

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

Estandarización de la Prueba de TUNEL para Identificar Muerte por Apoptosis
Durante el Periodo Crítico de la Diferenciación Sexual Hipotalámica de Ratas
Provenientes de Madres Hiperglucémicas.

PRESENTADOR DE SERVICIO SOCIAL:

Martín Núñez Cervantes
MATRÍCULA: 2192030427

ASESORES

INTERNO:

Dr. Ricardo Chávez García
NÚM. ECONÓMICO: 47085



EXTERNO:

Dra. Clara Ortega Camarillo
Cédula Profesional:
1815406



LUGAR DE REALIZACIÓN: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad
Xochimilco/Unidad de Investigación Médica en Bioquímica-Hospital de
Especialidades-CMNSXXI-IMSS

FECHA DE INICIO Y TÉRMINO: 18 de Diciembre 2023-18 Junio 2024

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

**Estandarización de la Prueba de TUNEL para Identificar Muerte por Apoptosis
Durante el Periodo Crítico de la Diferenciación Sexual Hipotalámica de Ratas
Provenientes de Madres Hiperglucémicas.**

PRESENTADOR DE SERVICIO SOCIAL:

**Martín Núñez Cervantes
MATRÍCULA: 2192030427**

ASESORES

INTERNO:

**Dr. Ricardo Chávez García
NÚM. ECONÓMICO: 47085**

EXTERNO:

**Dra. Clara Ortega Camarillo
Cédula Profesional:
1815406**

**LUGAR DE REALIZACIÓN: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad
Xochimilco/Unidad de Investigación Médica en Bioquímica-Hospital de
Especialidades-CMNSXXI-IMSS
FECHA DE INICIO Y TÉRMINO: 18 de Diciembre 2023-18 Junio 2024**

Introducción

Los procesos de proliferación y muerte celular están implicados en diversos mecanismos de diferenciación celular; por ejemplo, durante la diferenciación sexual del hipotálamo; existe una etapa que se define como periodo crítico en el que se promueven las diferencias cerebrales entre el fenotipo masculino y femenino, dando como resultado profundas diferencias sexuales en cuanto al número de neuronas, complejidad de la glía, expresión neuroquímica y conectividad sináptica (Arnold & Gorski, 1984; Simerly, 2002). Desde hace tiempo se conoce con certeza que el proceso de diferenciación sexual a nivel hipotálamo en la rata ocurre durante el último tercio de la vida fetal y continúa a través de la primer semana posterior al nacimiento (Jacobson *et al.*, 1985; Vom Saal *et al.*, 1992). En este periodo, los núcleos dimórficos son más susceptibles a la acción de los esteroides. La secreción de testosterona a partir de los testículos fetales es necesaria para completar el proceso de masculinización. Por otra parte, el estradiol solo actúa como un mediador de la diferenciación pero no interviene para que se expresen todas las características masculinas (McEwen, 1977; Baum *et al.*, 1990). De tal manera, el uso de drogas como el tamoxifeno cuyo uso como anticonceptivo y en la terapia contra el cáncer de mama, se ha extendido ya que actúa como un antagonista de los receptores estrogénicos (Osborne, 1998). Se ha reportado que a nivel cerebral, el tamoxifeno ejerce una acción neuroprotectora en mamíferos masculinos (Kimmelberget *et al.*, 2000), que se ha presentado en periodos posteriores a un daño cerebral como lo es en modelos animales experimentales de la enfermedad de Parkinson donde protege el cuerpo estriado contra la toxicidad inducida por algunas metanfetaminas y evita el agotamiento de la dopamina estriada en animales tanto en machos como en hembras (D'Astous *et al.*, 2005; Dluzen *et al.*, 2005), lo que demuestra un efecto directo en el cerebro; sin embargo, el mecanismo de neuroprotección que ofrece el tamoxifeno aún no es claro. Los estudios realizados por Kimmelberg *et al.* (2000), han demostrado que el tamoxifeno puede inhibir la excitación de la liberación de aminoácidos y la síntesis del óxido nítrico, después de que el cerebro presenta isquemia cerebral en roedores del sexo masculino lo cual parece ser importante para el efecto neuroprotector. Algunos estudios realizados en condiciones in vitro e in vivo han sugerido que el tamoxifeno o su metabolito activo, el 4-OH-tamoxifeno posee actividad antioxidante (Kuo *et al.*, 2003; Obata, 2006). Otra hormona que modifica la diferenciación sexual hipotalámica es el propionato de

testosterona; en los trabajos realizados por Korenbrot *et al.* (1975), donde se administró propionato de testosterona a ratas hembras en edad perinatal, se observó que en la edad reproductiva los niveles de las hormonas foliculoestimulante y luteinizante decaían de manera gradual en comparación a las ratas control; además, las ratas tratadas no manifestaban conducta de lordosis para el apareamiento y sus ovarios no contenían folículos ováricos irrigados ni cuerpos lúteos.

Por otra parte, se ha reportado que durante la gestación se llega a presentar una resistencia a la insulina (RI) y la hiperinsulinemia que puede predisponer a algunas mujeres a desarrollar diabetes. Durante una gestación normal se desarrolla una RI progresiva a partir de la mitad de la gestación y progresa durante el tercer trimestre. Las hormonas y las adipocinas secretadas por la placenta incluido el factor de necrosis tumoral TNF- α , el lactógeno placentario y la hormona de crecimiento, son las posibles causas de la RI durante el embarazo; además, el aumento de estrógenos, progesterona y cortisol durante la gestación, contribuye a una alteración en el equilibrio entre glucosa–insulina. Para compensar la RI periférica durante el embarazo, aumenta la secreción de insulina en el páncreas de la madre. El desarrollo de diabetes mellitus gestacional (DMG), ocurre cuando el páncreas de una mujer no secreta suficiente insulina para soportar el estrés metabólico de RI (Alfadhli, 2015).

Planteamiento del Problema

La diabetes gestacional se asocia con mayores riesgos adversos del embarazo tanto en la madre como para su progenie incluyendo preeclampsia, hipertensión inducida por el embarazo y cesáreas (Landon *et al.*, 2009). La hiperglucemia materna aumenta los niveles de glucosa fetal y causa hiperinsulinemia que conduce a la mayoría de los problemas fetales denominados colectivamente, fetopatía diabética. La exposición intrauterina a la hiperglucemia también se ha reportado como un factor de riesgo a largo plazo para la obesidad infantil (Dabelea, 2007). Los estudios han demostrado que las mujeres son más resistentes a la insulina que los hombres en la vida intrauterina (Shields *et al.*, 2009) y son más propensos a desarrollar diabetes a edades tempranas (Wei *et al.*, 2003; Grinstein *et al.*, 2003).

Los dimorfismos sexuales de la leptina en el cordón umbilical y las concentraciones de adiponectina, han sido reportados como una posible atribución por el efecto de la grasa corporal (Basu *et al.*, 2009). Se desconoce si la DMG puede afectar algún dimorfismo sexual en el feto mediante los niveles sanguíneos del cordón umbilical de leptina, adiponectina u algunas otras proteínas que participen en la diferenciación sexual.

Marco teórico

Diferenciación sexual

El término de dimorfismo sexual ha sido usado para describir las diferencias en cuanto a funcionalidad de procesos biológicos entre sexos. Actualmente, este término ha sido ampliado hasta la inclusión de las alteraciones genéticas que pueden ocurrir en este fenómeno y que traen consigo como resultado en las diferencias en cuanto al fenotipo entre machos y hembras (Morelli & Cohen, 2005). La diferenciación sexual ocurre en tres etapas dentro del desarrollo del individuo las cuales son al momento de la fertilización, durante el desarrollo gonadal y durante la diferenciación cerebral. Es importante señalar que cada una de estas etapas se ve influenciada por las demás ya que de estas dependen las congruencias del sexo en cuanto al fenotipo, genotipo y comportamiento característico de cada individuo correspondiente al sexo (Wilson & Davies, 2007). Dicho esto, las diferencias sexuales se dan en la morfología y funcionalidad del fenotipo que es la base de la identidad de género, orientación sexual, comportamiento sexual y funciones cognitivas características de cada individuo.

Diferenciación Sexual Cerebral

La diferenciación del sistema nervioso central (SNC), se refiere principalmente a diferencias que involucran el número de neuronas, morfología e interconexiones que han sido asociadas con cambios en la fisiología cerebral relacionados con el tamaño del núcleo o circuito cerebral que se denomina área o núcleo del sistema nervioso central, o a un grupo de neuronas interconectadas entre sí con características de tamaño y función similar (Herrera *et al.*, 2005). Las diferencias sexuales en el SNC son el resultado de la secreción de hormonas por parte de las gónadas durante periodos críticos del desarrollo que ocurren en la etapa prenatal y perinatal. Muchas especies muestran diferencias sexuales en estructuras del SNC que participan en el

control de las funciones endocrinas y conductuales, los cuales son parte de los procesos reproductivos y que incluyen patrones esenciales durante el apareamiento (Herrera *et al.*, 2005).

El hipotálamo se conoce como el centro ejecutivo de funciones homeostáticas del cuerpo; además, representa una interfase anatómica y funcional entre el sistema nervioso y el sistema endocrino mediante las cuales se lleva a cabo la regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal, conducta agresiva, marcaje de territorio, postura de micción, conducta social de juego, aprendizaje y ejecución, lateralización de las funciones cerebrales (principalmente en el humano), comportamiento durante la cópula, actividad espontánea y la reacción a varios estímulos sensoriales.

La estructura del hipotálamo es compleja tanto en términos neuroanatómicos como neuroquímicos. Se puede subdividir en cuatro regiones y en más de 25 núcleos dimórficos de acuerdo con criterios anatómicos y funcionales; de esta manera, existe un creciente interés que intenta entender más a fondo cómo la estructura y función difiere entre el macho y la hembra. Entre los núcleos dimórficos más estudiados se encuentran el área preóptica (APO), el núcleo ventromedial (NVM), el núcleo supraquiasmático (NSQ), los cuales son subdivisiones del hipotálamo. La amígdala y la estría terminal (ST), son áreas dimórficas que se encuentran en íntima relación con el hipotálamo (Herrera *et al.*, 2005).

Periodo Crítico de la diferenciación sexual hipotalámica

Durante la diferenciación sexual del hipotálamo, existe una etapa que se define como periodo crítico en el que se ejerce el potencial para promover las diferencias cerebrales entre el fenotipo masculino y femenino, dando como resultado profundas diferencias sexuales en cuanto al número de neuronas, complejidad de la glía, expresión neuroquímica y conectividad sináptica (Arnold & Gorski, 1984; Simerly, 2002).

Desde hace tiempo se conoce con certeza que el proceso de diferenciación sexual a nivel hipotálamo en la rata ocurre durante el último tercio de la vida fetal y continúa a través de la primera semana después del nacimiento (Jacobson *et al.*, 1985; vom Saal *et al.*, 1992). En este periodo los núcleos dimórficos son más susceptibles a la acción de los esteroides. La secreción de testosterona a partir de los testículos

fetales es necesaria para completar el proceso de masculinización. Por otra parte, se sabe que el estradiol solo actúa como un mediador de la diferenciación pero aún no se entiende en qué forma participa o no, para que se expresen todas las características masculinas (Baum *et al.*, 1990; McEwen *et al.*, 1977).

Acorde a esto, numerosos estudios en roedores y otros modelos animales han documentado que la testosterona secretada por los testículos durante el desarrollo se convierte a estradiol in situ por la enzima aromatasa que se encuentra en regiones específicas del cerebro durante los periodos críticos del desarrollo perinatal, donde desempeña un papel importante para la diferenciación cerebral.

Se sabe que las hormonas esteroides de origen gonadal son las mediadoras en la dinámica de este proceso de dimorfismo. En roedores, el desarrollo testicular inicia el día 14 de gestación en donde la secreción gonadal de andrógenos y el pico de testosterona es hasta el día 18 (Weisz & Ward, 1980). Se puede observar un segundo pico al momento del nacimiento (Speert *et al.*, 2007).

Acción de los estrógenos en el SNC durante la diferenciación sexual

La diferenciación sexual del cerebro de la rata, particularmente en algunas regiones intra y extra-hipotalámicas es de gran importancia en el desarrollo del patrón fisiológico, indispensable para que el animal adulto presente la secreción endocrina y el patrón de comportamiento característicos de cada sexo. La diferenciación sexual en la rata ocurre durante el periodo conocido como “periodo crítico”, que se extiende de algunas horas o días antes del nacimiento hasta algunas horas o días después del nacimiento. Durante este proceso, los estrógenos desempeñan un papel muy importante (Babichev *et al.*, 1990).

Recientemente se ha encontrado a nivel genómico que la actividad del estradiol se ejerce originando diferencias sexuales en los niveles de expresión de algunos genes en ciertas áreas hipotalámicas (Simerly, 2002; Tobet, 2002) que pueden alterar el desarrollo crecimiento o interacción sináptica entre diversos núcleos hipotalámicos. Se ha propuesto que el establecimiento de las conexiones neuronales de áreas dimórficas debe continuar después de la terminación del periodo crítico para completar la organización funcional definitiva de las áreas dimórficas. Esto es compatible con el hecho de que los esteroides actúan únicamente durante el periodo crítico promoviendo el desarrollo de un mayor número de neuronas ya que este

aumento en la cantidad de células es necesario para el establecimiento de las conexiones neuronales que se utilizarán posteriormente para el adecuado funcionamiento neuronal.

Debido a que las neuronas son limitadas en la proliferación y estas son considerables para la muerte celular programada después del nacimiento, el efecto de los esteroides parece estar involucrado en la regulación de la cinética de las células neurales y la apoptosis. El dimorfismo sexual solo está presente en otros compartimentos celulares como la glía y el desarrollo de las diferencias relacionadas con las hormonas sexuales observadas tanto en humanos y animales (Cooke, 1998).

Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso biológico irreversible que involucra genéticamente la eliminación de determinadas células que tienen una función esencial en los numerosos eventos fisiológicos siguientes: la homeostasis, respuesta inmune, atresia folicular del ovario, placentación, implantación embrionaria, condiciones patológicas, entre otros eventos (Elmore, 2007; Wang & Tsang, 2007; Wei & Yu, 2008).

Existe una extensa variedad de estímulos y condiciones fisiológicas así como patológicas que pueden desencadenar la apoptosis; por ejemplo, la radiación o el uso de quimioterapia dan como resultado un daño al DNA en algunas células las cuales pueden conducir a la muerte por apoptosis por la vía dependiente de la proteína p53 (Elmore, 2007). Esto ocurre debido a que existe un balance muy delicado entre los mecanismos pro y anti apoptóticos que determinan las señales de muerte celular o de sobrevivencia celular (Wei & Yu, 2008).

La apoptosis es muy importante durante varios procesos del desarrollo; por ejemplo, en el sistema nervioso y sistema inmune se incrementa la sobreproducción de células. Esta sobreproducción inicial es seguida por la muerte de las células que fallan para el establecimiento de la función de las conexiones sinápticas o la producción de antígenos específicos respectivamente (Nijhawan *et al.*, 2000; Opferman & Korsmeyer, 2003).

La apoptosis es central para la remodelación en el adulto en fenómenos como la atresia folicular de folículos post-ovulatorios o en la involución de la glándula mamaria después del destete. Durante el crecimiento de organismos adultos, algunas células comienzan a deteriorarse a una tasa muy rápida y son eliminadas mediante la vía apoptótica. Una teoría es que el estrés oxidativo que tiene un papel primario en la fisiopatología de procesos degenerativos, con la edad induce apoptosis mediante la acumulación de radicales libres que dañan al DNA mitocondrial (Harman, 1992).

Vías de señalización de la apoptosis

El mecanismo de la apoptosis es altamente complejo y sofisticado que involucra una cascada de energía dependiente de diversos eventos moleculares, enzimas, receptores y regulación de genes (Fan *et al.*, 2005; Wei & Yu, 2008). El proceso apoptótico ocurre mediante dos vías principales:

La primer vía es la extrínseca. Esta vía involucra a los receptores de superficie celular que transmiten las señales de muerte y se activan por ligandos de muerte específicos. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y el receptor del factor de necrosis neural (TNFRI/NGFR) respectivamente, que contienen un dominio extracelular rico en cisteínas y una secuencia homóloga citoplásmica llamada dominio de muerte. Los receptores de muerte mejor caracterizados son FasL/ FasR/ TNF- α / TNTR1/ DR3/ Apo1L/ DR4 y Apo2L/DR5. (Elmore, 2007; Dewson & Klunt, 2009). La unión del ligando Fas-L al receptor Fas-R da como resultado la unión de la proteína adaptadora FADD y la unión de TNF a su ligando da como resultado la unión de la proteína adaptadora TRADD junto con el reclutamiento de las proteínas FADD y RIP (Hsu *et al.*, 1995; Wajant, 2002). De este modo, FADD se asocia con la pro-caspasa 8 mediante la dimerización del dominio de muerte. En este punto, un inductor de la muerte es un complejo de señalización celular denominado DISC el cual se forma como resultado de la activación autocatalítica proveniente de la procaspasa-8 (Kischkel *et al.*, 1995).

La segunda vía es la intrínseca. Esta vía involucra una amplia gama de receptores proteicos y mediadores organizados mediante estímulos que producen las señales intracelulares que actúan directamente sobre la mitocondria. Esta vía se activa por estrés celular y está regulada principalmente a nivel mitocondrial por las proteínas

de la familia Bcl-2. La vía intrínseca de la apoptosis inicia en respuesta a una variedad de señales de estrés que modifican el complejo de proteínas Bcl-2. Estas señales en la membrana mitocondrial inician la activación de Bak y Bax de tal manera que en ciertos tipos de células, la vía extrínseca sólo induce daño mitocondrial provocando una ruptura de las proteínas pro apoptóticas Bcl-2 (Dewson & Klunt, 2009).

El estímulo intrínseco inicia con la producción de señales intracelulares que pueden actuar de manera positiva o negativa. Las señales negativas involucran la ausencia de ciertos factores de crecimiento, las hormonas y las citoquinas que pueden conducir hacia la activación de los programas de muerte para así disparar apoptosis mientras que los estímulos o señales positivas incluyen radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres (Elmore, 2007). Todos estos estímulos causan cambios en el interior de la membrana mitocondrial que resulta en la apertura transitoria de la permeabilidad mitocondriales (MPT), perdiendo el potencial transmembranal de la mitocondria y permitiendo la liberación de dos grupos principales de proteínas pro apoptóticas (citocromo c, Smac /diablo, proteasas séricas, y HtrA2/ Omi, AIF, endonucleasa G y CAD) desde los espacios intermembranales, introduciendolos hacia el citosol donde participan en la activación de caspasas o bien, en la fragmentación oligonucleosomal del DNA nuclear (Du *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2006; Saelens *et al.*, 2004).

Las vías de la apoptosis intrínseca y extrínseca culminan en un punto llamado fase de ejecución o vía final de la apoptosis. Esta vía de ejecución activa las caspasas de ejecución que comienzan con esta fase. Estas caspasas activan la endonucleasa citoplasmática que degrada el material nuclear y las proteasas que degradan al núcleo y las proteínas citoesqueléticas. Las caspasas 3, 5 y 7 funcionan como efectores o ejecutoras utilizando varios sustratos incluyendo la citoqueratina, PARP, las proteínas alfa fodrin del citoesqueleto de la membrana plasmática, la proteína nuclear NUMA y otros, que últimamente causan cambios morfológicos y bioquímicos observados en las células apoptóticas (Slee *et al.*, 2001). La caspasa 3 es considerada como un importante ejecutor de caspasas y es activada por algún iniciador de caspasas (8, 9 o 10); además, la caspasa 3 específicamente activa a la endonucleasa CAD. En la proliferación de las células, CAD son denominadas como un complejo inhibidor del ICAD. La caspasa 3 solo induce la reorganización del

citoesqueleto y desintegración de los cuerpos apoptóticos dentro de la célula.

Objetivo General

Estandarizar la técnica de TUNEL para determinar apoptosis durante el periodo crítico de la diferenciación sexual hipotalámica de ratas provenientes de madres hiperglucémicas.

Objetivos Particulares

- Obtener crías de ratas con diabetes mellitus gestacional a edades de 1, 3 y 6 horas de vida.
- Ver el efecto de la administración de la hormona sintética propionato de testosterona en el tejido hipotalámico de las crías obtenidas en los distintos tiempos de medición.
- Identificar las regiones hipotalámicas en donde se presenta el daño inducido por los tratamientos hormonales.
- Evaluar la expresión de las proteínas FAS y Citocromo C que participan en los procesos de muerte celular programada.

Material y Métodos

El material biológico de estudio se obtendrá del Bioterio del Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI. Se utilizarán 10 ratas hembras y 3 machos de la cepa Sprague Daley de edad reproductiva así como a las respectivas crías que se alojarán bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo de 12:12 a una temperatura ambiente de 21° C con una sanitización programada (2 días por semana) y se dará agua y alimento Lab Diet 5010 “*ad libitum*”.

Manejo y selección de las madres. A las ratas hembras adultas se les evaluará la capacidad reproductiva mediante el análisis del ciclo estral haciendo citología vaginal diaria durante al menos tres ciclos reproductivos. Las ratas que presenten su ciclo estral con características normales se colocarán con un macho durante 3 horas con el fin de permitir el apareamiento. Una vez terminado este tiempo se verifica la presencia de espermatozoides así como la aparición del tapón vaginal mediante citología vaginal. A partir de este momento, se inicia la cuenta de la gestación con una duración aproximada de 502 ± 3 horas. Las ratas gestantes se les inducirá la hiperglucemia mediante la administración de estreptozotocina (STZ) (50mg/kg)

disuelta en tampón de citrato 0.1 M estéril (pH 4.5) vía intraperitoneal al día 5 de gestación.

Manejo y tratamiento de las crías. Con el propósito de estudiar a las crías a tiempos muy cercanos al nacimiento se llevará un control y vigilancia constante de las madres. La hora del parto se registrará como hora cero del nacimiento de cada una de las crías, se realizará el sexado de toda la camada y se administrará el tratamiento vía subcutánea en la zona dorsal y se cubrirá el sitio de inyección con vaselina. Para este estudio será a partir de crías hembras hiperglucémicas a las cuales se les aplicará el siguiente tratamiento: a una proporción de la progenie se les administrará 30 µg de propionato de testosterona en 20 µl de aceite de sésamo (HP) y el resto de las hembras se les aplicará 20 µl de solución salina que se usará como Hembras Control (HC).

Eutanasia de los animales y obtención de muestras (Consideraciones bioéticas). Las muestras de hipotálamo se obtendrán a las 1, 3 y 6 horas de edad. La eutanasia de los animales se realizará mediante la dislocación cervical de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Extracción de Hipotálamo. La extracción de los hipotálamos se realizará mediante una incisión en la piel del cráneo a nivel de la fosa del foramen magnum. Después con unas pinzas hemostáticas se fracturará el cráneo desde la región occipital hacia la región frontal. El cerebro será disecado y se colocará sobre su superficie dorsal. Finalmente se aislará a 4° C.

TUNEL. Para realizar la prueba de TUNEL se considerarán las recomendaciones del *KIT ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S700*. Los tejidos se les someterá al desparafinado y rehidratación. Así mismo, se les someterá a la recuperación de antígeno como en la inmunohistoquímica. Al término de esto, se lavarán los tejidos cerebrales con PBS Tritón. Posteriormente, se incubarán los tejidos con proteinasa K durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de dos lavados con PBS Tritón. Se adicionarán 75 µl de buffer de equilibrio durante 10 segundos por cada tejido. Se utilizarán 35 µl de enzima TdT mezclándola con 75 µl de buffer de reacción para incubar los tejidos a 37° C en una cámara de incubación

durante 1 hora. Al término de esto, se realizará un lavado con PBS Tritón y se aplicará la anti-dioxigenina en una proporción de 1:10 en PBS Tritón dejándolo incubar toda la noche. Una vez finalizada la incubación, se lavará con PBS Tritón y se aplicará DRAQ 7 como marcador de núcleo durante 20 minutos; se realizará un último lavado y se sellará con PBS/glicerol. Las muestras serán analizadas de la misma manera que las inmunofluorescencias.

Resultados

Prueba de TUNEL en Tejido Hipotalámico

En la figura 1 se presentan las muestras de tejido hipotalámico de hembras tratadas con propionato de testosterona analizadas a las 1, 3 y 6 horas postnatales mediante la prueba de TUNEL. En todos los tiempos evaluados no se observó señal positiva para apoptosis. Los núcleos celulares se visualizaron claramente teñidos en azul con DRAQ7 evidenciando integridad nuclear. El análisis de co-localización mostró únicamente señal nuclear sin presencia de fluorescencia verde indicativa de fragmentación del ADN. Las imágenes obtenidas en campo claro no presentaron señal de fluorescencia inespecífica.

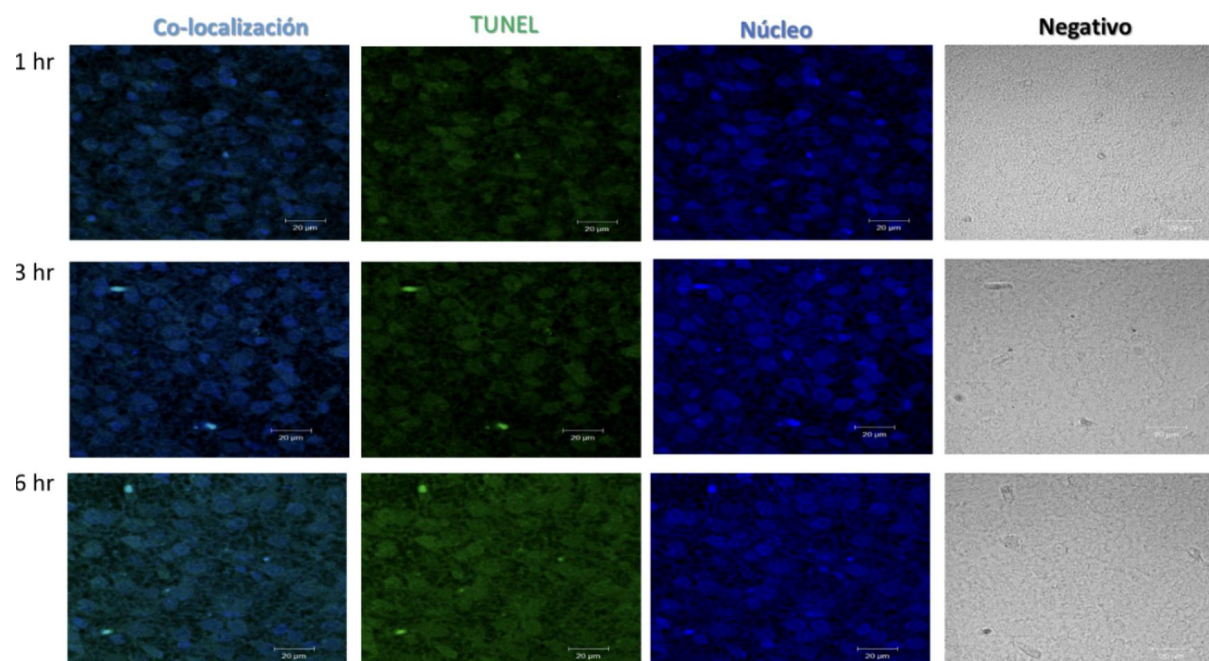


Figura 1. Hembras Tratadas con Propionato de Testosterona. TUNEL Control Negativo.

En la figura 2 se presenta el análisis de las laminillas de tejido hipotalámico provenientes de hembras tratadas con solución salina evaluadas a las 1, 3 y 6 horas postnatales mostrando una señal negativa para apoptosis en la prueba de TUNEL. Los núcleos celulares se observaron claramente definidos y teñidos en azul con DRAQ7 sin evidencia de fragmentación del ADN. El análisis de co-localización reveló únicamente señal nuclear confirmando la ausencia de apoptosis detectable. El fondo observado en campo claro no presentó fluorescencia.

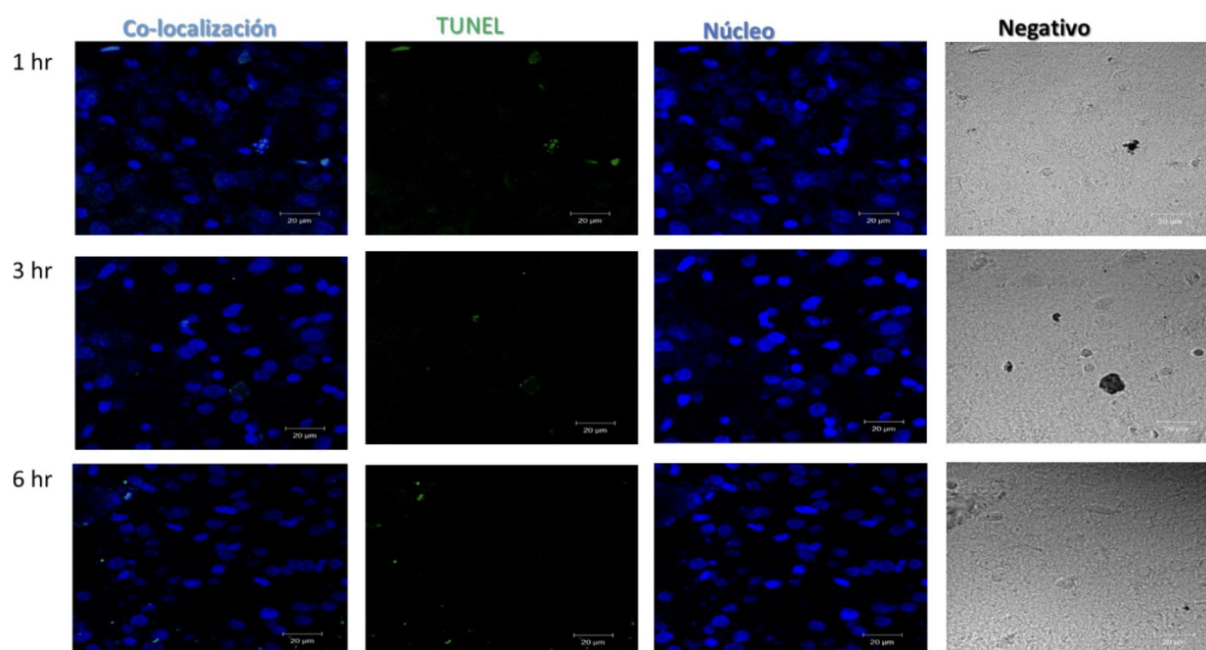


Figura 2. Hembras Tratadas con Solución Salina. TUNEL Control Negativo.

En la figura 3 se muestran las laminillas de tejido hipotalámico correspondientes al control positivo analizadas a las 1, 3 y 6 horas mediante microscopía confocal donde se observó una señal positiva para apoptosis en la prueba de TUNEL implementando tratamiento con DNasa. A la 1 hora postnatal se detectó una señal tenue de fluorescencia verde mientras que los núcleos celulares permanecieron visibles en azul con DRAQ7. A las 3 y 6 horas se evidenció un incremento progresivo de la señal de TUNEL acompañado de una disminución relativa de la tinción azul nuclear conforme aumentó el tiempo de análisis. La co-localización confirmó que la fragmentación del ADN ocurrió en células nucleadas. Las imágenes de campo claro no mostraron señal de fluorescencia.

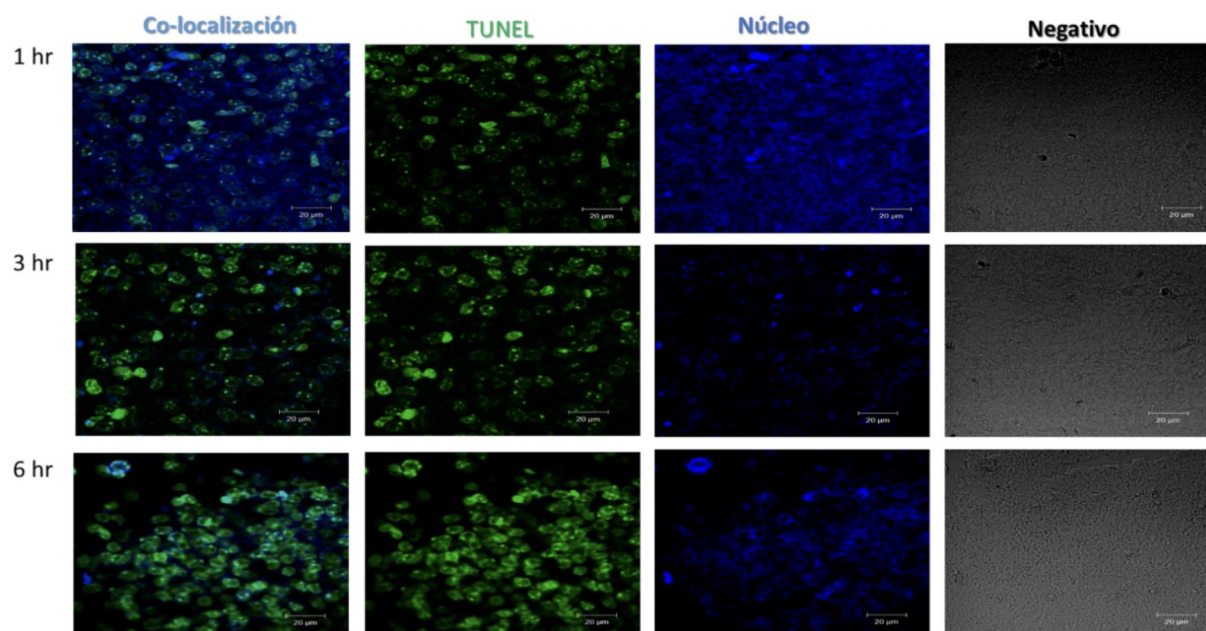


Figura 3. Hembras Tratadas con Propionato de Testosterona. TUNEL Control Positivo (tratamiento con DNasa).

En la figura 4 se muestran los niveles de intensidad de TÚNEL en donde se observa que estadísticamente las desviaciones estándar no arrojan diferencias significativas, sin embargo, numéricamente sí en donde las hembras control de 1 hora son más altos que las hembras con propionato de testosterona (HPT 212 ± 10.18 , HCTRL 217.6 ± 29.35); a las 3 horas, las hembras con propionato de testosterona son más altos que las hembras control (HPT 225.93 ± 12.64 , HCTRL 214.4 ± 26.28) y a las 6 horas, tanto las hembras con propionato de testosterona como las control son iguales (HPT 216.73 ± 6.05 , HCTRL 216.93 ± 9.5).

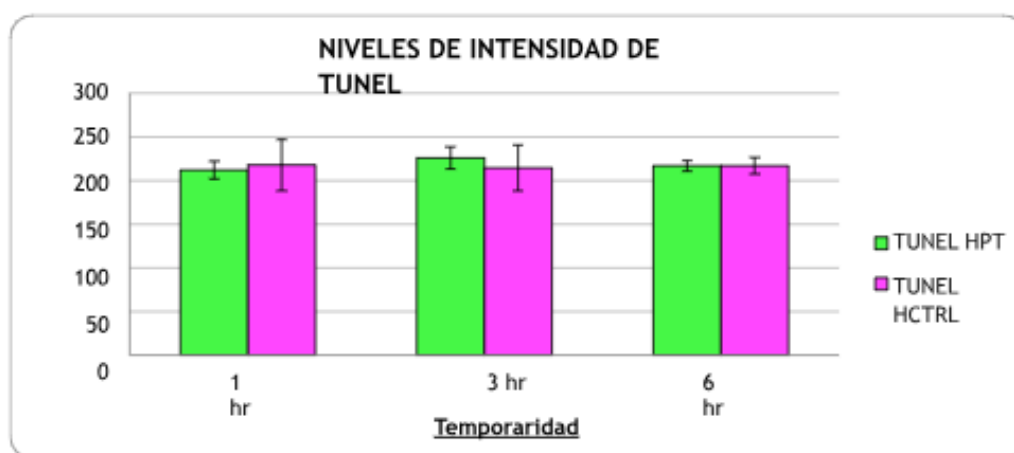


Figura 4. Niveles de intensidad de TUNEL en Hembras Tratadas (HPT); y en hembras control (HCTRL) sin diferencias significativas.

Expresión de Marcadores Apoptóticos FAS y Citocromo C en Tejido Hipotalámico.

El análisis mediante microscopía confocal de las laminillas de tejido hipotalámico a las 1, 3 y 6 horas postnatales mostró una expresión positiva del receptor FAS asociada principalmente a las membranas celulares. Los núcleos celulares se observaron teñidos en azul con DRAQ7. A la 1 hora se detectó una señal débil de FAS sobre las membranas de las células mientras que a las 3 horas la fluorescencia aumentó de manera evidente. A las 6 horas se observó una señal intensa y ampliamente distribuida sugiriendo una activación progresiva de la vía apoptótica extrínseca. El fondo observado en campo claro no presentó fluorescencia.

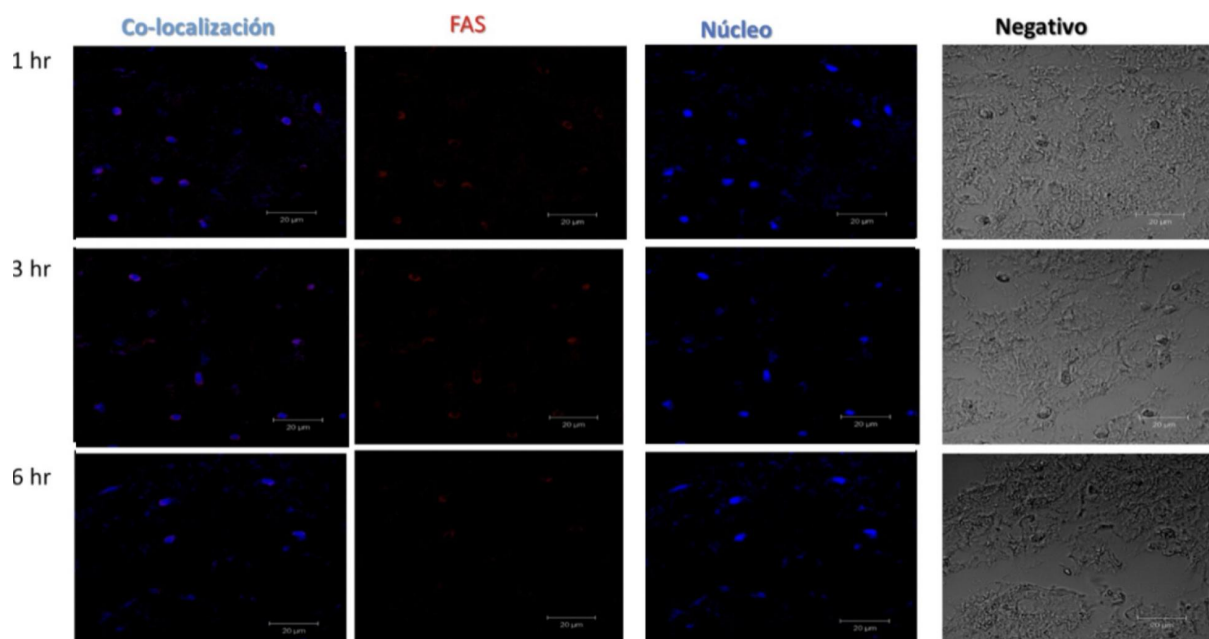


Figura 5. Expresión de FAS en Hembras Tratadas con Propionato de Testosterona.

El análisis del citocromo C en tejido hipotalámico reveló una señal positiva en las muestras analizadas a las 1, 3 y 6 horas postnatales. A la 1 hora la fluorescencia se localizó predominantemente a nivel citoplasmático con una distribución puntual compatible con una localización mitocondrial. A las 3 horas se observó una dispersión más amplia de la señal y a las 6 horas una fluorescencia intensa y difusa en el citoplasma, lo que sugiere la liberación de citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol. El fondo claro no mostró señal de fluorescencia.

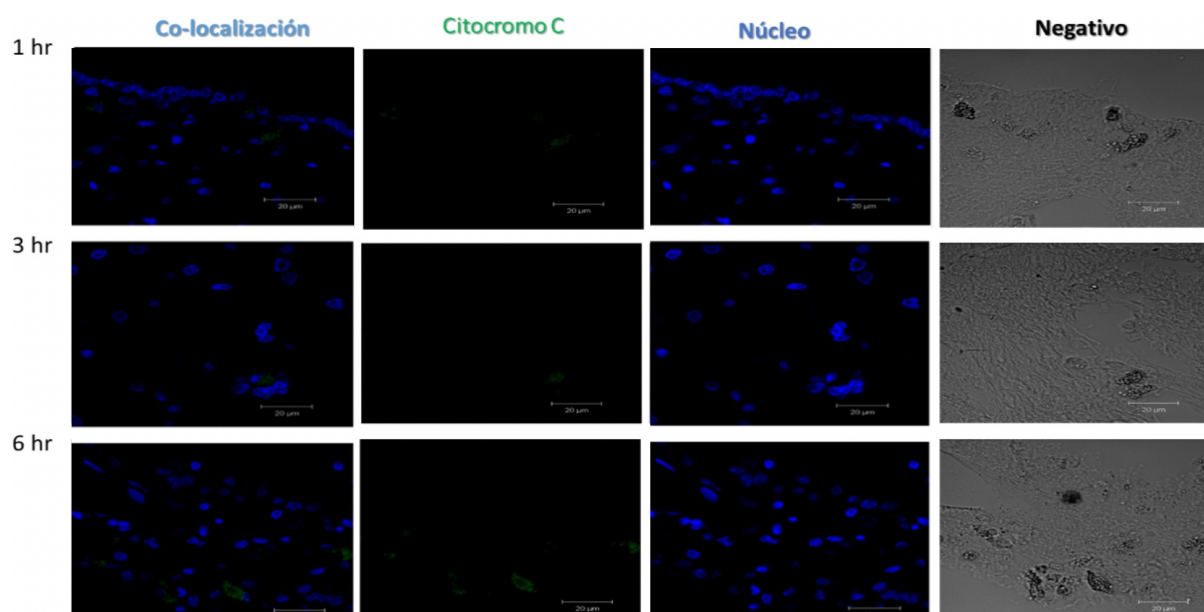
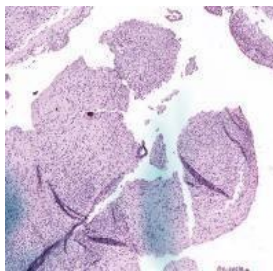


Figura 6. Expresión de Citocromo C en Hembras Tratadas con Propionato de Testosterona.

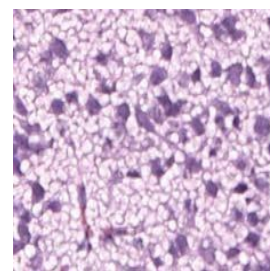
Cortes histológicos de tejido hipotalámico

A la inspección histológica, las regiones analizadas corresponden al hipotálamo rostral. El tejido muestra conservación aceptable aunque pérdida de continuidad. El área correspondiente al núcleo sexualmente dimórfico de la región preóptica medial se aprecia más desarrollada en los individuos tratados (HPT) que en los individuos control (HCTRL). En las secciones hipotalámicas de los individuos tratados (HPT) las neuronas presentan mayor tamaño relativo, citoplasma más eosinófilo y núcleos más grandes. La densidad neuronal es aparentemente alta y el límite del núcleo con el parénquima circundante es más definido.

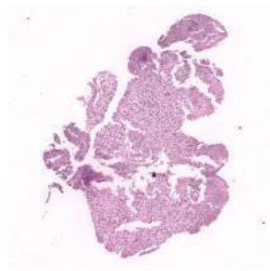
2x
Hembras Control
(HCTRL)



40x
Hembras Control
(HCTRL)



2x
Hembras
Tratadas (HPT)



40x
Hembras
Tratadas (HPT)

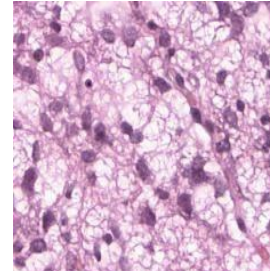


Figura 7. Comparativas de cortes histológicos de hembras tratadas con propionato de testosterona (HPT) y hembras control (HCTRL) a 2 aumentos: 2x y 40x.

Discusión

La apoptosis es un proceso fundamental durante el desarrollo del sistema nervioso central, ya que permite la eliminación de neuronas excedentes y la correcta organización de los circuitos neuronales. En el presente estudio, se evaluó la apoptosis en tejido hipotalámico neonatal mediante la prueba de TUNEL, detección de DNasa y la expresión de los marcadores apoptóticos FAS y citocromo C en hembras tratadas con propionato de testosterona y en hembras control tratadas con solución salina.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de TUNEL en los controles negativos mostraron ausencia de señal apoptótica tanto en hembras tratadas con propionato de testosterona como en las tratadas con solución salina, lo que confirma la integridad del ADN y la especificidad del método empleado. En contraste, los controles positivos tratados con DNasa mostraron una señal clara y progresiva de fragmentación del ADN, validando la sensibilidad de la técnica y permitiendo una interpretación confiable de los resultados experimentales. La prueba de TUNEL es ampliamente reconocida como una herramienta robusta para la detección de apoptosis en tejido nervioso en desarrollo (Gavrieli *et al.*, 1992).

Los controles tratados con solución salina arrojan información que la leptina en el cordón umbilical y las concentraciones de adiponectina no favorecen la apoptosis por lo que la DMG no influye en la diferenciación hipotalámica.

La expresión del receptor FAS observada en el tejido hipotalámico de hembras tratadas con propionato de testosterona mostró un aumento dependiente del tiempo postnatal. FAS (CD95) es un receptor de muerte perteneciente a la familia del TNF, cuya activación desencadena la vía apoptótica extrínseca mediante la activación de caspasas iniciadoras como la caspasa-8 (Ashkenazi & Dixit, 1998). El incremento progresivo de la señal de FAS sugiere que el tratamiento con propionato de testosterona podría favorecer la activación temprana de señales pro-apoptóticas en el hipotálamo neonatal, región clave para la diferenciación sexual del cerebro.

Diversos estudios han demostrado que los esteroides sexuales, particularmente los andrógenos, pueden modular la supervivencia neuronal durante periodos críticos del

desarrollo, ya sea promoviendo la diferenciación o induciendo apoptosis en poblaciones neuronales específicas (Forger, 2009). En este contexto, la expresión aumentada de FAS observada en este estudio podría estar relacionada con mecanismos de remodelación neuronal inducidos por la exposición temprana a testosterona.

Por otro lado, la detección de citocromo C en el citoplasma de las células hipotalámicas, especialmente a las 3 y 6 horas postnatales, sugiere la activación de la vía apoptótica intrínseca. La liberación de citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol es un evento clave en la apoptosis mitocondrial, ya que permite la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9, conduciendo finalmente a la muerte celular programada (Liu *et al.*, 1996; Wang, 2001).

La co-ocurrencia de la expresión de FAS y la liberación de citocromo C indica una posible interacción entre las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis, fenómeno que ha sido ampliamente documentado en distintos modelos celulares y tisulares (Fulda & Debatin, 2006). Esta interacción podría amplificar la señal apoptótica en neuronas hipotalámicas expuestas al propionato de testosterona, contribuyendo a cambios estructurales y funcionales durante el desarrollo temprano.

En conjunto, los resultados sugieren que la exposición neonatal al propionato de testosterona, puede modular la apoptosis hipotalámica mediante la activación coordinada de vías apoptóticas dependientes de FAS y mitocondriales. Estos hallazgos concuerdan con reportes previos que indican que las hormonas sexuales influyen de manera crítica en la organización sexual del cerebro y en la supervivencia neuronal durante etapas tempranas del desarrollo (McCarthy & Arnold, 2011).

En los cortes histológicos se observa que los individuos tratados con propionato de testosterona presentan el área que corresponde al núcleo dimórfico sexual de la región preóptica medial, se encuentra más desarrollada que en los individuos control lo que sugiere que los andrógenos (y su conversión a estrógenos), evitan la apoptosis por lo que en machos donde hay niveles altos de testosterona, van a funcionar de forma antiapoptótica y esta área será más grande en machos que en hembras.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio permiten concluir que:

- a) La prueba de TUNEL fue un método eficaz y confiable para la detección de apoptosis en tejido hipotalámico neonatal como se evidenció por la ausencia de señal en los controles negativos y la marcada fragmentación del ADN en los controles positivos tratados con DNasa.
- b) En hembras tratadas con propionato de testosterona se observó una expresión progresiva del receptor FAS lo que sugiere la activación de la vía apoptótica extrínseca durante las primeras horas postnatales.
- c) La detección citoplasmática de citocromo C indica la participación de la vía apoptótica intrínseca asociada a la disrupción de la integridad mitocondrial.
- d) La presencia simultánea de FAS y citocromo C sugiere una posible interacción entre las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis en el tejido hipotalámico neonatal.
- e) En conjunto, los hallazgos indican que la exposición temprana al propionato de testosterona puede influir en los mecanismos de muerte celular programada en el hipotálamo, lo cual podría tener implicaciones en la diferenciación sexual del cerebro y en la organización neuroendocrina.

Finalmente, este estudio aporta evidencia experimental relevante sobre los mecanismos moleculares de la apoptosis en el desarrollo hipotalámico y establece bases para futuras investigaciones orientadas a evaluar las consecuencias funcionales de la modulación hormonal temprana sobre el sistema nervioso central y cómo la prueba de TÚNEL representa una excelente herramienta que al aumentar marcadores se potencia y se corrobora en distintas formas la muerte celular programada.

Bibliografía

- Alfadhli, E. M. 2015. Gestational diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*: 36: 399-406.
- Arnold, A. P. & Gorski, R. A. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*: 7: 413-442.
- Ashkenazi, A. y Dixit, V.M. (1998). *Death receptors: signaling and modulation*. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
- B., Wapner, R. J., Varner, M. W., Rouse, D. J., Thorp Jr, J. M., Sciscione, A.,
- Babichev, V., Shishkina, I. & Peryshkova, T. 1990. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomedical Science*: 1: 189-192.
- Basu, A., Dalla Man, C., Basu, R., Toffolo, G., Cobelli, C. & Rizza, R. A. 2009. Effects of type 2 diabetes on insulin secretion, insulin action, glucose effectiveness, and postprandial glucose metabolism. *Diabetes Care*: 32: 866-72.
- Baum, M. J., Carroll, R. S., Cherry, J. A. & Tobet, S. A. 1990. Steroidal control of behavioral, neuroendocrine and brain sexual differentiation. *Journal of Neuroendocrinology*: 2: 401-418.
- Catalano, P., Harper, M., Saade, G., Lain, K. Y., Sorokin, Y., Peaceman, A. M., Tolosa, J. E., Anderson, G. B.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. 2009. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *The New England Journal of Medicine*: 36: 1339-48.
- Cooke, B., Hegstrom, C. D., Villeneuve, L. S. & Breedlove, S. M. 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*: 19: 323-362.
- D'Astous, M., Mickley, K. R., Dluzen, D. E. & Di Paolo, T. 2005. Differential protective properties of estrogen and tamoxifen against methamphetamine induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in mice. *Neuroendocrinology*: 82: 111-120.

- Dabelea, D. 2007. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care*: 2: 169-74.
- de Vries, G. J. & Simerly, R. B. 2002. Sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: Pfaff D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E., Rubin, R. T., eds. *Hormones, brain and behavior*. New York: Elsevier: 137–156.
- Dewson, G. & Klunt, R. 2009. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Science*: 122: 2801-2808.
- Dluzen, E. & Mickley, K. R. 2005. Gender differences in modulatory effects of tamoxifen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *Pharmacol Biochemistry and Behavior*: 80: 27–33.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*: 102: 33–42.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35: 495–516.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. & Liang, J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*: 37: 719–727.
- Forger, N.G. (2009). *Control of cell number in the sexually dimorphic brain and spinal cord*. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(4), 393–399.
- Fulda, S. y Debatin, K.M. (2006). *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. *Oncogene*, 25, 4798–4811.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*: 13: 1423–1433.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S.A. (1992). *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. *Journal of Cell Biology*, 119(3), 493–501.
- Grinstein G., Muzumdar R., Aponte L., Vuguin P., Saenger P., DiMartino-Nardi
- Harman, D. 1992. Role of free radicals in aging and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 673: 126–141.

- Herrera, G. H., Vergara, O. M., Rosado García, A. & Rosales, T. A. 2005. Diferenciación sexual en el sistema nervioso central. *Veterinaria México*: 36: 339-360.
 - Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*: 81: 495–504.
- J. 2003. Presentation and 5-year follow-up of type 2 diabetes mellitus in African- American and Caribbean-Hispanic adolescents. *Hormone Research*: 60: 121– 126
- Jacobson, C., Davis, F. & Gorski, R. 1985. Formation of sexually dimorphic
 - Kimelberg, H., Feurstel, P., Jin, Y., Paquette, J., Boulos, A., Keller, R. W. & Tramter, B. I. 2000. Acute treatment with tamoxifen reduces ischemic damage following middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport*: 11: 2675–2679.
 - Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M. & Krammer,
 - Korenbrot, C. C., Paup, D. C. & Gorski, R. A. 1975. Effects of Testosterone Propionate or Dihydrotestosterone Propionate on Plasma FSH and LH Levels in Neonatal Rats and on Sexual Differentiation of the Brain. *Endocrinology*: 97: 709–716.
 - Kuo, Y. M., Chen, H. H., Shieh, C. C., Chuang Cherng, C. G. & Yu, L. 2003. 4 Hydroxytamoxifen attenuates methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in intact and gonadectomized mice. *Journal of Neurochemistry*: 87: 436–443.
 - Landon, M. B., Spong, C. Y., Thom, E., Carpenter, M. W., Ramin, S. M., Casey,
 - Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. y Wang, X. (1996). *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. *Cell*, 86(1), 147–157.
 - McCarthy, M.M. y Arnold, A.P. (2011). *Reframing sexual differentiation of the brain*. *Nature Neuroscience*, 14(6), 677–683.
 - McEwen, B. S. & Alves, S. E. 1999. Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocrine Reviews* 20: 279–307.

- McEwen, B. S., Lieberburg, I., Chaptal, C. & Krey, L. 1977. Aromatization: important for sexual differentiation of neonatal rat brain. *Hormones and Behavior*: 9: 249-263.
- Morelli, M. A. & Cohen, P. E. 2005. Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reprod*: 130: 761–781.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., & Wang, X. 2000. Apoptosis in neural development and disease. *Annual Review of Neuroscience*: 23: 73–87.

nucleus of the preoptic area: neuronal growth, migration, and changes in cell number. Developmental Brain Research: 21: 7-18.

- Obata, T. 2006. Tamoxifen protect against hydroxyl radical generation induced by phenelzine in rat striatum. *Toxicology*: 222: 46 –52.
- Opferman, J.T., and Korsmeyer, S.J. 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology*: 4: 410–415.
- Osborne, C.K. 1998. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*: 339: 1609–18.

P. P. H. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The Embo Journal*: 14: 5579–5588.

- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*: 23: 2861–2874.
- Shields, W., Thompson, K. E., Grice, G. A., Harrison, S. A. & Coyle, W. J. 2009. The effect of metformin and standard therapy versus standard therapy alone in nondiabetic patients with insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A pilot trial. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*: 2: 157-163.
- Simerly, R. 2002. Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annual Review of Neuroscience*: 25: 507-536.
- Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -
- Speert, D.B., Anne, T.M., Konkle, S.L., Zup, J.M., Schwarz, C.S. Taylor, M.E. and McCarthy, M.M. 2007. Focal Adhesion Kinase and Paxillin: Novel Regulators of Brain Sexual Differentiation. *Endocrinology*: 148: 3391–3401.

- Tobet S. 2002. Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation. *European Journal of Neuroscience*: 16: 373-376.
- vom Saal, F.S., Montano, M.M. and Wang, M.S. 1992. Sexual differentiation in mammals. Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife-Human Connection. Princeton, NJ: *Princeton Scientific Pub*: 17-83.
- Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*: 296: 1635–1636.
- Wang, H. and Tsang, B.K. 2007. Nodal signalling and apoptosis. *Reproduction*:
- Wang, X. (2001). *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. *Genes & Development*, 15(22), 2922–2933.
- Wei, Y., Fan, T., and Yu, M. 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis.
- Weisz, J. and Ward, I.L. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*: 106: 306–316.
- Wilson, C.A. and Davies, D.C. 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction*: 133: 331–359.