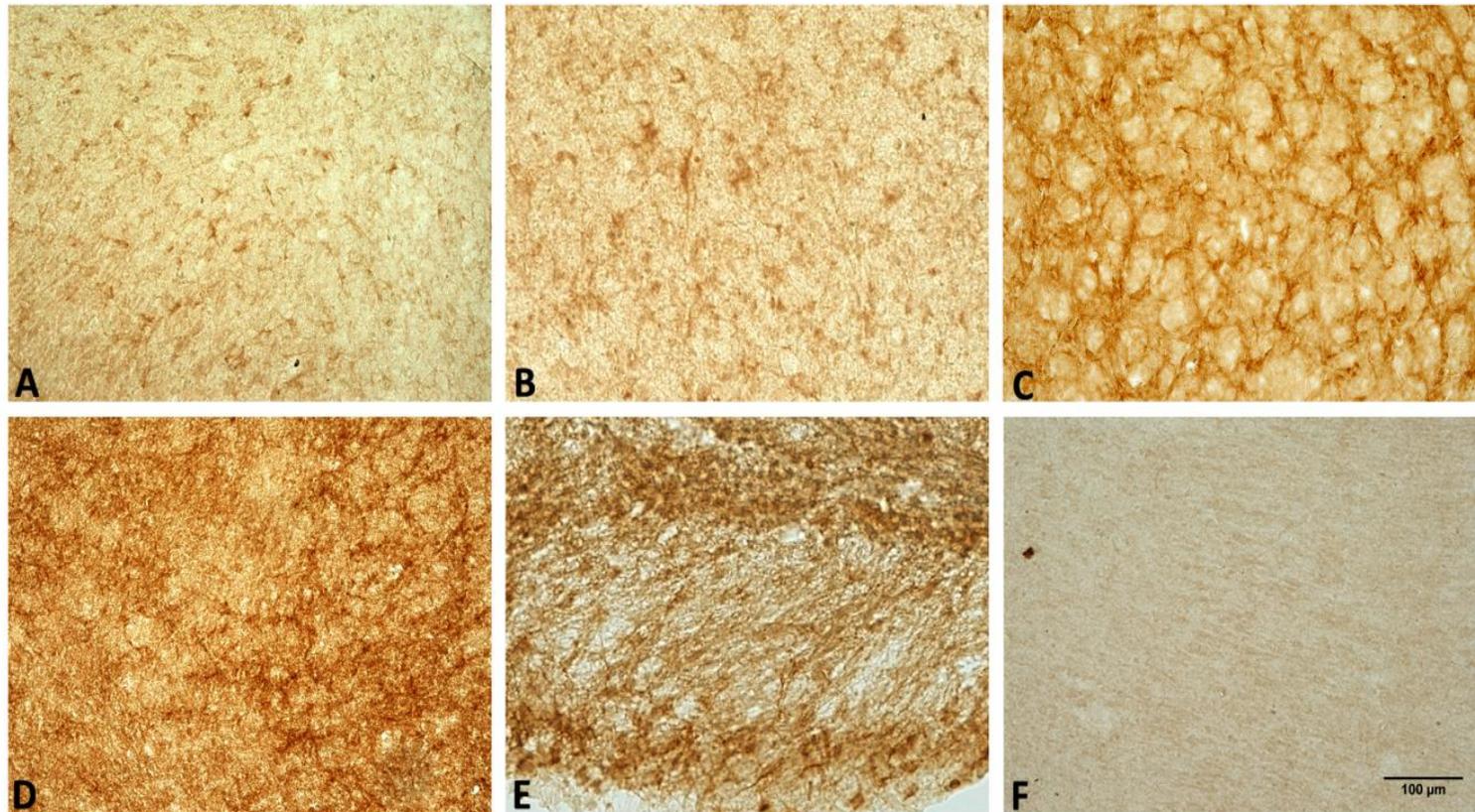


Fig. 6. Regiones del cerebro con presencia de HIG-1. Ensayo realizado sobre cortes coronales de 40 μm de animales P8, incubados con anticuerpo primario α -HIG-1 1:3000 y anticuerpo secundario α -IgGs de conejo 1:600 acoplado a peroxidasa. Los cortes fueron observados mediante microscopía de campo claro. A. Núcleo endopiriforme. B. Amígdala basolateral. C. Caudado putamen. D. Pallidum ventral. E. Nervio óptico. F. Región de la corteza parietal. La barra corresponde a 100 μm .

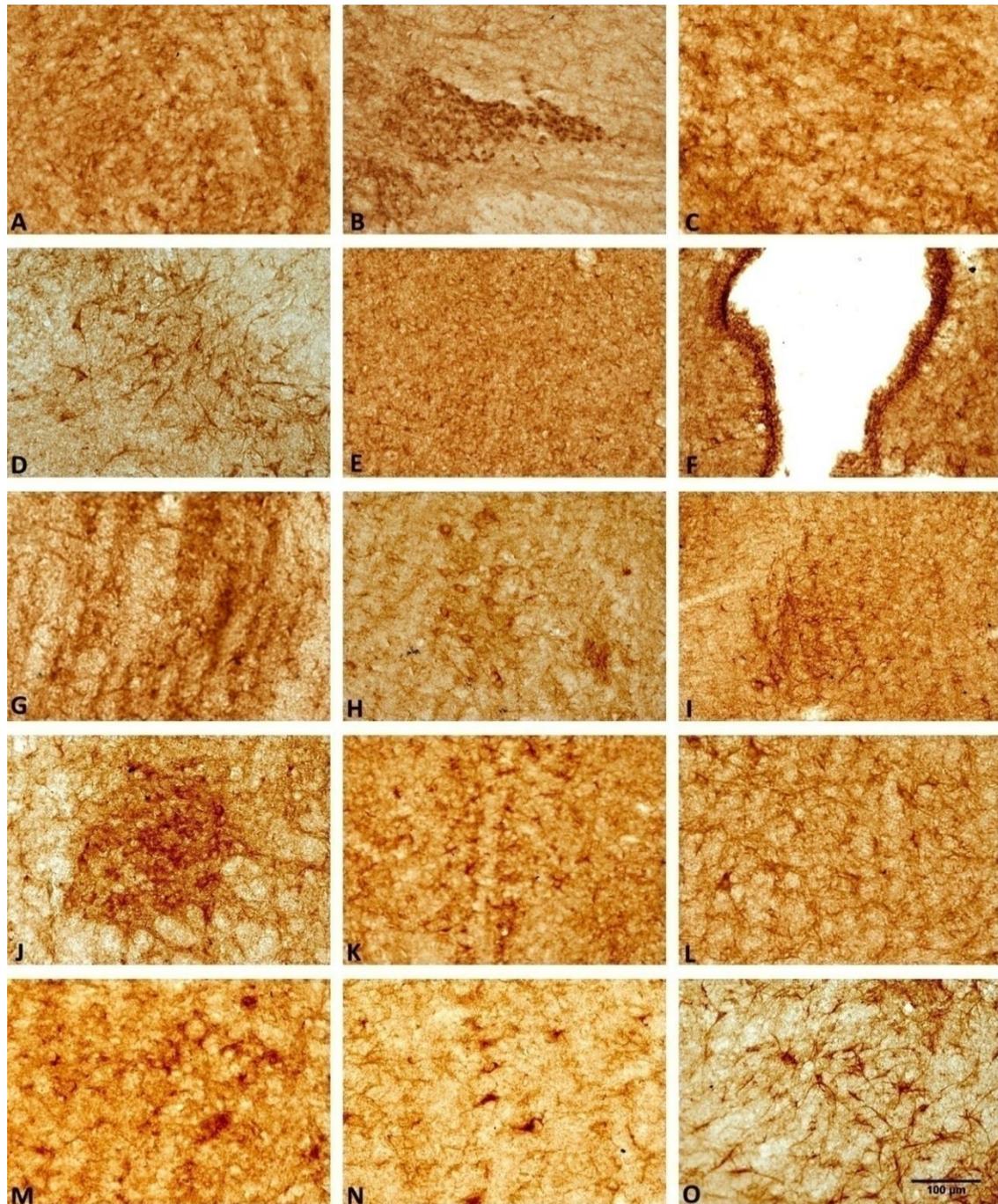


Fig. 7. Inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para HIG-1 en núcleos del tronco encefálico. Ensayo realizado sobre cortes coronales de 40 μm incubados de animales P5, con anticuerpo primario α -HIG-1 1:3000 y anticuerpo secundario α -IgGs de conejo 1:6000 acoplado a peroxidasa. Los cortes fueron observados mediante microscopía de campo claro. A. Núcleo dorsal del Raphe. B. Núcleo del cuerpo trapezoide. C. Núcleo de la oliva. D. Pedúnculo cerebeloso medio. E. Colículo inferior. F. Acueducto de Silvio. G. Núcleo lemnisco lateral. H. Núcleo motor del V par. I. Núcleo sensorial del V par. J. Núcleo tegmental ventral. K. Núcleos del Raphe. L. Núcleo reticular pontino. M. Pontis oralis. N. Tracto rubroespinal. O. Raíz sensorial del nervio trigémino. La barra corresponde a 100 μm .

1.2 Determinación de los tipos celulares que expresan la proteína HIG-1 mediante inmunofluorescencia

En base a los resultados anteriores, nos propusimos identificar qué patrón y tipos celulares expresaban la proteína mediante inmunofluorescencia en secciones de cerebro de crías de 5 y 8 días de edad.

En las figuras 8 y 9 se observan microfotografías de varias regiones que presentan un patrón característico de HIG-1. Estas imágenes provienen de un ensayo de inmunofluorescencia, en donde se utilizó un anticuerpo específico para HIG-1 y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Dado que constatamos que no se encuentran diferencias entre ambos sexos, ni edades, las fotografías corresponden a una hembra de 5 días de edad. Las zonas que mostraron expresión de HIG-1 son las mismas que en los cortes utilizados en la técnica inmunohistoquímica revelada con DAB.

Se puede observar en la figura 8 que no todas las células de un determinado campo presentan expresión de HIG-1. En este sentido, en las figuras 8A', B' y C' se presentan la tinción de los núcleos con DAPI que evidenció el número de células presentes en ese campo. (Ver fig. 8).

Por otra parte, en la figura 9 se muestran microfotografías en donde la morfología celular sugiere el linaje celular que presentó expresión de HIG-1. En algunas regiones como la corteza motora, la morfología celular indicaría que las células que presentan inmunoreactividad positiva podrían ser células gliales (Ver fig 9B). Otras regiones como la amígdala basolateral presentan una morfología celular que sugiere que serían neuronas (Ver fig 9C). Tanto la corteza motora como la amígdala basolateral presentaron gran homogeneidad en la morfología celular, sin embargo, otras regiones como el hipocampo mostraron más de una morfología celular con inmunoreactividad positiva. En el hipocampo se puede observar tanto morfologías de soma más condensado típico de células gliales como células con un soma más grande lo que sugiere que podrían ser neuronas (Ver fig 9A, D, E).

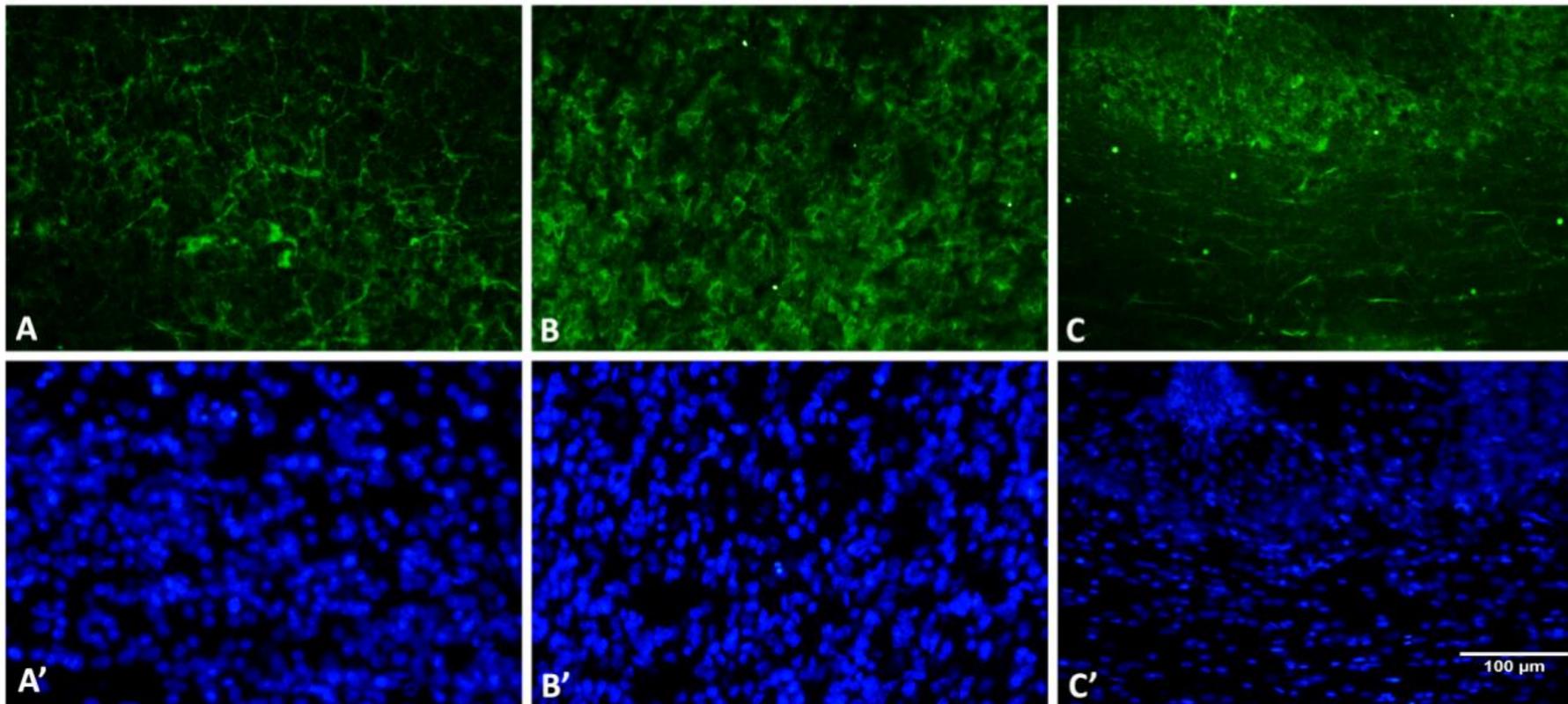


Fig. 8. Regiones del SNC con expresión de HIG-1. Ensayo realizado sobre cortes coronales de 25 μm incubados de animales P5 y P8, con anticuerpo primario $\alpha\text{-HIG-1}$ 1:400 y anticuerpo secundario $\alpha\text{-IgGs}$ de conejo 1:1000 acoplado a Alexa 488. Los cortes fueron observados mediante microscopía de de epifluorescencia. A. Corteza motora. B. Área preóptica media. C. Cuerpo calloso. A'B'C'. Tinción con DAPI de las regiones corteza motora, área preóptica media y cuerpo calloso, respectivamente. La barra corresponde a 100 μm .

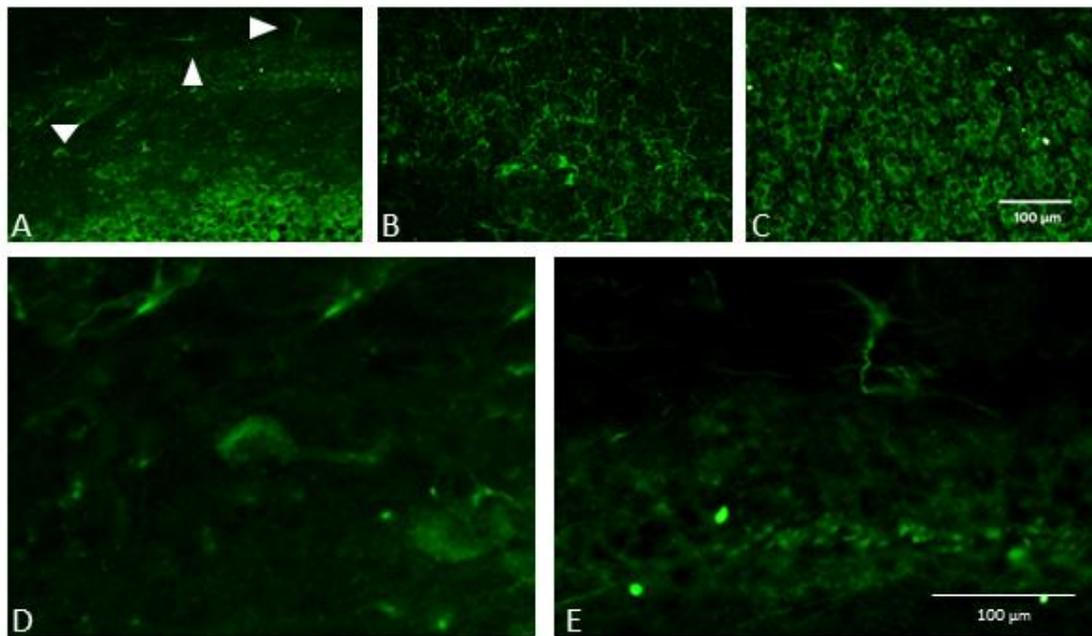


Fig. 9. Tipos celulares con expresión de HIG-1 en distintas regiones del SNC. Ensayo realizado sobre cortes coronales de 25 μm incubados de animales P5, con anticuerpo primario $\alpha\text{-HIG-1}$ 1:400 y anticuerpo secundario $\alpha\text{-IgGs}$ de conejo 1:1000 acoplado a Alexa 488. Los cortes fueron observados mediante microscopía de epifluorescencia. A. Células gliales y neuronas en hipocampo. B. Células gliales en corteza motora. C. Neuronas en amígdala basolateral. D. Micrografía en mayor aumento del mismo campo que en A, neurona con expresión de HIG-1. E. Micrografía en mayor aumento del mismo campo que A, glia con expresión de HIG-1. La barra corresponde a 100 μm .

Dado que el análisis de la morfología celular no es más que una aproximación para concluir qué linajes celulares son los que presentan expresión de HIG-1, se realizó una inmunohistoquímica con un marcador neuronal, $\beta\text{-3-tubulina}$, y un marcador astrocitario, GFAP, para analizar por microscopía confocal su colocalización con la proteína HIG-1. También se analizó la localización subcelular de la proteína HIG-1.

En el caso del marcador específico de neuronas, no fue posible observar inmunoreactividad positiva, pese a ensayar varias condiciones (Ver Tabla 3). Entre las condiciones ensayadas, se modificó la concentración del anticuerpo primario, distintos anticuerpos secundarios y distintas concentraciones de los mismos.

Tabla 3. Condiciones ensayadas en inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para β -3 tubulina.

Concentración de Anticuerpo primario	Concentración de secundario
1:100	1:250 ¹
	1:1000 ²
	1:2000 ²
1:200	1:250 ¹
	1:1000 ²
	1:1000 ²
1:300	1:1000 ²
1:400	1:250 ¹
	1:1000 ³
	1:1000 ²
1:600	1:1000 ²

¹ Rhodamine antimouse IgG antibody (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). ² Rhodamine antimouse IgG antibody (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). ³ Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate

El análisis de secciones con anticuerpo para HIG-1 y con el marcador astrocitario GFAP, evidenció que en regiones ricas en astrocitos fibrosos GFAP+ como el cuerpo calloso, el quiasma óptico o la comisura anterior, existía colocalización de HIG-1 y GFAP. En la figura 10, se puede observar una fotografía de microscopía confocal del quiasma óptico en la que se observó la expresión de HIG-1 en astrocitos GFAP+, (Ver fig. 10A y B), observándose claramente la co-localización de estas dos marcas (Ver fig. 10D).

Con respecto a la localización subcelular, la observación a mayor aumento, evidencia que la proteína se expresa en el citoplasma dado que no co-localiza con DAPI (Ver fig 10 D).

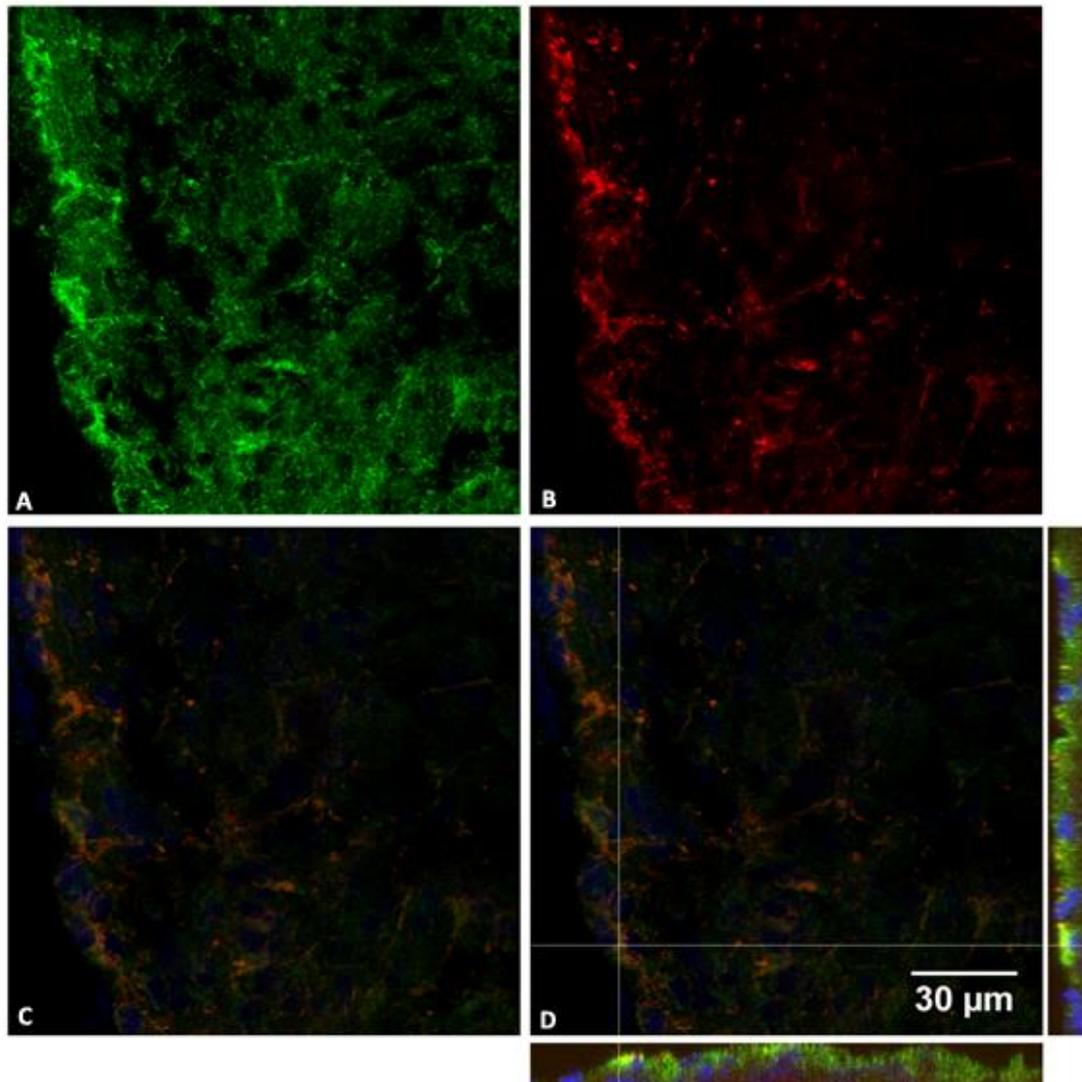


Fig. 10. Microfotografía del quiasma óptico, expresión de HIG1 (verde) en astrocitos fibrosos GFAP+ (rojo). Ensayo realizado sobre cortes coronales de 20 μm de animales P8, incubados con anticuerpo primario α -HIG-1 1:400, α -GFAP 1:400 y anticuerpo secundario α -IgGs de conejo 1:1000 y α -IgGs de ratón acoplado a Rhodamina. Los cortes fueron observados mediante microscopía confocal. A. Expresión de HIG-1. B Expresión de GFAP. C. Superposición de canales. D. Colocalización.

2 Cuantificación de la proteína HIG-1 en SNC por Western Blot

Para la cuantificación de la proteína HIG-1 en el SNC en base a la señal obtenida mediante Western Blot, fue necesario encontrar una proteína cuya expresión no variara en las distintas regiones del SNC, ni en las distintas edades. Esto, resulta necesario dado que la carga de proteínas no siempre es completamente homogénea entre las distintas muestras, pese a que se realizó una previa cuantificación de la concentración de proteínas, y se procuró cargar igual cantidad.

2.1 Búsqueda de proteína para corregir datos

Con el fin de encontrar una proteína para la normalización de los datos en los ensayos de western blot, se ensayaron cuatro proteínas de distintas vías, que se esperaba no variasen su expresión a lo largo de las distintas edades. Se ensayaron las proteínas Actina y GFAP ambas

proteínas de citoesqueleto, GAPDH una enzima que participa en la glucólisis, e Histona 1 que forma parte de las proteínas de la cromatina. Las mismas se probaron en varios ensayos, con muestras de las distintas regiones.

En la figura 11 se presenta un ensayo de Western Blot para la proteína GFAP a modo de ejemplo, en donde se observa la variación de los niveles de la misma con respecto a la edad. A su vez, se muestra en gráficos la cuantificación de la densidad óptica para las cuatro proteínas ensayadas. Los gráficos no muestran desvío estándar, debido a que se cuantificaron pocos ensayos para cada proteína, dado que bastaba con que la expresión de la misma variara con la edad, en una de las regiones analizadas, para que se descartara para la corrección de los datos.

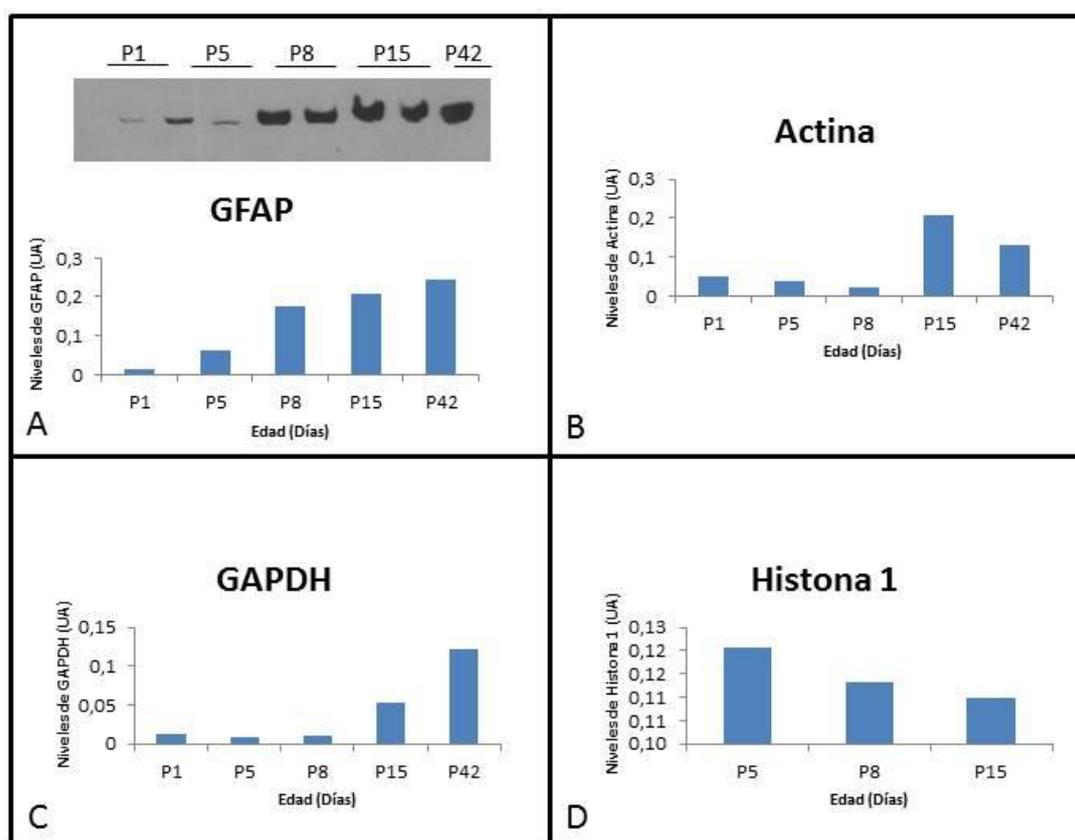


Fig. 11. Proteínas con presunta expresión constitutiva en el SNC de ratas, ensayadas mediante Western Blot. Para cada uno de las proteínas ensayadas se presenta un ensayo de Western Blot a modo de ejemplo. En todos los ensayos se analizaron dos individuos de cada edad analizada. Las autorradiografías fueron analizadas con el software ImageJ. Se utilizó el Rojo Ponceau para corregir la carga. Los resultados se presentan en UA (Unidades Arbitrarias). A. GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial). B. Actina. C. GAPDH (Gliceraldeído 3- fosfato Deshidrogenasa). D. Histona 1.

Tal como se observa en la figura 11, todas las proteínas ensayadas variaron su expresión a lo largo de las edades. En el caso de la actina, los niveles son mayores en crías P15 y P42 respecto a crías P1, P5 y P8 (Ver fig. 11B). Otra de las proteínas de citoesqueleto ensayadas fue GFAP, que mostró un aumento progresivo a medida que avanzamos en la edad de las crías al igual que GAPDH (Ver Fig. 11 A y C). La última proteína ensayada fue Histona-1, sus niveles también variaron entre las distintas edades de las crías (Ver fig. 11D).

En base a estos resultados, se optó por corregir los datos por carga total de proteínas, utilizando la tinción de la membrana con Rojo Ponceau. Por lo tanto, todos los datos presentados a continuación fueron corregidos de esta manera. A su vez fueron normalizados utilizando los valores de densidad óptica en el ensayo de western blot, de una muestra de corteza parietal de macho de 15 días de edad.

2.2 Análisis preliminar de los niveles de HIG-1 en crías machos P1 y machos P42

Se estudiaron los niveles de la proteína HIG-1 en tres regiones del SNC, la corteza parietal, el diencefalo y la médula espinal de ratas P1 y P42 (n=5 y n=2, respectivamente). Los valores se expresan como el promedio con su respectivo error estándar. Los valores graficados fueron corregidos por carga total de proteínas y, normalizados con el valor de HIG-1 en corteza parietal de macho de 15 días de vida.

En la figura 12, se observa que los niveles de HIG-1 variaron respecto a la edad en todas las regiones analizadas. En este sentido, los animales P42 presentaron una mayor expresión de HIG-1 en corteza parietal respecto a P1, mientras que a nivel del diencefalo ocurrió lo opuesto, HIG-1 fue mayor en P1.

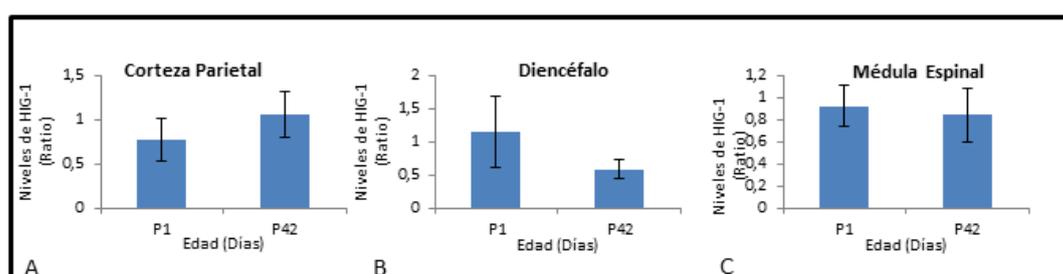


Fig. 12. Niveles de HIG-1 en regiones del SNC de ratas P1 y P42 (n=5 y n=2, respectivamente). El anticuerpo específico que se utilizó fue α -HIG-1 1:1000 y el anticuerpo secundario fue α -IgG rabbit 1:5000. Las autorradiografías fueron analizadas con el software ImageJ. Se utilizó el Rojo Ponceau para corregir la carga. Los resultados se presentan en UA (Unidades Arbitrarias). A. Niveles de HIG-1 en corteza parietal. B. Diencefalo. C. Médula espinal. Los datos se presentan como media \pm SE de la proporción con respecto a los niveles de una corteza de macho P15.

2.3 Análisis de los niveles de expresión HIG-1 en áreas del SNC en función de la edad y el sexo

2.3.1 Corteza parietal

En la figura 13 se presentan los niveles de HIG-1 a nivel de la corteza parietal de crías P1, P5, P8 y P15 de ambos sexos.

Los niveles de la proteína variaron significativamente entre las distintas edades tanto en crías machos (F=15,35; $p < 0,05$) como en hembras (F=23,11; $p < 0,05$). En este sentido, los niveles de HIG-1 de crías P15 macho y hembras fueron mayores en comparación con P1 y P5. Asimismo, las crías P8 presentaron mayores niveles de HIG-1 respecto a P1 (ver Fig. 13).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de la proteína entre machos y hembras en cada una de las edades ($p > 0,23$ para todas las comparaciones).

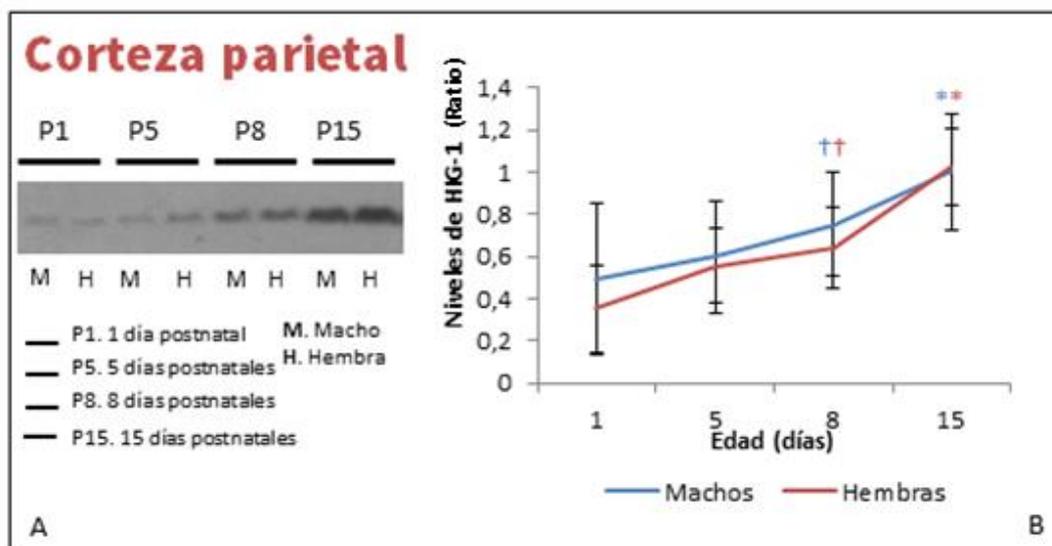


Fig. 13. Niveles de HIG-1 en Corteza Parietal de machos y hembras de 1, 5, 8 y 15 días de vida. Los niveles de la proteína fueron analizados mediante ensayo de Western Blot. **A.** Ejemplo de ensayo de Western Blot con muestras provenientes de Cortezas parietales de los sexos y las edades estudiadas. En los mismos se utilizaron 15 μ g de proteínas. Se utilizó un anticuerpo primario α -HIG-1 1:1000 y un anticuerpo secundario α -IgG de conejo 1:5000. Los resultados obtenidos fueron corregidos con Rojo Ponceau y normalizados con una muestra que estuvo presente en todos los ensayos. **B.** Niveles de HIG-1 en ambos sexos y en las edades analizadas. Datos expresados en medias \pm SE de la proporción con respecto a los niveles de una corteza de macho P15, y analizados mediante un ANOVA de muestras repetidas seguido de la prueba de Tukey, * $p \leq 0,05$ vs. machos P1, P5; † $p \leq 0,05$ vs. machos P1; * $p \leq 0,05$ vs. hembras P1, P5, P8; † $p \leq 0,05$ vs. hembras P1.

2.3.2 Diencefalo

En el diencefalo, los niveles de HIG-1 variaron significativamente en función de la edad en las crías machos ($F=5,87$; $p \leq 0,05$) y hembras ($F=8,89$; $p \leq 0,05$).

P15 presentó un mayor nivel de HIG-1 respecto a P1, P5 y P8. En el caso de las crías machos, el nivel de HIG-1 en P15 se diferenció significativamente de P1 ($p=0,05$) y P5 ($p=0,03$), mientras que en hembras, P15 presentó también un mayor nivel de HIG-1 respecto a P1, P5 y P8 ($p=0,02$; $p=0,01$ y $p=0,04$, respectivamente) (Ver Fig.14).

También se analizó si existían diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de macho y hembras. Este análisis mostró que no existen tales diferencias en los niveles de expresión de la proteína, entre sexos ($p > 0,19$ para todas las comparaciones).

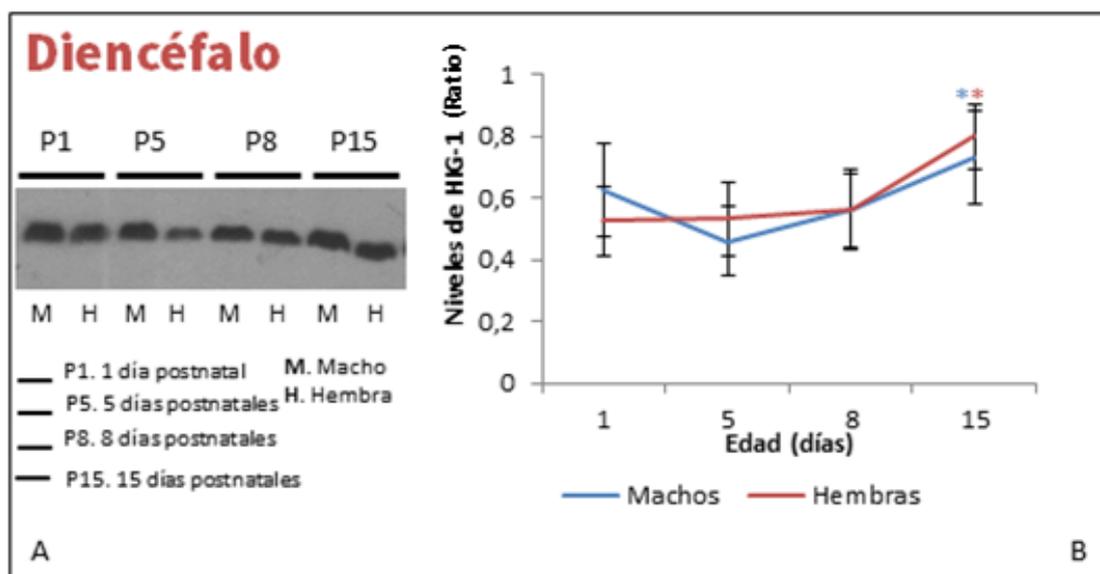


Fig. 14. Niveles de HIG-1 en Diencefalo de machos y hembras de 1, 5, 8 y 15 días de vida. Los niveles de la proteína fueron analizados mediante ensayo de western blot, **A**. Ejemplo de ensayo de Western Blot con muestras provenientes de Diencefalos de los sexos y las edades estudiadas. En los mismos se utilizaron 15 μ g de proteínas. Se utilizó un anticuerpo primario α - HIG-1 1:1000 y un anticuerpo secundario α -IgG de conejo 1:5000. Los resultados obtenidos fueron corregidos con Rojo Ponceau y normalizados con una muestra que estuvo presente en todos los ensayos. **B**. Niveles de HIG-1 en ambos sexos y en las edades analizadas. Datos expresados en medias \pm SE de una proporción con respecto a los niveles en una corteza de macho P15, y analizados mediante un ANOVA de muestras repetidas seguido de la prueba de Tukey, * $p \leq 0,05$ vs. machos P5; * $p \leq 0,05$ vs. hembras P1, P5, P8.

2.3.3 Médula Espinal

Tanto las muestras provenientes de machos como de hembras, presentaron el mismo patrón de variación en los niveles de la proteína respecto a la edad. Los mismos aumentaron del día 1 hacia el día 5, siendo este día el que presentó los niveles mayores de expresión de HIG-1. Luego descendieron hacia el día 8 y aumentaron levemente hacia el día 15 (Ver Fig. 15). Estas variaciones no fueron estadísticamente significativas en machos ($F=3,55$; $p=0,08$) ni en hembras ($F=4,73$; $p=0,11$), sin embargo en machos se observa una tendencia.

Al igual que en las demás regiones analizadas, no se observaron diferencias significativas en los niveles de HIG-1 entre machos y hembras para cada una de las edades analizadas ($p > 0,22$ para todas las comparaciones).

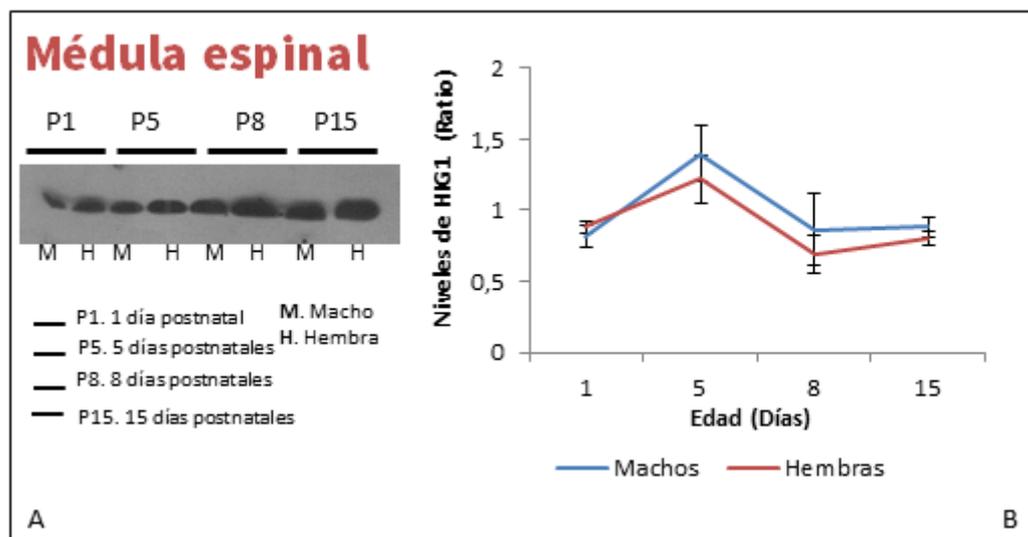


Fig. 15. Niveles de HIG-1 en Médula espinal de machos y hembras de 1, 5, 8 y 15 días de vida. Los niveles de la proteína fueron analizados mediante ensayo de western blot. **A.** Ejemplo de ensayo de Western Blot con muestras provenientes de Médula espinal de los sexos y las edades estudiadas. En los mismos se utilizaron 15 μ g de proteínas. Se utilizó un anticuerpo primario α - HIG-1 1:1000 y un anticuerpo secundario α -IgG de conejo 1:5000. Los resultados obtenidos fueron corregidos con Rojo Ponceau y normalizados con una muestra que estuvo presente en todos los ensayos. **B.** Niveles de HIG-1 en ambos sexos y en las edades analizadas. Datos expresados en medias \pm SE de una proporción con respecto a los niveles de una corteza de macho P15, y analizados mediante un ANOVA de muestras repetidas.

2.3.4 Comparación de los niveles de HIG-1 en las regiones del SNC

En la figura 16 se observa en conjunto el cambio en los niveles de HIG-1, a lo largo de las dos primeras semanas de vida tanto en machos como en hembras, en las tres regiones del SNC analizadas. Este gráfico permite apreciar la relación de los niveles de la proteína en las tres regiones, observándose que los niveles fueron del mismo orden en todas ellas. Se destacan los niveles de la proteína en las muestras de médula de 5 días de vida por ser los mayores valores observados y los niveles en las muestras de corteza de 1 día de vida por ser los menores obtenidos.

HIG1 en el SNC

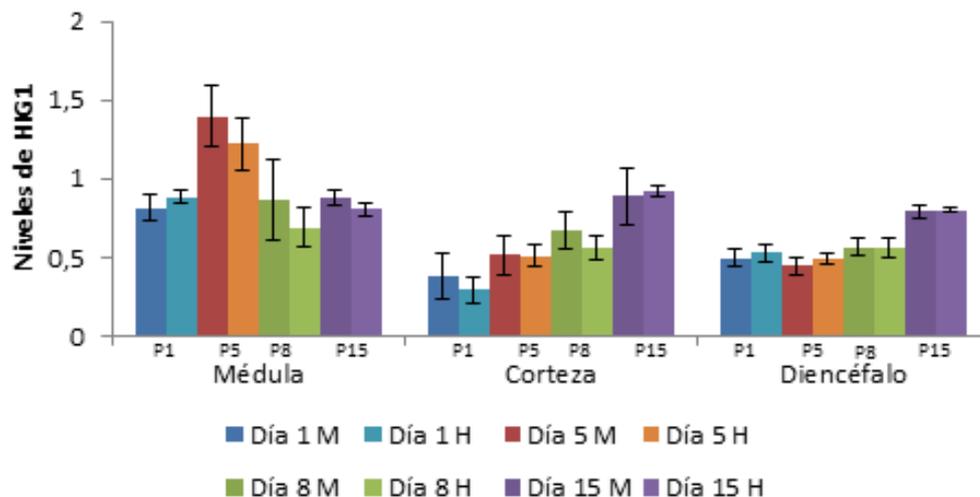


Fig. 16. Niveles de HIG-1 en las tres regiones del SNC analizadas, médula espinal, corteza parietal y diencéfalo, para crías machos y hembras de 1,5, 8 y 15 días postnatales.

3 Determinación de la expresión de la proteína HIG-1 en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media por inmunohistoquímica

3.1 Identificación del núcleo y confirmación del dimorfismo

Con el fin de determinar los niveles de HIG-1 en el SDN-MPOA, se buscó identificar y confirmar el dimorfismo sexual que presenta el núcleo en los días 5 y 8 de vida postnatal como resultado de la diferencia en el número de células. Para ello, se cuantificó la diferencia en el área de interés (Ver fig. 17).

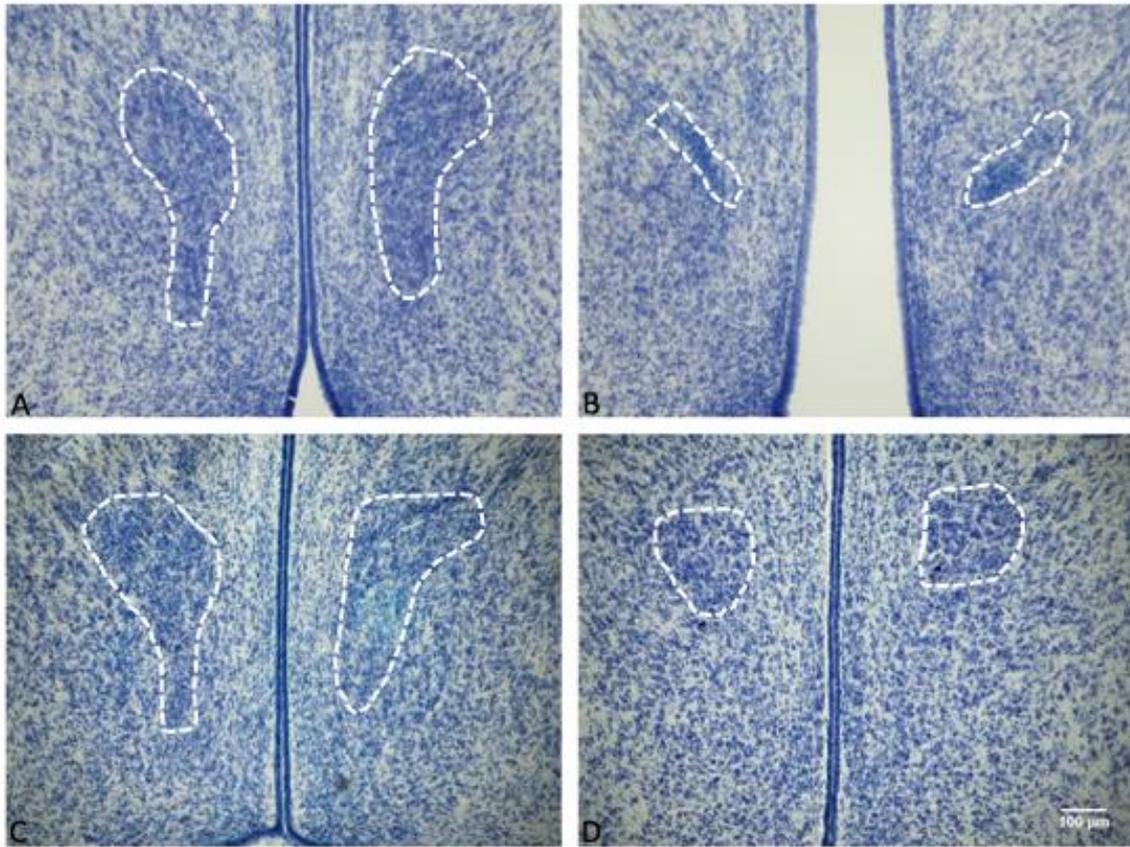


Fig. 17. Fotografías de SDN-MPOA de machos de 5 (A) y 8 (C) días de vida, y hembras también de 5 (B) y 8 (D) días de vida. Cortes coronales que contienen el SDN-MPOA y que fueron sometidos a tinción de Nissl. Fueron observados en microscopio de campo claro. Con línea punteada se muestra el perímetro del núcleo a modo de ejemplo. La barra corresponde a 100 μm .

Los resultados obtenidos evidenciaron el dimorfismo sexual característico de esta área. En este sentido, la cuantificación de área del SDN-MPOA mostró un efecto del sexo sobre el tamaño del SDN-MPOA ($F= 21,39$; $p\leq 0,05$) pero no de la edad ($F= 0,03$; $p=0,87$). Un análisis “post hoc” mostró que la diferencia de área entre machos y hembras P5 fue estadísticamente significativa ($p=0,01$).

Cuando las comparaciones de área entre animales de distinto sexo se realizaron dentro de la misma edad, si bien no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,08$; $t=3,3$ y $p= 0,14$; $t=2,35$, 5 y 8 días de edad respectivamente) mostraron una tendencia entre los machos y las hembras de 5 días de edad.

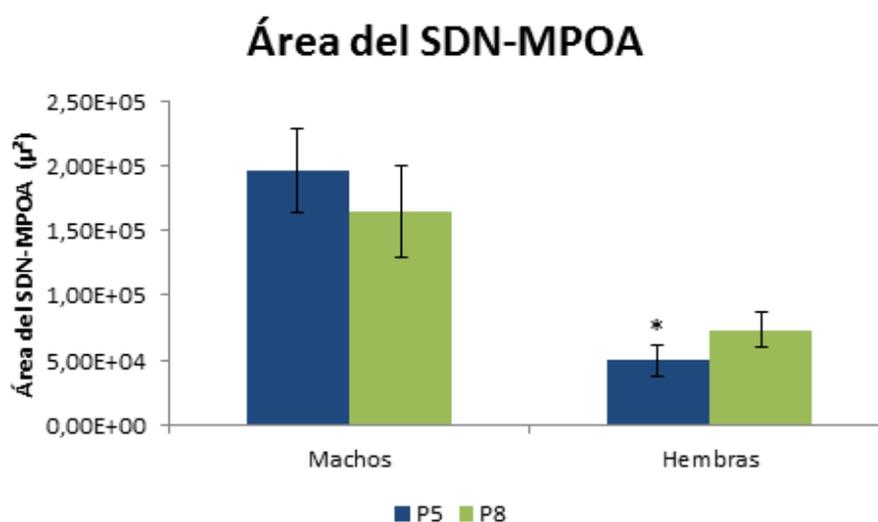


Fig. 18. Diferencias de áreas en el SDN-MPOA en animales de 5 y 8 días de vida. Cuantificación realizada a partir de microfotografías de cortes coronales teñidos con tinción de Nissl de animales P5 y P8. La cuantificación se realizó con el software ImageJ. Los datos muestran el media y el error estándar del área del SDN-MPOA, se analizaron en un test de ANOVA de una vía con posterior prueba de Tukey. * vs Macho P5 ($p \leq 0,05$).

3.2 Análisis de la expresión de Caspasa 3- activada en el SDN-MPOA

Tal como se muestra en la figura 19, se observó presencia de células positivas para caspasa-3-activada en el SDN-MPOA de hembras (Ver fig. 19B), observándose como se esperaba, una localización subcelular nuclear, dado que la señal colocalizó con DAPI (Ver fig. 19D). Sin embargo no se observó inmunoreactividad positiva en el mismo núcleo de los machos (Ver fig. 19A).

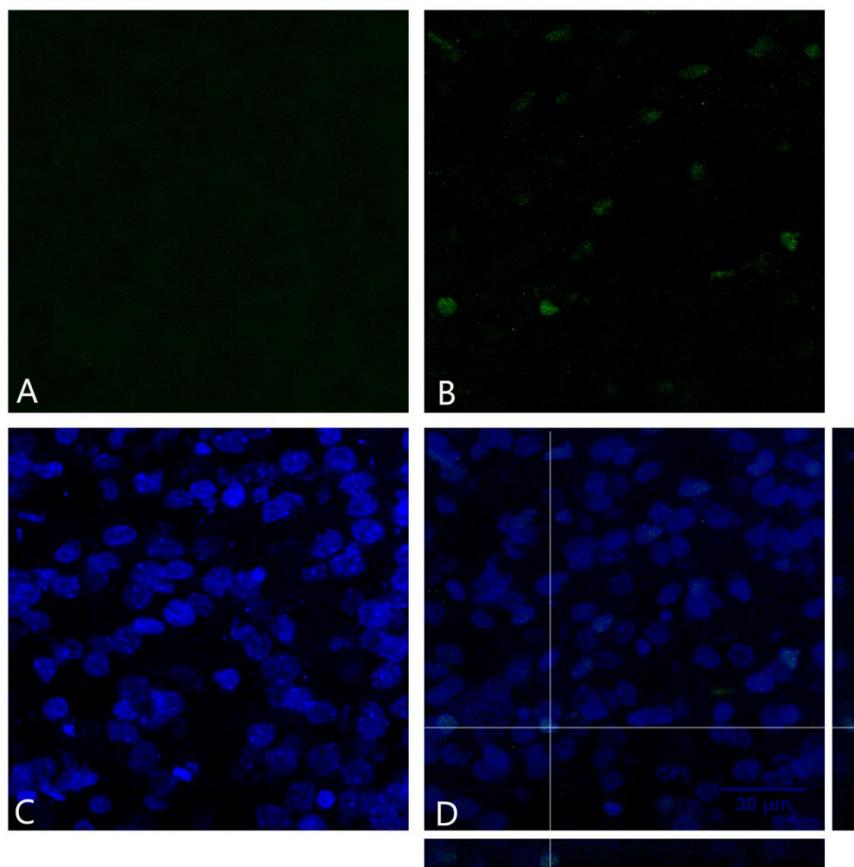


Fig. 19. Inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para Caspasa 3-activada, en SDN-MPOA de animales P8. Ensayo realizado sobre cortes coronales de 20 μm incubados con anticuerpo primario α -Caspasa-3-activada 1:000 y anticuerpo secundario α -IgGs de conejo 1:1000 acoplado a Alexa 488. Los cortes fueron observados mediante microscopía confocal. A y C. Macho. B y D. Hembra. La barra corresponde a 30 μm .

3.3 Análisis semicuantitativo de los niveles de HIG-1

Se cuantificaron los niveles de HIG-1 en el SDN-MPOA de ratas de 5 y 8 días de vida y de ambos sexos (ver fig. 21 y 22).

Las células del SDN-MPOA que presentaron señal, en los cortes sometidos a inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para HIG-1, no se limitan a un tipo celular específico y, a su vez el tipo de señal que presentan tiene un aspecto puntiforme (ver fig.20). Entonces, se procedió a procesar y analizar las imágenes obtenidas de dichos cortes, mediante el programa Image J. Se definió un rango en la escala de grises, por encima de un umbral que se determinó como inmunoreactividad positiva. A su vez, dentro de este rango en la escala de grises se estableció un rango con los valores más altos al que se llamó "intenso" y muestra las regiones con mayor expresión de HIG-1.

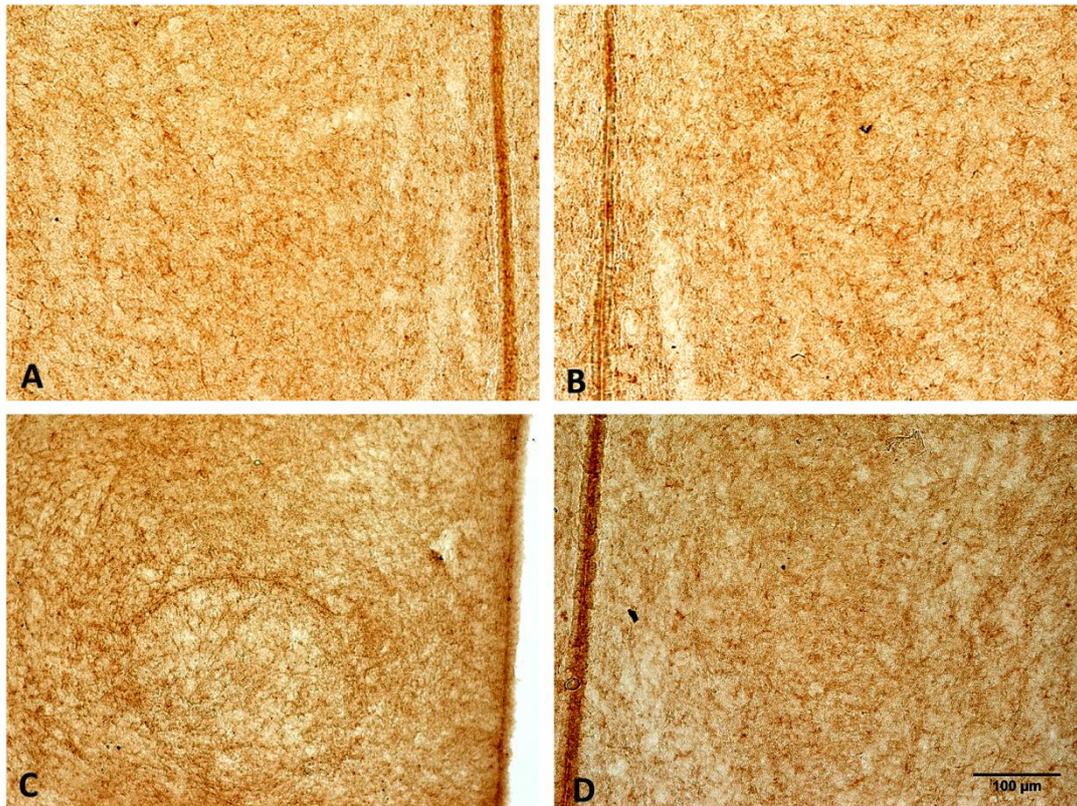


Fig. 20. Inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para HIG-1 en SDN-MPOA de machos de 5 días (A), de hembras de 5 días (B), machos de 8 días (C) y hembras de 8 días (D). Cortes coronales de 40 μm sometidos a inmunohistoquímica con un anticuerpo α -HIG-1 1:3000 y un anticuerpo secundario α -IgGs de ratón 1:600 acoplado a peroxidasa. Los cortes fueron observados mediante microscopía de campo claro. La barra corresponde a 100 μm .

Tal como se observa en las figuras 21 y 22, los niveles de la proteína expresados como porcentaje de área con expresión con respecto al área total del núcleo, variaron con respecto al sexo y a la edad (Ver fig. 21 y 22).

Los niveles de la proteína fueron superiores en los animales de 5 días de edad con respecto a los de 8 días de edad, en ambos sexos. En el caso de los animales de 5 días de edad, las hembras presentaron mayores niveles que los machos. Y para el caso de los animales de 8 días de edad, los niveles fueron superiores en machos que en hembras. Las variaciones observadas con respecto a la edad fueron estadísticamente significativas ($F=15,75$; $p \leq 0,05$).

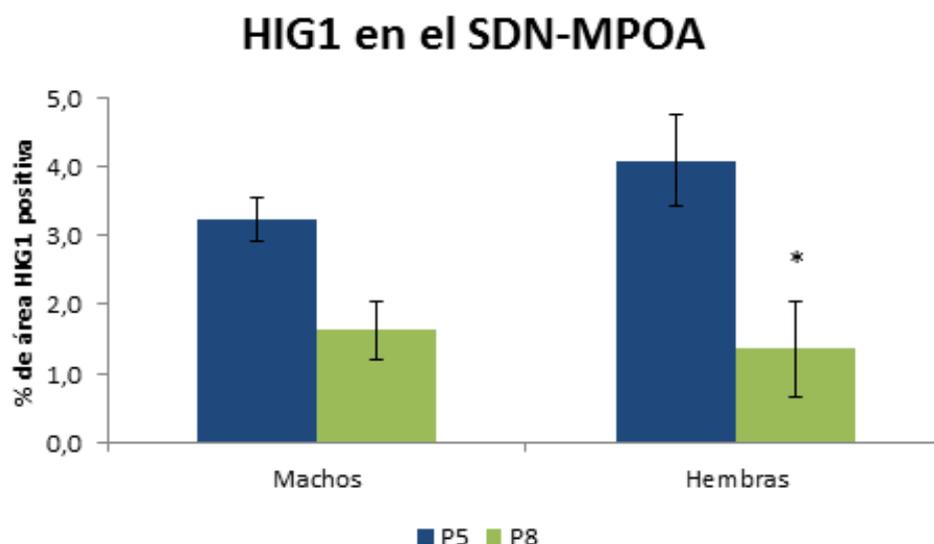


Fig. 21. Niveles de expresión de HIG-1 en SDN-MPOA, para animales de 5 y 8 días de vida y de ambos sexos. La cuantificación se realizó sobre microfotografías de cortes coronales de cerebro de 40 μm de animales P5 y P8, sometidos a inmunohistoquímica con un anticuerpo primario α -HIG-1 1:3000 y un anticuerpo secundario α -IgGs de ratón 1:600 acoplado a peroxidasa. Los cortes fueron observados y fotografiados mediante microscopía de campo claro. Las microfotografías fueron analizadas mediante el software ImageJ. Los datos obtenidos se presentan como media y error estándar del porcentaje de área del SDN-MPOA que presenta expresión de HIG-1, fueron analizados con un test de ANOVA de dos vías y posterior prueba de Tukey. * vs. Hembra P5 ($p \leq 0,05$).

Al igual que en los niveles de expresión general de HIG-1 en el SDN-MPOA, los valores de expresión de HIG-1 considerada intensa tomada a partir de un umbral, variaron con respecto a la edad y al sexo en conjunto, y esta variación fue estadísticamente significativa ($F=5,48$; $p \leq 0,05$).

Se destaca que la señal intensa que representaría una alta expresión de HIG-1 presenta un patrón particular con variación tanto en función de la edad como del sexo.

En el caso de los machos los niveles aumentan hacia el día 8 y en las hembras los niveles descienden hacia el día 8. Con respecto a la comparación entre sexos, en el día 5 los niveles son superiores en hembras, sin embargo, en el día 8 los niveles fueron superiores en machos que en hembras (Ver fig. 22).

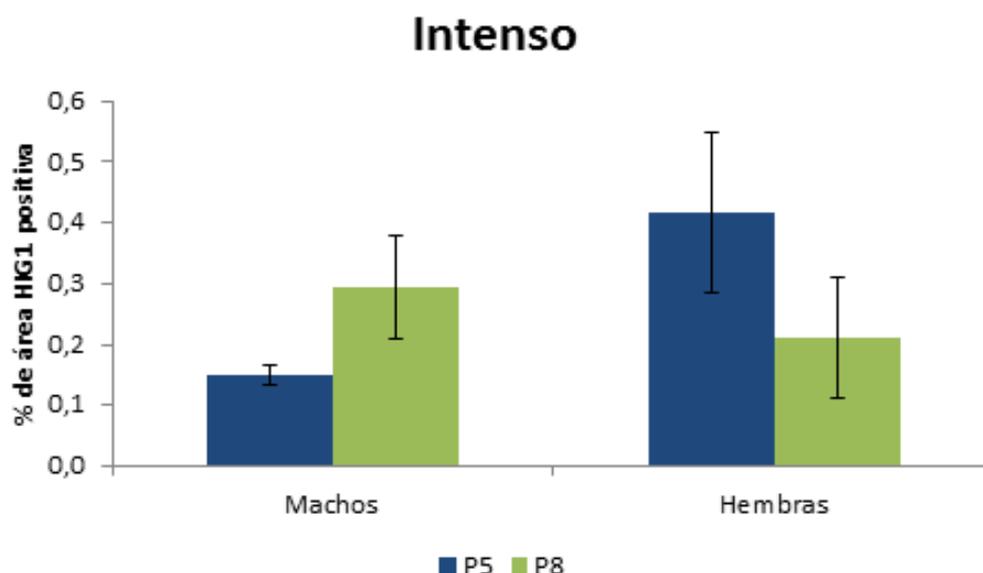


Fig. 22. Niveles de expresión “intenso” de HIG-1 en SDN-MPOA, para animales de 5 y 8 días de vida y de ambos sexos. La cuantificación se realizó sobre microfotografías de cortes coronales de cerebro de 40 μm de animales P5 y P8, sometidos a inmunohistoquímica con un anticuerpo primario α -HIG-1 1:3000 y un anticuerpo secundario α -IgGs de ratón 1:600 acoplado a peroxidasa. Los cortes fueron observados y fotografiados mediante microscopía de campo claro. Las microfotografías fueron analizadas mediante el software ImageJ. Los datos obtenidos se presentan como media y error estándar del porcentaje de área del SDN-MPOA que presenta expresión de HIG-1, fueron analizados con un test de ANOVA de dos vías y posterior prueba de Tukey.

3.4 Definición de los tipos celulares en los que se expresa HIG-1 en el SDN-MPOA

Mediante la técnica de inmunofluorescencia se analizaron cortes de machos y hembras de 8 días, que contenían el SDN-MPOA, con anticuerpos específicos para HIG-1 y GFAP. No se obtuvo inmunoreactividad positiva con el marcador específico de neuronas.

Como se puede observar en la figura 23, las células que presentan señal para HIG-1 no mostraron señal para GFAP. Esto mostró que HIG-1, en el SDN-MPOA de ambos sexos, se expresó en un tipo celular diferente a los astrocitos GFAP+, que no se encontraron en esta área si bien estaban presentes en otras áreas de los mismos cortes (Ver fig. 23C). Se pudo observar que la expresión de HIG-1 presentó el mismo aspecto puntiforme ya denotado en los ensayos de inmunohistoquímica terminados en DAB (Ver fig. 23B). Otro dato observado en este ensayo fue la localización citoplasmática de HIG-1, dado que no colocaliza con DAPI (Ver fig. 23D).

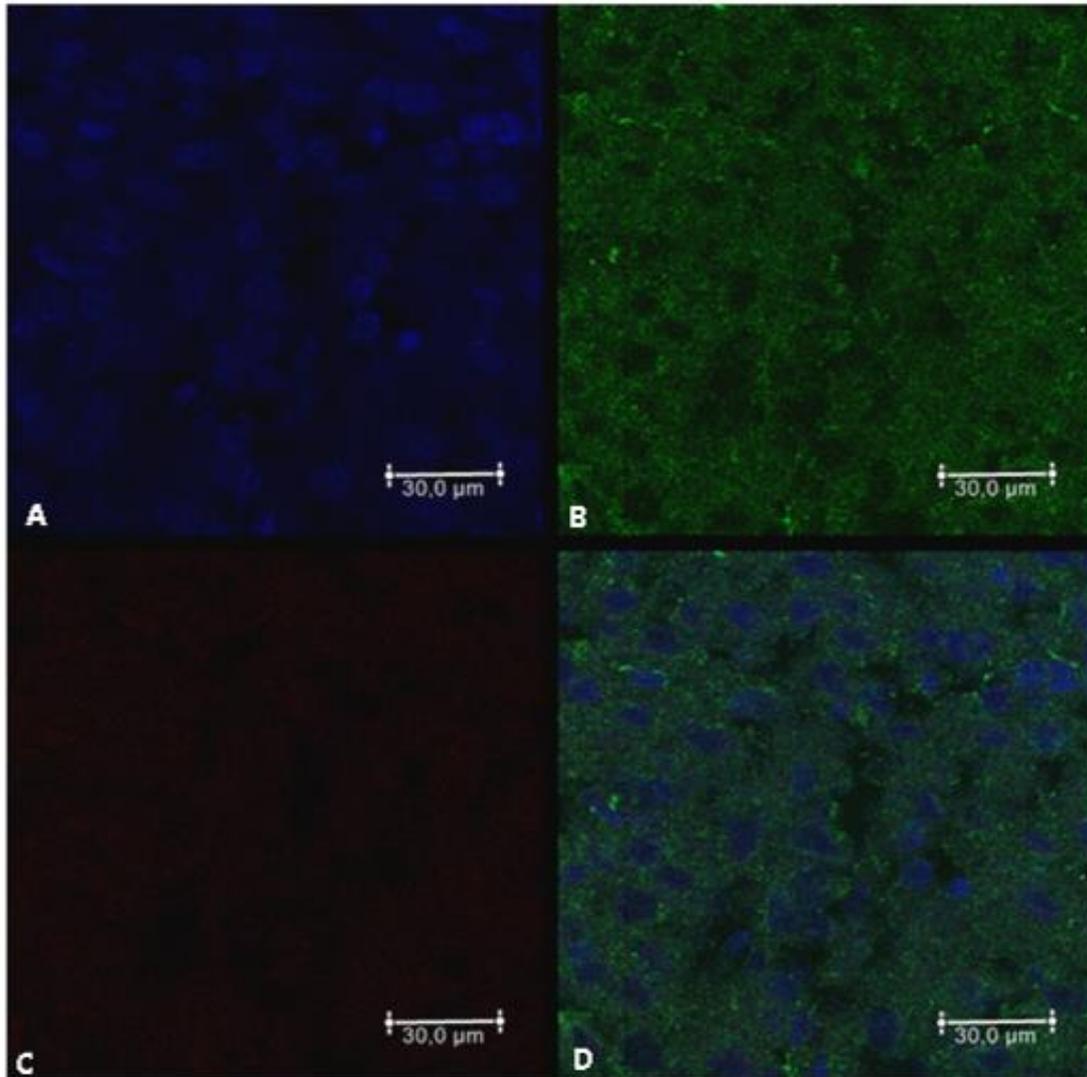


Fig. 23. Inmunofluorescencia con anticuerpo específico para HIG-1 y para GFAP en un corte coronal de 20 μm de cerebro de macho que contiene el SDN-MPOA. Los cortes fueron sometidos a inmunofluorescencia con anticuerpos primarios α -HIG-1 1:400 y α -GFAP 1:400, y anticuerpos secundarios α -IgGs de conejo 1:1000 y α -IgGs de ratón 1:1500. Los cortes fueron observados con microscopía confocal. A. Núcleos teñidos con DAPI. B. HIG-1. C. GFAP. D. Composición de los tres canales. La barra corresponde a 30 μm .

DISCUSIÓN

En el presente trabajo nos propusimos analizar la expresión de la proteína HIG-1 en el SNC de ratas de distintas edades, y su patrón de distribución en distintas regiones del cerebro. Para ello realizamos una cuantificación de los niveles a lo largo de diferentes edades, y en particular las primeras dos semanas de vida en el SNC de ratas de ambos sexos. Por otra parte, dado que HIG-1 ha mostrado la capacidad de inhibir la liberación del Citocromo C en otros modelos, utilizamos el SDN-MPOA para analizar la expresión de HIG-1 en un modelo en el que ocurre una muerte celular masiva y rápida por apoptosis, mediada por liberación de citocromo C.

1 Determinación del patrón y los niveles de expresión de la proteína HIG-1 en SNC

Los niveles de HIG-1 variaron con la edad tanto en la comparación de los niveles de neonatos con adultos, como a lo largo de las dos primeras semanas de vida y en ambos sexos en las tres regiones analizadas, corteza, diencefalo y médula espinal. A su vez, los resultados de inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para HIG-1 sobre cortes de cerebro mostraron que la proteína HIG-1 tiene una expresión amplia, pero no homogénea, con una expresión marcada en áreas específicas. La evidencia de los western blot y la inmunohistoquímica sugieren que HIG-1 se expresa en altos niveles en varias regiones del SNC, como hipocampo, nervio óptico, amígdala basolateral, caudado putamen, entre otras. Asimismo, los resultados obtenidos en los niveles de HIG-1 en las tres regiones analizadas mostraron que los mayores niveles de expresión, en cada una de las regiones, se encuentran hacia el día 5 en regiones más caudales como la médula espinal, y hacia el día 15 de edad en regiones más rostrales como el diencefalo y la corteza parietal. Esto concuerda con el gradiente de maduración morfológico que presentan las regiones del SNC, en donde maduran primero las regiones más caudales y posteriormente las regiones más rostrales ⁶.

Trabajos de transcriptómica han mostrado que la sobre-expresión de algunos genes, en determinadas regiones, reflejan patrones de especialización funcional. Gran parte de los genes que se ven enriquecidos significativamente en una región determinada, muestran niveles basales de expresión en otras regiones del cerebro. Esto podría indicar que procesos generales compartidos por la mayoría de las células del tejido nervioso, pueden tener una mayor actividad en una región que en otra ⁷. Debido a que HIG-1 presenta una amplia distribución pero particularmente en algunas áreas, se podría sugerir que dicha proteína puede estar implicada en procesos particulares o bien en los procesos que determinan la formación o maduración de esa área.

La evidencia de los western blot y la inmunohistoquímica sugieren que HIG-1 se expresa en altos niveles en la corteza parietal, y resulta de gran interés notar que los niveles de la proteína aumentan progresivamente hacia el día 15 de vida postnatal y en ambos sexos. Durante el desarrollo de la corteza ocurren una serie de eventos celulares secuenciales, en donde se

incluyen proliferación de progenitores neurales, especificación del destino celular, migración neuronal, crecimiento de las neuritas y búsqueda de caminos, y, finalmente, la formación y modulación de conexiones sinápticas plásticas⁶³. La ocurrencia de todos estos eventos de desarrollo depende del control espacial y temporal de la expresión génica en la célula⁶⁴. Los principales eventos que ocurren durante las dos primeras semanas de vida en el desarrollo de la corteza de la rata son la sinaptogénesis, la muerte neuronal y, es en esta ventana de tiempo cuando ocurre la máxima velocidad de crecimiento de esta región⁶⁵. En el caso de la sinaptogénesis ocurre en las primeras tres semanas de vida con un pico en la segunda⁶⁶. La muerte neuronal ocurre desde el día embrionario 20 hasta el día 30 de vida postnatal⁶⁷. La máxima velocidad de crecimiento ocurre desde el día 8 al día 12 de vida postnatal en esta región del cerebro⁶⁸.

Cabe destacar que observamos que la corteza parietal presenta células positivas para Caspasa-3-activada, estos datos no se presentaron en resultados, sin embargo, fueron obtenidos en ensayos realizados por nuestro laboratorio. Dado que esta región presenta un alto grado de remodelación y desarrollo postnatal y, ya que se sabe que HIG-1 está implicado en el aumento de la supervivencia celular en algunos modelos, se podría sugerir que HIG-1 está implicada en el desarrollo de esta región inhibiendo la muerte de algunas células. Resulta de gran interés realizar estudios funcionales o de manipulación de la expresión del gen *Hig-1* para poder diseccionar con mayor precisión el rol de la proteína en esta región.

Otra de las regiones en las que se analizó la expresión de HIG-1 fue el diencéfalo. Al momento de elegir esta región para analizar la expresión de HIG-1 esperábamos, en base a nuestra hipótesis, encontrar un dimorfismo sexual en los niveles de la proteína. Este dimorfismo no se observó en los resultados obtenidos para el diencéfalo globalmente. Una de las posibles razones es que esta región incluye más de un núcleo sexualmente dimórfico, núcleos que continúan remodelándose en los primeros días de vida postnatal. Entre los núcleos que presentan dimorfismo sexual, se encuentran el SDN-MPOA y el núcleo anteroventral periventricular (AVPV). Mientras el primero conserva mayor número de células en machos, en el otro ocurre a la inversa. El AVPV se encuentra en el área gris periventricular del extremo rostral del tercer ventrículo, es más grande y tiene una mayor densidad celular en hembras que en machos en varias especies de roedores^{69,70}. En las ratas en desarrollo, el número de células apoptóticas en la AVPV presenta dimorfismo sexual y el mismo, se correlaciona negativamente con el tamaño y el número de células en la edad adulta⁷⁰. En este sentido, si HIG-1 estuviera expresándose en forma diferencial para cumplir un rol antiapoptótico en cada área, las variaciones globales en los niveles se verían compensadas.

Pese a no encontrar diferencias entre ambos sexos en esta región del cerebro, el diencéfalo tiene una alta expresión de HIG-1 y con un patrón característico. Presenta un descenso hacia el día 5 en ambos sexos y luego aumenta hacia el día 15, siendo este aumento significativo estadísticamente. El día 5 de vida postnatal resulta de gran interés, ya que varios núcleos dentro del diencéfalo son aún plásticos en este día: en el caso de AVPV está finalizando su remodelación⁶⁰ y en SDN-MPOA es una edad en que se igualaría el número de células que se someten a apoptosis en ambos sexos⁵⁹ (fig. 25). Por tanto, las variaciones en los niveles de HIG-1 en esta región, podrían estar implicados en su remodelación.

Es de destacar que la médula ofrece otro ejemplo de región que presenta remodelación en los primeros días de vida implicando procesos de apoptosis, y que a su vez expresa altos niveles de HIG-1. Así, el patrón de expresión de HIG-1 en la médula espinal presenta algunas singularidades tal como un pico de expresión en ambos sexos en el día 5 de vida postnatal. En este sentido, Lowrie y Lawson describen un pico en el número de células apoptóticas en la médula espinal justo antes del nacimiento, el cual cae bruscamente en la primera semana de vida postnatal y se torna insignificante hacia la segunda ¹⁷.

Estudios previos en nuestro laboratorio han profundizado sobre la expresión de esta proteína en esta región. En ellos se ha mostrado un aumento de casi un 40% en los niveles de ARNm de *Hig-1* en médula espinal entre animales de 1 y 8 días de vida. Además, se ha descrito un patrón de expresión diferencial, en donde la proteína pasa de expresarse mayormente en neuronas, en animales de 1 y 8 días a expresarse principalmente en astrocitos en animales 15 días y 90 días ⁵³. En cierto modo, y dado el pequeño soma de las células astrocitarias en comparación con las neuronas, niveles de proteína menores en valores absolutos, no se corresponden necesariamente con que la proteína no esté igualmente presente o cumpla una función en animales de mayor edad.

Además de las regiones en las que específicamente se hizo un análisis cuantitativo de los niveles de HIG-1, el análisis por inmunohistoquímica mostró que varias regiones presentan una distribución particular de esta proteína. Una de ellas fue el hipocampo. En rasgos generales, el transcriptoma del hipocampo está estrechamente relacionado con el de la corteza. Sin embargo, presenta características distintivas que se evidencian en la anotación de genes de expresión particular. El papel del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria está acompañado por una masiva sobre-representación de los genes implicados en la señalización mediada por calcio y la neurogénesis ⁷. El día 16 de desarrollo embrionario y los días 1, 7, 16 y 30 de vida postnatal corresponden a períodos de máxima actividad en el desarrollo de esta región en ratones. En estos días se producen los principales eventos celulares y fisiológicos que determinan el desarrollo del hipocampo (Fig. 24). Se sabe que la proliferación más activa de las neuronas se produce durante el período prenatal, seguido por otros procesos como la diferenciación ya en el período neonatal, y la sinaptogénesis en la primera semana postnatal. En la segunda semana después del parto, las conexiones sinápticas se establecen y la actividad sináptica se vuelve cada vez más activa; en la tercera semana de vida postnatal, los circuitos del hipocampo se encuentran plenamente conectados y exhiben gran plasticidad. Al final del primer mes de vida postnatal, el hipocampo comienza a madurar ⁷¹.

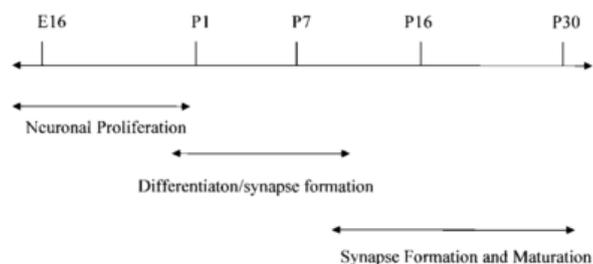


Fig 24. Línea de tiempo del desarrollo del hipocampo de ratón. Las flechas ilustran las ventanas de tiempo en donde ocurren los principales eventos neuronales durante el desarrollo del hipocampo modificado de ⁷¹.

Nuestro análisis de la expresión de los niveles de HIG-1 en el hipocampo incluye parte de este período del desarrollo (día 5 y 8 de vida postnatal) que en rata corresponden también a un período de diferenciación y formación de sinapsis y hemos visto que presenta una alta expresión de la proteína. Observamos también (datos no mostrados) la presencia de células positivas para caspasa-3 activada presentes en esta región del cerebro.

Asimismo, varios núcleos del tronco encefálico presentan expresión de HIG-1, entre ellos encontramos el lemnisco lateral, los colículos inferiores, el núcleo geniculado medial y el núcleo de la oliva, todo ellos implicados en el circuito de audición. En este sentido, se sabe que la transmisión del impulso nervioso generado por la onda de sonido se transmite de las fibras del nervio auditivo, en el núcleo coclear, y de las señales de núcleo coclear se transfieren a los núcleos olivares superiores del tronco cerebral, la vía lemnisco lateral, y hasta el colículo inferior en el cerebro medio. Además puede detectarse actividad en el núcleo geniculado medial del tálamo, y, finalmente, señales llegan a la corteza auditiva primaria ⁷². La maduración del aparato conductor se encuentra lo suficientemente avanzado para permitir la audición del animal hacia el día 15 de edad. Sin embargo, la maduración de los sensores auditivos y de los circuitos neuronales involucrados continúa incluso más allá de esta edad ⁷³. El desarrollo postnatal de la sensibilidad auditiva de rata podría servir de modelo para el desarrollo prenatal de la audición en el feto humano, aunque en este último, con un curso de tiempo más lento.

Como se muestra en la figura 7, HIG-1 se expresa en altos niveles en estos núcleos en el día 5 de edad. Sería de gran importancia analizar el curso temporal de esta expresión para constatar si está asociada de alguna forma con la adquisición de funcionalidad de los núcleos durante la maduración de los circuitos auditivos.

Otra de las regiones con maduración postnatal que presenta expresión de HIG-1 es la amígdala. En roedores y primates, incluyendo seres humanos la amígdala consta de 13 núcleos y áreas corticales demarcadas en varias subdivisiones ⁷⁴⁻⁷⁶. La amígdala es una de las regiones del cerebro en la que se ha reportado un desarrollo tardío en los seres humanos y otros animales ⁷⁷. Los cambios durante el desarrollo tardío observados en el núcleo basolateral (BLN) de la rata incluyen el aumento de la inervación colinérgica, caracterizado por la actividad de la acetilcolinesterasa que no alcanza los niveles de adulto hasta el día 60 de vida postnatal ⁷⁸. La inervación progresiva por la parte posterior del BLN a la corteza prefrontal medial llega hasta el día 65 de vida postnatal ⁷⁹.

En base a la evidencia presentada anteriormente, podríamos sugerir que la expresión de HIG-1 podría estar vinculada con procesos de maduración y reorganización de regiones del SNC aún inmaduras que adquieren su funcionalidad en las primeras semanas de vida. Sería interesante profundizar si existe una relación entre la expresión de la proteína y el desarrollo de las funciones que regulan dichas regiones por ejemplo los procesos de memoria, las respuestas de miedo y la audición.

Por otra parte, ha sido descrito un dimorfismo sexual en el número de neuronas en algunos núcleos que forman la amígdala y en varios subnúcleos asociados con el sistema vomeronasal ⁸⁰⁻⁸², por lo que sería interesante analizar el patrón de expresión de HIG-1 en esta región del cerebro que posee un desarrollo tardío, y un dimorfismo sexual en el número de neuronas

2 Linajes celulares que presentan expresión de HIG-1

Debido a problemas en la puesta a punto con el marcador de neuronas (β -3-tubulina), este objetivo se vio parcialmente afectado. Pese a un número de intentos en optimizar las condiciones de la técnica, no se logró obtener inmunoreactividad positiva para tal marcador.

Pese a ello, se pudo mostrar que en algunas regiones la expresión de HIG-1 estaba presente en otro tipo de linaje celular como son los astrocitos fibrosos GFAP+. Algunas de estas regiones son cuerpo calloso, la comisura anterior y el quiasma óptico.

Trabajos anteriores en nuestro laboratorio sobre cortes de médula de rata de 1, 8, 15 y 90 días de vida, mostraron que el perfil de expresión de la proteína cambiaba a lo largo de la edad desde una expresión mayormente neuronal a un patrón de expresión principalmente en astrocitos⁵³. En base a ello, los autores sugirieron que la proteína HIG-1 podía tener diferentes papeles funcionales en este tipo de células en el SNC. Una de tales funciones podría estar relacionada con la neuroprotección ya que muchas poblaciones de neuronas se someten a muerte celular programada en el desarrollo tardío⁵³. El descenso de la expresión de HIG-1 en neuronas desde el día 8 es consistente con que la maduración de las neuronas espinales y sus conexiones ocurre alrededor del día 10 postnatal⁸³⁻⁸⁵. Por otra parte, siendo HIG-1 una proteína vinculada con la integridad y funcionalidad mitocondrial, es interesante asociar su presencia con diferencias funcionales de estos tipos celulares. Los astrocitos se consideran células "glucolíticas", mientras que las neuronas no recurren a la glucólisis para mantener la producción de ATP. Almeida y colaboradores mostraron que la inhibición de la respiración mitocondrial es proapoptótica en las neuronas, pero no en los astrocitos que cambian a metabolismo glucolítico⁸⁶. Sería entonces muy interesante profundizar en qué papel juega HIG-1, en cada uno de los linajes celulares.

3 Expresión de la proteína HIG-1 en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica

Con el fin de aportar elementos a una relación entre los niveles de HIG-1 y la decisión entre supervivencia o muerte celular, se eligió analizar la expresión de HIG-1 en el SDN-MPOA debido a que este núcleo sufre remodelación mediante apoptosis, en los primeros días de vida postnatal en ratas.

En una primera instancia se procuró la identificación del núcleo y del dimorfismo sexual en el área, descrita previamente por Gorski y colaboradores⁵⁴. Esta resultó una tarea ardua ya que el SDN-MPOA de crías de ratas no se encuentra en el mismo sitio anatómico que en ratas adultas. En adultos el SDN-MPOA se describe por debajo de la comisura anterior y a los lados del tercer ventrículo. Sin embargo, en crías de 5 y 8 días de vida que se analizaron en ese trabajo, el mismo núcleo se localiza luego de que la comisura anterior desaparece en los cortes coronales, cuando comienza a aparecer el hipocampo en la parte superior del cerebro.

Una vez puesta a punto la localización del núcleo, nuestros análisis permitieron confirmar que el núcleo es de mayor tamaño en machos que en hembras tanto de 5 como de 8 días de edad.

Otro de los puntos que se buscó confirmar para avalar nuestra hipótesis fue la presencia del dimorfismo en el número de células que expresan caspasa 3 activada en este núcleo. Estos datos estaban presentes en la bibliografía⁵⁹, pero resultó de interés observar presencia de

células positivas para caspasa-3 activada en los cortes en donde se analizó la presencia de HIG-1. Tal como se mostró, si bien este estudio es solo preliminar y no se arribó a análisis cuantitativo, se observó un dimorfismo en el núcleo de crías P8, con algunas células que expresan caspasa3 activada a nivel nuclear en hembras y no en machos.

Davis y colaboradores mostraron que el número de células que se someten a apoptosis es variable a lo largo de las dos primeras semanas de vida postnatal y a su vez presenta un dimorfismo sexual⁵⁹.

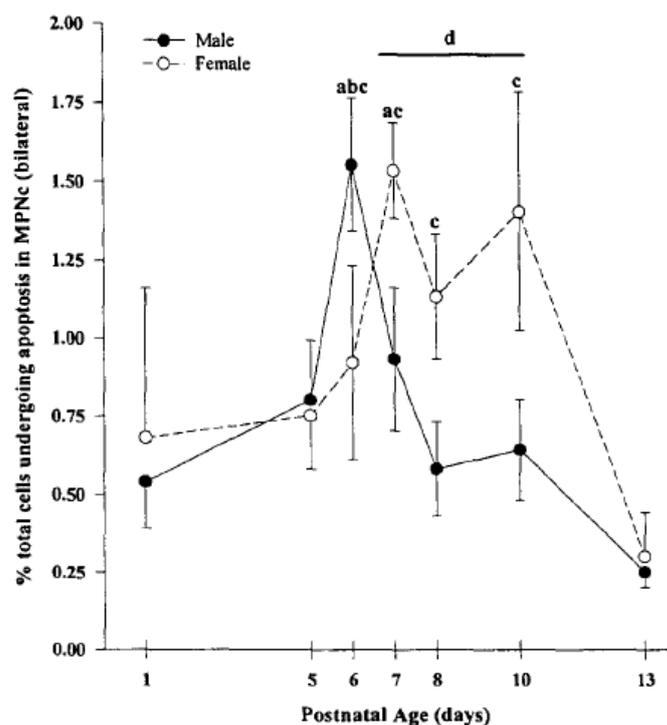


Fig. 25. Incidencia de la apoptosis en SDN-MPOA en machos y hembras entre 1 y 13 días de vida postnatal. Modificado de⁵⁹.

Tal como se observa en el gráfico de la figura 25, la incidencia de la apoptosis en el desarrollo de este núcleo es variable. En determinadas edades presentan mayor número de células apoptóticas las hembras, en otras los machos y en algunas edades los investigadores no encontraron diferencias entre sexos, hasta que finalmente los niveles bajan en ambos sexos⁵⁹. La ventana de tiempo que elegimos en este trabajo abarca dos situaciones: el día 5 de vida postnatal en las que los autores no refieren diferencias sexuales en el número de células apoptóticas y el día 8 en donde las hembras presentaron mayor número de células apoptóticas que los machos, que sería la fase en la que se va definiendo la diferencia de tamaño de este núcleo.

Como mostraron nuestros resultados en el día 5, los niveles de HIG-1 fueron superiores en hembras que en machos en los dos umbrales analizados. Pese a que en este día en particular no se observan diferencias en el número de células apoptóticas, al día siguiente en el día 6 Davis y colaboradores describen que el macho es el que presenta mayor tasa de muerte celular en el núcleo. Los niveles de HIG-1 en el día 8 cambian, mostrando el patrón opuesto, siendo

mayor en machos que en hembras y si se observa el gráfico de la figura 25, se podrá notar que a esta edad las hembras presentan mayor número de células apoptóticas.

HIG-1 podría estar implicado en la remodelación que sufre este núcleo, dado que presenta el patrón opuesto al observado en el número de células apoptóticas, y podría estar desempeñando un rol citoprotector.

Es de destacar que trabajos más recientes han mostrado que la apoptosis no es el único proceso que regula la remodelación del SDN-MPOA. Procesos como la acetilación de las histonas, la metilación del ADN, la diferenciación de astrocitos, la migración neuronal, la espinogénesis y el aumento de la supervivencia celular, son procesos que participan y que aportan al desarrollo total de este núcleo ⁸⁷. HIG-1 podría estar participando, junto a otras moléculas en todos los procesos que determinan la formación de este núcleo. Otro punto a tener en cuenta es que a medida que este trabajo se llevaba a cabo fue surgiendo nueva evidencia de las moléculas con las que HIG-1 interactúa y de las cascadas moleculares en las que HIG-1 participa. An y colaboradores analizaron el rol de HIG-1 en la integridad mitocondrial, mostrando que su depleción resulta en la fisión mitocondrial y otros desórdenes. Estos investigadores demostraron que HIG-1 funciona mediante una unión específica a OPA-1 (Optic Atrophy), un elemento clave en la fusión de las mitocondrias, inhibiendo su clivaje ⁵². OPA1 está involucrada en la fusión mitocondrial y además en la liberación del Citocromo C ⁸⁸. Estos dos procesos son funcionalmente distintos ⁸⁹, sin embargo, la capacidad de las mitocondrias para fusionar o no su membrana interna es crucial para contrarrestar una señal de muerte celular en cascada ⁹⁰. Así, la función anti-apoptótica de HIG-1 podría radicar en que al unirse a OPA1 evita la escisión proteolítica de OPA1L a OPA1S, que a su vez contrarresta la liberación de citocromo C ^{42,52} (Ver fig. 26). Con el fin de analizar el rol de la interacción de HIG-1 y OPA-1 en la formación de este núcleo se podrían realizar experimentos de colocalización con anticuerpos específicos y microscopía confocal.

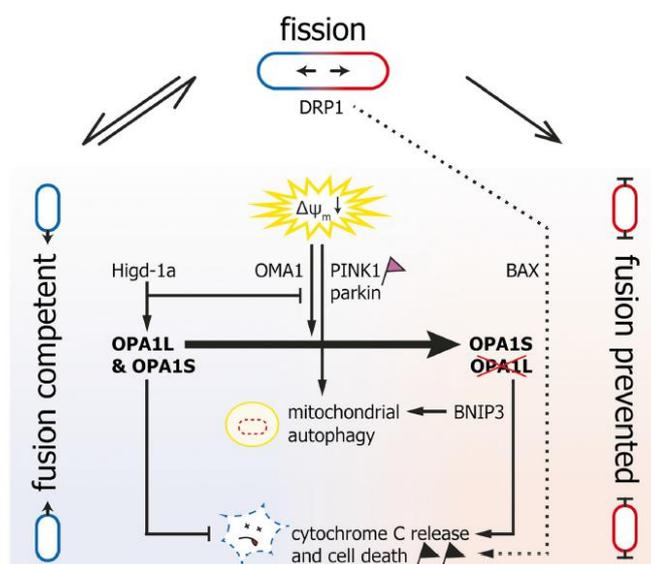


Fig. 26. Esquema de las moléculas implicadas en el mantenimiento de la integridad mitocondrial. HIG-1 inhibe la escisión proteolítica de OPA1L a OPA1S y de esta forma se previene la liberación del Citocromo C (Modificado de ⁹¹).

Con respecto a las poblaciones celulares que expresan HIG-1 en el SDN-MPOA no se observó presencia de astrocitos GFAP+. Sin embargo, en la bibliografía está reportada la presencia de astrocitos GFAP+ en el área preóptica de crías de rata, incluso a pocas horas del nacimiento⁹². A su vez, está reportado un dimorfismo sexual en el número de astrocitos y en las características de estos⁹³. Resulta de gran interés profundizar los linajes celulares que presentan expresión de HIG-1, con otros marcadores de glía, incluso de astrocitos protoplasmáticos en esta región del SNC.

4 Rol de HIG-1 en el desarrollo del SNC

El análisis descriptivo del patrón de distribución de HIG-1, presentado en este trabajo, sugiere una distribución heterogénea en las diferentes áreas del cerebro y tipos celulares. En algunas áreas, como la corteza parietal y el diencefalo los niveles aumentan en las dos primeras semanas de vida. En general hemos observado altos niveles de expresión en núcleos que aún continúan remodelándose o que aún no se encuentran maduros.

Dado que HIG-1 está implicado en el aumento de la supervivencia celular en algunos modelos^{42,52,94} se podría aventurar una implicancia de HIG-1 en el desarrollo de las dos primeras semanas, dado los altos niveles en los que se expresa y su patrón de expresión. HIG-1 podría jugar un rol en regulación de la supervivencia neuronal en este período marcado por la remodelación de tejido nervioso mediante varios procesos entre ellos la apoptosis.

Para confirmar una relación de esta proteína con la funcionalidad o con la maduración de una área, resultaría muy interesante realizar ensayos en donde se manipule la expresión del gen.

Resultados previos de nuestro equipo sobre la pérdida de función de HIG-1, en fases tempranas del desarrollo en pez cebra, muestran que la disminución de los niveles del mensajero afecta el desarrollo temprano de embriones. Se han reportado alteraciones en el desarrollo de los cartílagos cráneo-faciales, retraso en la eclosión, e indicios de aumento en el número de células alteradas o apoptóticas, en la zona del mesénquima cefálico derivado de la cresta neural⁴⁴.

Por otra parte, resultaría de gran interés estudiar el patrón de expresión de HIG-1 frente a una situación de estrés o una injuria para analizar su rol en el aumento de la supervivencia celular en un modelo animal. En esta línea queda como perspectiva analizar los cambios de expresión de HIG-1 en respuesta a la hipoxia, fenómeno por el cual fue identificado inicialmente este gen.

CONCLUSIONES

HIG-1 presenta un patrón de distribución amplio, que abarca varias regiones dentro del SNC. Su expresión es amplia pero no homogénea siendo mucho mayor en áreas específicas. Las regiones que presentaron expresión de HIG-1, son, frecuentemente, aquellas que aún no habían completado su maduración topográfica, funcional o estructural y en la que podría estar participando la apoptosis. Algunas de ellas son: Corteza parietal, Diencefalo, Médula espinal, Amígdala, núcleos que componen el circuito auditivo e hipocampo.

Los niveles de expresión de la proteína varían también con la edad. Estos niveles crecen progresivamente entre el día 1 y 15 de vida postnatal en corteza parietal y diencefalo. En médula espinal los máximos valores se encontraron en animales de 5 días de edad. No se encontraron diferencias entre sexos.

El análisis de la morfología de las células que presentaron expresión de HIG-1, sugirió que las mismas podían ser neuronas o astrocitos, dependiendo de la región del SNC. La colocalización con GFAP permitió determinar que, en algunas regiones como el nervio óptico, el cuerpo calloso y la comisura anterior, HIG-1 se expresa en astrocitos,.

Se confirmó el dimorfismo sexual en el tamaño del núcleo sexualmente dimórfico SDN-MPOA en animales de 5 y 8 días de edad, siendo de mayor tamaño en machos.

En animales de 8 días de edad, solo se encontraron células positivas para caspasa 3 activada en hembras, sugiriendo una mayor tasa de apoptosis en el SDN-MPOA.

En este núcleo dimórfico, los niveles de HIG-1 variaron con respecto a la edad y al sexo. Se encontraron mayores niveles en animales de 5 días de edad para ambos sexos. Dentro de una misma edad, en animales de 5 días los mayores niveles encontrados fueron en hembras, y en animales de 8 días fueron en machos.

Dado que los datos bibliográficos indican que en el entorno de 5-6 días de vida la apoptosis es mayor en machos, y a los 8 días mayor en hembras, el patrón diferencial entre sexos encontrado para HIG-1, se condice con la hipótesis de su participación en la señalización citoprotectora.

PERSPECTIVAS

Resulta de gran interés y nos proponemos:

- 1) Profundizar en la caracterización de las poblaciones celulares que presentan expresión de HIG-1. Para ello, se realizará una colocalización con otro marcador neuronal, por ejemplo NeuN, que permitiría confirmar si las células que presentan expresión de esta proteína son neuronas.
- 2) Analizar el rol de HIG-1 en la maduración de algunos núcleos como los presentes en el circuito auditivo o en la amígdala, dado que estos núcleos presentan maduración tardía.
- 3) Estudiar el patrón de expresión de HIG-1 frente a una situación de estrés o una injuria para analizar su rol en el aumento de la supervivencia celular en un modelo animal.
- 4) Analizar la interacción de HIG-1 y OPA-1 en el SDN-MPOA y analizando el rol de estas dos proteínas en la formación de dicho núcleo.
- 5) Realizar estudios de silenciamiento del HIG-1 ya que estos permitirían un análisis del rol del producto de este gen en el desarrollo del SNC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bishop, B. Neural plasticity: Part 2. Postnatal maturation and function-induced plasticity. *Phys. Ther.* **62**, 1132–1143 (1982).
 2. Kuan, C. Y., Roth, K. a, Flavell, R. a & Rakic, P. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.* **23**, 291–297 (2000).
 3. Roth, K. a & Sa, C. D. Poptosis and. **266**, 261–266 (2001).
 4. Forger, N. G. Cell death and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroscience* **138**, 929–38 (2006).
 5. Tobet, S. A. Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 373–6 (2002).
 6. Rice, D. & Barone, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* **108**, 511–533 (2000).
 7. Stansberg, C. *et al.* Gene expression profiles in rat brain disclose CNS signature genes and regional patterns of functional specialisation. *BMC Genomics* **8**, 94 (2007).
 8. Milner, R. J. & Sutcliffe, J. G. Gene expression in rat brain. *Nucleic Acids Res.* **11**, 5497–5520 (1983).
 9. Coggeshall, R. E., Pover, C. M. & Fitzgerald, M. Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **82**, 193–212 (1994).
 10. Plenderleith, M. B., Wright, L. L. & Snow, P. J. Expression of lectin binding in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord during pre- and postnatal development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **68**, 103–9 (1992).
 11. Stead, J. D. H. *et al.* Transcriptional profiling of the developing rat brain reveals that the most dramatic regional differentiation in gene expression occurs postpartum. *J. Neurosci.* **26**, 345–353 (2006).
 12. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–57 (1972).
-

13. Becerra, L. V. & Pimienta, H. J. Apoptosis neuronal: La diversidad de señales y de tipos celulares. *Colomb. Med.* **40**, 124–133 (2009).
 14. Cowan, W., Fawcett, J., O'Leary, D. & Stanfield, B. Regressive events in neurogenesis. *Science (80-)*. **225**, 1258–1265 (1984).
 15. Hamburger, V. History of the discovery of neuronal death in embryos. *J. Neurobiol.* **23**, 1116–23 (1992).
 16. Meier, P., Finch, a & Evan, G. Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796–801 (2000).
 17. Lowrie, M. B. & Lawson, S. J. Cell death of spinal interneurons. *Prog. Neurobiol.* **61**, 543–555 (2000).
 18. Nonomura, K. *et al.* Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells. *Dev. Cell* **27**, 621–634 (2013).
 19. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456–62 (1995).
 20. Das, R., Reddy, E. P., Chatterjee, D. & Andrews, D. W. Identification of a novel Bcl-2 related gene, BRAG-1, in human glioma. *Oncogene* **12**, 947–51 (1996).
 21. Clayton, R., Clark, J. B. & Sharpe, M. Cytochrome c release from rat brain mitochondria is proportional to the mitochondrial functional deficit: implications for apoptosis and neurodegenerative disease. *J. Neurochem.* **92**, 840–9 (2005).
 22. Ashe, P. C. & Berry, M. D. Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **27**, 199–214 (2003).
 23. Yoshida, M., Yuri, K., Kizaki, Z., Sawada, T. & Kawata, M. The distributions of apoptotic cells in the medial preoptic areas of male and female neonatal rats. *Neurosci. Res.* **36**, 1–7 (2000).
 24. Heiskanen, K. M., Bhat, M. B., Wang, H. W., Ma, J. & Nieminen, A. L. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 5654–5658 (1999).
 25. Wadia, J. S. *et al.* Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-deprenyl. *J. Neurosci.* **18**, 932–47 (1998).
-

26. Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. & Newmeyer, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132–6 (1997).
 27. Yang, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129–32 (1997).
 28. Krohn, A. J., Wahlbrink, T. & Prehn, J. H. Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **19**, 7394–404 (1999).
 29. Johnson, B. W., Cepero, E. & Boise, L. H. Bcl-xL inhibits cytochrome c release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* **275**, 31546–53 (2000).
 30. Sun, T. *et al.* Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science* **308**, 1794–8 (2005).
 31. Antonsson, B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family ‘killer-proteins’ and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res.* **306**, 347–61 (2001).
 32. Saito, M., Korsmeyer, S. J., Schlesinger, P. H., Farber, D. & Hughes, H. Reconstituted in Pure Liposomes. **2**, 553–555 (2000).
 33. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–19 (1993).
 34. Krajewski, S. *et al.* Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am. J. Pathol.* **145**, 1323–36 (1994).
 35. Sedlak, T. W. *et al.* Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7834–8 (1995).
 36. Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312–6 (1998).
 37. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1 ?? cytochrome C multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549–11556 (1999).
 38. Wang, J. *et al.* Pancreatic β cells lack a low glucose and O₂-inducible mitochondrial protein that augments cell survival. **103**, (2006).
-

39. Denko, N. *et al.* Epigenetic Regulation of Gene Expression in Cervical Cancer Cells by the Tumor Microenvironment Epigenetic Regulation of Gene Expression in Cervical Cancer Cells by the Tumor Microenvironment 1. 480–487 (2000).
 40. Bedo, G., Vargas, M., Ferreiro, M.-J., Chalar, C. & Agrati, D. Characterization of hypoxia induced gene 1: expression during rat central nervous system maturation and evidence of antisense RNA expression. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 431–436 (2005).
 41. Ameri, K. *et al.* HIGD1A Regulates Oxygen Consumption, ROS Production, and AMPK Activity during Glucose Deprivation to Modulate Cell Survival and Tumor Growth. *Cell Rep* **10**, 891–899 (2015).
 42. An, H.-J. *et al.* The survival effect of mitochondrial Higd-1a is associated with suppression of cytochrome C release and prevention of caspase activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 2088–98 (2011).
 43. Salnikow, K. *et al.* The Regulation of Hypoxic Genes by Calcium Involves c-Jun / AP-1 , Which Cooperates with Hypoxia-Inducible Factor 1 in Response to Hypoxia. *Society* **22**, 1734–1741 (2002).
 44. Sosa, I. Patrón de expresión y efecto de la pérdida de función de hig-1 en el desarrollo del pez cebra. (Universidad de la República, 2014).
 45. O'Rourke, J. F. *et al.* Hypoxia response elements. *Oncol. Res.* **9**, 327–32 (1997).
 46. Greijer, A. E. & van der Wall, E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J. Clin. Pathol.* **57**, 1009–14 (2004).
 47. Ameri, K. *et al.* Nuclear localization of the mitochondrial factor HIGD1A during metabolic stress. *PLoS One* **8**, e62758 (2013).
 48. Daugas, E. *et al.* Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **14**, 729–39 (2000).
 49. Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D. & Snyder, S. H. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11669–74 (1997).
 50. Gallo, L. I., Lagadari, M., Piwien-Pilipuk, G. & Galigniana, M. D. The 90-kDa heat-shock protein (Hsp90)-binding immunophilin FKBP51 is a mitochondrial protein that translocates to the nucleus to protect cells against oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **286**, 30152–60 (2011).
-

51. Hayashi, H. *et al.* HIG1, a novel regulator of mitochondrial γ -secretase, maintains normal mitochondrial function. *FASEB J.* **26**, 2306–17 (2012).
 52. An, H.-J. *et al.* Higd-1a interacts with Opa1 and is required for the morphological and functional integrity of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13014–9 (2013).
 53. Bedó, G., Lagos, P. & Agrati, D. Temporal distribution of Hig-1 (hypoxia-induced gene 1) mRNA and protein in rat spinal cord: changes during postnatal life. *J. Mol. Neurosci.* **47**, 666–73 (2012).
 54. Gorski, R. A., Gordon, J. H., Shryne, J. E., Southam, A. M. & Angeles, L. 333 evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. **148**, 333–346 (1978).
 55. Bloch, G. J. & Gorski, R. A. Cytoarchitectonic analysis of the SDN-POA of the intact and gonadectomized rat. *J. Comp. Neurol.* **275**, 604–12 (1988).
 56. De Jonge, F. H. *et al.* Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. *Brain Res. Bull.* **23**, 483–92 (1989).
 57. Kato, Y., Nakashima, S., Maekawa, F. & Tsukahara, S. Involvement of postnatal apoptosis on sex difference in number of cells generated during late fetal period in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in rats. *Neurosci. Lett.* **516**, 290–5 (2012).
 58. Döhler, K. D. *et al.* Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res.* **302**, 291–295 (1984).
 59. Davis, E. C. & Popper, P. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. **734**, 10–18 (1996).
 60. Tsukahara, S. Sex differences and the roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. *J. Neuroendocrinol.* **21**, 370–376 (2009).
 61. Patchev, A. V, Götz, F. & Rohde, W. Differential role of estrogen receptor isoforms in sex-specific brain organization. *FASEB J.* **18**, 1568–70 (2004).
 62. Tsukahara, S., Kakeyama, M. & Toyofuku, Y. Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. *J. Neurobiol.* **66**, 1411–1419 (2006).
-

63. Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 110–122 (2008).
 64. Yao, M. *et al.* Transcriptome analysis of microRNAs in developing cerebral cortex of rat. *BMC Genomics* **13**, 232 (2012).
 65. Pressler, R. & Auvin, S. Comparison of Brain Maturation among Species: An Example in Translational Research Suggesting the Possible Use of Bumetanide in Newborn. *Front. Neurol.* **4**, 1–4 (2013).
 66. Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J. Effect of Chronic Maternal Methadone Exposure on Perinatal Development. *Neonatology* **31**, 271–282 (1977).
 67. Ferrer, I., Bernet, E., Soriano, E., del Rio, T. & Fonseca, M. Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* **39**, 451–8 (1990).
 68. Gottlieb, A., Keydar, I. K. & Epstein, H. T. Rodent Brain Growth Stages: An Analytical Review. *Neonatology* **32**, 166–176 (1977).
 69. Bleier, R., Byne, W. & Siggelkow, I. Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J. Comp. Neurol.* **212**, 118–30 (1982).
 70. Davis, E. C., Shryne, J. E. & Gorski, R. A. Structural Sexual Dimorphisms in the Anteroventral Periventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus Are Sensitive to Gonadal Steroids Perinatally, but Develop Peripubertally. *Neuroendocrinology* **63**, 142–148 (1996).
 71. Mody, M. *et al.* Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *PNAS* (2001).
 72. Saliu, A. THE DEVELOPMENT OF HEARING IN RATS: Reliability of wave 1 as a determinant of auditory maturation and contributions of peripheral structure progression. 1–33
 73. Geal-Dor, M., Freeman, S., Li, G. & Sohmer, H. Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear. Res.* **69**, 236–42 (1993).
 74. Chareyron, L. J., Banta Lavenex, P., Amaral, D. G. & Lavenex, P. Stereological analysis of the rat and monkey amygdala. *J. Comp. Neurol.* **519**, 3218–3239 (2011).
 75. Sorvari, H., Soininen, H. & Pitkänen, A. Calretinin-immunoreactive cells and fibers in the
-

- human amygdaloid complex. *J. Comp. Neurol.* **369**, 188–208 (1996).
76. Pitkanen, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. (2000). at <https://www.researchgate.net/publication/248831599_Connectivity_of_the_rat_amygdaloid_complex>
77. Rubinow, M. J. & Juraska, J. M. Neuron and glia numbers in the basolateral nucleus of the amygdala from preweaning through old age in male and female rats: a stereological study. *J. Comp. Neurol.* **512**, 717–25 (2009).
78. Berdel, B., Moryś, J., Maciejewska, B. & Narkiewicz, O. Acetylcholinesterase activity as a marker of maturation of the basolateral complex of the amygdaloid body in the rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* **14**, 543–9 (1996).
79. Cunningham, M. G., Bhattacharyya, S. & Benes, F. M. Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *J. Comp. Neurol.* **453**, 116–30 (2002).
80. Morris, J. A., Jordan, C. L. & Breedlove, S. M. Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J. Comp. Neurol.* **506**, 851–9 (2008).
81. Cooke, B. M., Stokas, M. R. & Woolley, C. S. Morphological sex differences and laterality in the prepubertal medial amygdala. *J. Comp. Neurol.* **501**, 904–15 (2007).
82. Guillamón, A. & Segovia, S. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res. Bull.* **44**, 377–82 (1997).
83. Vinay, L., Brocard, F., Pflieger, J. F., Simeoni-Alias, J. & Clarac, F. Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res. Bull.* **53**, 635–47 (2000).
84. Vinay, L., Brocard, F. & Clarac, F. Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 4562–4566 (2000).
85. Walton, K. D. & Navarrete, R. Postnatal changes in motoneurone electrotonic coupling studied in the in vitro rat lumbar spinal cord. *J. Physiol.* **433**, 283–305 (1991).
86. Almeida, A., Almeida, J., Bolaños, J. P. & Moncada, S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15294–9 (2001).
87. Lenz, K. M., Nugent, B. M. & McCarthy, M. M. Sexual differentiation of the rodent
-

- brain : dogma and beyond. **6**, 1–13 (2012).
88. Olichon, A. *et al.* Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 7743–6 (2003).
 89. Frezza, C. *et al.* OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177–89 (2006).
 90. Merkwirth, C. *et al.* Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev.* **22**, 476–88 (2008).
 91. Alavi, M. V & Fuhrmann, N. Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: understanding mitochondrial network dynamics. *Mol. Neurodegener.* **8**, 32 (2013).
 92. Amateau, S. K. & McCarthy, M. M. Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 904–10 (2002).
 93. McCarthy, M. M. & Konkle, A. T. M. When is a sex difference not a sex difference? *Front. Neuroendocrinol.* **26**, 85–102 (2005).
 94. Zhang, X. *et al.* β -Cells with relative low HIMP1 overexpression levels in a transgenic mouse line enhance basal insulin production and hypoxia/hypoglycemia tolerance. *PLoS One* **7**, e34126 (2012).
-

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a la Sección Genética Evolutiva por permitirme realizar esta pasantía, a las secciones Bioquímica y Biología Molecular, Biología Celular, Fisiología y Nutrición, y al Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias.

A mis compañeras de laboratorio y a los integrantes del Laboratorio de Genética Evolutiva en Modelos Animales.

A Dra. Gabriela Bedó, por la sabiduría, el conocimiento gentilmente cedido, la humildad, la paciencia, la dedicación.

A MSc. María José Zuluaga, por la paciencia, dedicación, tiempo, y gran dulzura.

A mi familia

ANEXO

Análisis de los niveles de expresión HIG-1 en áreas del SNC en función de la edad y el sexo

Extracción de proteínas

Las muestras de tejido provenientes de corteza parietal, médula espinal y diencéfalo (alrededor de 50 mg de tejido) se homogenizan en aproximadamente 400 μ L de Buffer de extracción de proteínas. Este contiene PMSF (1 mM), β - mercaptoetanol (1%), cocktail inhibidor de proteasas de Sigma Aldrich # catálogo P2714 (1%) y Urea Cracking Buffer (UCB), (10 mM).

Una vez homogeneizadas permanecen 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugan 20 min a velocidad máxima. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo eppendorf con la precaución de no alterar el pellet en el caso de lo hubiera.

Posteriormente se almacenan en un freezer de -20°C para su conservación.

Urea Cracking Buffer (50ml)

Reactivo	Stock	Concentración final
Na_2HPO_4	PM= 142 g/mol	10 mM
SDS	10%	1 %
UREA	PM= 60,06 g/mol	5 M

Agregar en el momento de usar: PMSF (final 1 mM) y β -mercaptoetanol (1% final), cocktail inhibidor de proteasas (1% final). El UCB es almacenado a temperatura ambiente.

Separación de las proteínas en base a su Peso Molecular

Preparación de las muestras

Las proteínas se descongelan en hielo antes de la corrida y se centrifugan a velocidad máxima 10 minutos. Se preparan las muestras para la corrida (15 µg) con un buffer de carga casero 5X (50% glicerol, 5% SDS, 0,225 M Tris-Cl pH 6,8, 0,02% azul de bromofenol, 0,25 M DTT), el buffer se utiliza 1X final. Luego se hierven las muestras preparadas por 5 minutos para lograr una buena desnaturalización proteica. Se llevan a hielo un instante y centrifugan brevemente.

El marcador de peso molecular a utilizar es Rainbow Coloured Protein Molecular Weight Markers High Molecular Weight range (14300-220000 Da) de Amersham Biosciences de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Las muestras de proteínas son ensayadas en la técnica SDS-PAGE. Las concentraciones que se utilizan para los geles fueron: 3,75 % para el gel concentrador (stacking) y, 12% para el gel separador.

Se arma la cuba electroforética y se utiliza un Buffer de Corrida que contiene Buffer Tris-Glicina 1X SDS (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM, SDS 0,1%). La corrida electroforética se realiza a una intensidad de 25 mA, por el lapso de 1h- 1h 10 min a temperatura ambiente.

Gel Concentrador STACKING 3,75% (5 ml)

Reactivo	Volumen
H ₂ O	3,85 ml
Tris 1,5M pH 6,8	0,42 ml
Acrilamida 30%	0,625 ml
SDS 10%	50 µl
APS 10%	50 µl
Temed	5 µl

Gel Separador 12%

Reactivo	Para 8 ml
H ₂ O	2,64 ml
Tris 1,5M pH 8,8	2 ml
Acrilamida 30 %	3,2 ml
SDS 10%	80 µl
APS 10%	80 µl
Temed	4,5 µl

Transferencia de las proteínas a una membrana

Una vez separadas las proteínas en base a su peso molecular, las mismas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Biorad Laboratories 0.45 μm) en la cuba de transferencia TE 22 Tank Transfer Unit de de Amersham Biosciences, para ello se utiliza un Buffer de transferencia (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM, SDS 0,025%, Etanol 20%), en el que se equilibra la membrana y el gel durante 10 min, y se transfiere durante 1 hora y 30 min a 4°C. El voltaje y la intensidad utilizada son de 100 V y 300 mA, respectivamente. Una vez terminada la transferencia, se procede a teñir la membrana con Rojo Ponceau, y el gel con Azul de Coomassie para evidenciar la eficiencia de la transferencia.

Protocolo de Visualización de Proteínas con solución de Rojo Ponceau

1. Después de la transferencia se pasa la membrana a un tupper con TBS 1X.
2. Sacar el TBS 1X y poner el rojo unos minutos (2 aprox). Guardar el rojo ponceau para reutilizar.
3. Lavar con agua hasta ver las bandas.
4. Se deja secar la membrana sobre un papel Whatman.
5. Escanear
6. Lavar con agua MRho hasta sacar todo.
7. También se puede lavar con TBS 1X.

Preparación Rojo Ponceau (50 ml)

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Polvo rojo ponceau	0.25 g	0.5%
Ácido Acético	500 μl	1%

Enrasar con agua miliRo y guardar a temperatura ambiente.

Protocolo de tinción del gel con Azul de Coomassie

1. Después de la transferencia se pasa el gel a un tupper con Azul de Coomassie.
2. Se deja el mismo toda la noche a temperatura ambiente
3. Al otro día se pasa el gel a otro tupper con solución de desteñido, se fue cambiando la misma hasta desteñirlo completamente.

Preparación de Azul de Coomassie (100 mL)

Reactivo	Cantidad	Concentración final
H ₂ O MilliRho	45 mL	45 %
Etanol 95%	45 mL	45 %
Ácido Acético Glacial	10 mL	10 %
Polvo Coomassie Brilliant Blue R250	0,25 g	8,74 mM

Inmunoensayo

1. Se bloquea de la membrana toda la noche a 4°C con TBS-Leche 5%.
2. Luego se realiza un lavado rápido con TBS-T (0.05%) para quitar la leche.
3. 2 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T (0.05%).
4. Se incuba con anticuerpo primario en TBS-T (0,05%)-BSA (3%).
5. 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T (0.05%)
6. Se incuba con anticuerpo secundario en TBS-T (0,05%)-BSA (3%).
7. 2 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T (0.05%).
8. 1 lavado con TBS de 10 minutos.
9. Solución de revelado 5 minutos en agitación con kit ECL (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de Thermo Scientific).

TBS

Reactivo	Cantidad
H ₂ O MilliRho	Csp 1 L
Tris	2,42 g
NaCl	28,24 g

TBS-Tween (0,05%)

Reactivo	Cantidad
H ₂ O MilliRho	Csp 1 L
Tris	2,42 g
NaCl	28,24 g
Tween-20	500 µL

Caracterización del patrón general de expresión de HIG-1 por inmunohistoquímica

Protocolo de perfusión de crías de 5 y 8 días de edad

Las crías son anestesiadas con pentobarbital sódico (80 mg/kg se perfunden de forma transcardíaca con solución salina fosfatada 0.05 M (PBS pH 7.5) heparinizada (0,5%), seguida de solución de paraformaldehído al 4% en PBS 1X.

Una vez que el animal entra en plano quirúrgico, abrir la caja torácica, cortando el diafragma (Fig. 27 A) y ambos lados de la parrilla costal en su totalidad incluyendo la clavícula (Fig. 27 B).

Acomodar la parrilla costal hacia el rostro del animal (Fig. 27C).

Posteriormente con tijeras curvas cortar el pericardio para facilitar la entrada de la aguja y acomodar los pulmones para que la aurícula derecha quede expuesta.

Introducir la aguja en el ventrículo izquierdo y una vez que el corazón se hincha cortar la aurícula derecha (Fig. 27 D y E).

Lavar el animal con 40 mL de solución de PBS 1X heparinizada (0.5%) y posteriormente administrar 80 mL de paraformaldehído 4%.

Una vez perfundido el animal, disecar el cerebro y colocarlo en frasco correctamente rotulado.

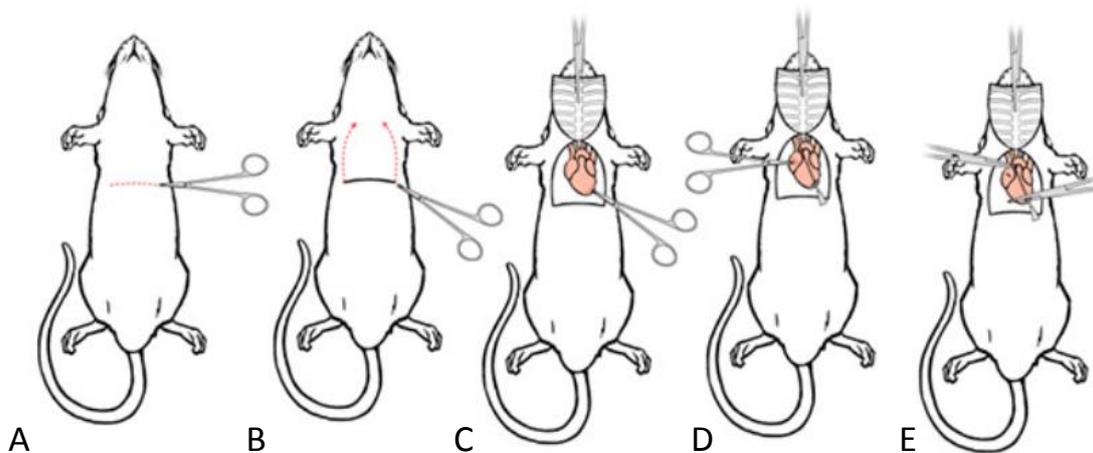


Fig. 27. Perfusión transcardial de roedores. Modificado de Gate *et al.*, 2012

Paraformaldehído 4% (200 mL)

1. De preferencia preparada recientemente.
2. Para una cría se necesitan alrededor de 200 mL.
3. Se prepara en PBS 1X.
4. Calentar el PBS 1X a 60 C y agitando vigorosamente, agregar poco a poco el Paraformaldehído.
5. Dejar disolver agitando, sin que la temperatura pase los 65 C.
6. Una vez disuelto dejar enfriar y filtrar en papel whatman N 1

Reactivo	Concentración	Cantidad
Paraformaldehído	4 %	8 g

PBS 5X (500 mL)

Reactivo	Cantidad
NaCl	20 g
KCl	0.5 g
Na₂HPO₄	3.6 g
KH₂PO₄	0.6 g

Se preparan en H₂O Milli Rho

Protocolo de criopreservación

Una vez disecados los cerebros de crías de rata de la edad que se deseen se deben crioperservar hasta el momento de corte en criostato.

Para ello se colocan los cerebros en concentraciones crecientes de soluciones de PBS-1X sacarosa 15% y PBS-1X sacarosa 30%. Los cerebros se dejan toda una noche o bien hasta que decanten en dichas soluciones.

Al finalizar se congelan a -80°C, hasta el momento de corte.

Protocolo Inmunohistoquímica DAB Free-floating

Los cortes coronales de cerebro de animales P5 y P8 se colocan en placas de 12 pocillos. Se utilizó alrededor de 2 mL de cada solución por pocillo.

Soluciones a preparar

PBS 1X

Solución de bloqueo

Solución con anticuerpo primario

Solución con anticuerpo secundario

DAB

Protocolo

1. Lavados con PBS 1X, 3 lavados de 10 min cada uno.
2. Bloqueo de peroxidases endógenas. H₂O₂ 1% durante 45 min.
3. Lavados con PBS 1X, 3 lavados x 10 min cada uno.
4. Bloqueo de sitios inespecíficos con NDS (Normal Donkey Serum) 3%, BSA 2% durante 60 min.
5. Incubación con anticuerpo primario anti-HIG 1:1000 y 1:3000 48 horas a 4°C.
6. Lavados con PBS 1X, 6 lavados. 3 min, 5 min, 5 min, 7 min, 7 min, 10 min.
7. Incubación con anticuerpo secundario Donkey anti rabbit biotilado 1:600, 90 min a temperatura ambiente.
8. Lavados con PBS 1X, 6 lavados. 3 min, 5 min, 5 min, 7 min, 7 min, 10 min.
9. Incubación con Complejo AB (se hace en PBS-T 0.3%) 60 min a temperatura ambiente.
10. Lavados con PBS 1X, 6 lavados. 3 min, 5 min, 5 min, 7 min, 7 min, 10 min.
11. Se incuba con DAB 0,02% - H₂O₂ 0,003%- 8 min, se corta la reacción con H₂O destilada y se pasan los cortes a PBS 1X.

PRECAUSIONES DAB: El DAB es tóxico, usar guantes, túnica y neutralizar todo lo que toque DAB con solución de inactivación y guardar en bidon para descartar a posteriori con residuos químicos.

Preparación de **solución de inactivación:**

3% de perganmanato de potasio

2% de carbonato de sodio

en agua destilada

Lavar todo lo que toca DAB con esta solución e inactivar volúmenes con volúmenes equivalentes de la solución.

El resto de mesada pasar hipoclorito al 100%.

Montado de cortes ensayados

Se colocan los cortes en una placa de petri con PBS 1X, suavemente se los monta sobre un portaobjetos limpio que contenga polilisina-A.

A los portaobjetos con los cortes se los pasa por soluciones de alcohol de concentración creciente a los tiempos indicados.

Alcohol 50% 3 min.

Alcohol 70% 3 min

Alcohol 90% 3 min

Alcohol 95% 3 min

Alcohol 100% 7 min

xilol 100% 10 min en campana

Una vez que finaliza se coloca permount sobre un cubreobjetos y se unen a los portaobjetos.

Protocolo Inmunoensayo con anticuerpos fluorescentes

Tener preparado:

PBS 1X

PBS 1X Tween 0.1%

PBS 1X- Tween 0.1%-BSA 4%

Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 10 mM pH=6.

Protocolo

1. Descongelar preparados envueltos en papel de aluminio.
2. Choque de calor en plancha 60 C, menos de un minuto.
3. Limpieza con cotonete de PBS seco
4. Hacer un círculo alrededor de los cortes con pappen.
5. Lavar con PBS 1X.
6. Incubación con citrato de Na caliente pH 6 10mM. El citrato se debe calentar 45 seg en
7. microondas, luego se colocan los portas en un copling tapado con el citrato caliente durante
8. 10 min.
9. 30 min con el copling destapado.
10. Lavar en copling con agua (Enjuague).
11. 1 lavado de 10 minutos con PBS 1X.
12. Bloqueo de sitios inespecíficos 1h T.A PBS 1X- Tween 0.1% BSA 4%.
13. Incubación con anticuerpo primario, el anticuerpo se incuba en PBS 1X- Tween 0.1%- BSA 2%
14. O. N. 4°C.
15. 3 lavados con PBS-T 0.1% de 10 min cada uno.
16. Incubar con anticuerpo secundario en PBS-T 0.1%- BSA 2% por 4 horas T.A.
17. 2 lavados con PBS-T 0.1%. 1 lavado con PBS 1X. 10 minutos cada lavado.

Preparar cubres, sopletearlos y limpiarlos bien.

Montado

Para el montado se prepara una solución montante que contiene 50% de glicerol, PBS 1X y DAPI 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final.

Protocolo de análisis de imágenes

Photoshop 7

1. Abrir las microfotografías en photoshop, la microfotografía que contine el SDN-MPOA con tinción de nissl y la microfotografía del corte coronal que contiene dicho núcleo en las secciones que fueron sometidas a inmunohistoquímica.
2. Rotarlas de forma tal que coincida el tercer ventrículo.
3. Superponerlas, la correspondiente a la sección sometida a inmunohistoquímica sobre la que contiene la sección teñida con tinción de Nissl (copiar una y pegarla sobre la otra, jugar con la opacidad de modo que se vean las dos).
4. Con la herramienta seleccionar (lazo) seleccionar en la fotografía de la inmunohistoquímica el área correspondiente al SDN-MPOA.
5. Copiarla. Edit- Copy. O Control+c.
6. Crear una nueva hoja de trabajo con el tamaño de la foto, para saber el tamaño de la foto, click sobre la foto Image- image size y tomar las medidas de la foto. Es importante mantener el tamaño de la fotografía ya que sobre ella se van a realizar medidas de áreas.
7. Sobre la nueva hoja de trabajo pegar lo copiado.
8. Guardar.

ImageJ

1. Abrir la imagen en Image J
 2. Fijar la escala: Analyze- set scale.
 3. En el caso de ser necesario suprimir el background. Process- Subtract background
 4. Luego se cambia el formato de la imagen a 8 bits. IMAGE/ Type 8 bit/
 5. Image –ajust- threshold *Elegir el tono los umbrales que se desea, para el total de lo que se considera inmureactividad positiva, y para lo que se considera intenso.
 6. Luego de ajustar el umbral *-apply
 7. Una vez concluido los pasos de ajustes de umbrales se debe binarizar la imagen para ello: Process –binary- make binary.
 8. De esta manera se obtiene la imagen procesada y se puede realizar las medidas que se deseen. Analyze- set measurement (setear lo que se desea)
 9. Analyze –Measure
 10. A su vez, se debe medir el área del SDN-MPOA sobre las microfotografías de machos y de hembras. Para ello, se abren las imágenes en ImageJ, se fija la escala y se mide el área del núcleo.
-

