

Efecto de la elevación crónica de andrógenos sobre la programación perinatal del eje reproductivo masculino: evaluación de un modelo de ratones transgénicos hipersecretores de hCG

Effect of chronically elevated androgens on the perinatal programming of the male reproductive axis: evaluation of a transgenic mice model with hCG hypersecretion

Dras. Betina González, Laura D. Ratner, Susana B. Rulli

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET

Vuelta de Obligado 2490 (C1428ADN) Ciudad Autónoma de Buenos Aires

E-mail: rulli.susana@gmail.com

Resumen

En los mamíferos, la función reproductiva está finamente controlada por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG). Durante la vida perinatal ocurren mecanismos mediados por esteroides gonadales que ejercen una impronta sobre el funcionamiento de la unidad hipotálamo-hipofisaria, estableciéndose diferencias sexuales en los circuitos que controlan la reproducción en machos y hembras. En la etapa perinatal masculina, la producción testicular de testosterona aumenta drásticamente, y esta hormona ejerce un modelado a nivel central induciendo el desarrollo de estructuras neuronales masculinas y apagando las femeninas, programando de este modo el funcionamiento del eje HHG masculino. En el presente estudio, se analizó el funcionamiento de la unidad hipotálamo-hipofisaria en ratones machos transgénicos que sobreexpresan las subunidades α y β de la gonadotropina coriónica humana (hCG). Esta hormona se comporta como un superagonista de la hormona luteinizante (LH), uniéndose al mismo receptor. Los machos transgénicos presentan un hiperandrogenismo crónico debido a la constante estimulación de hCG sobre la producción de andrógenos testiculares. Con el fin de evaluar el rol de los andrógenos sobre el fenotipo transgénico, los machos fueron sometidos a un tratamiento antiandrogénico desde las etapas perinatal e infantil, analizando el efecto en la prepubertad y adultez. Nuestros resultados muestran una ventana crítica entre el día gestacional 18 y el día posnatal 14, donde los andrógenos crónicamente elevados inducen una activación prematura del hipotálamo y un silenciamiento concomitante de la producción de gonadotropinas hipofisarias. Estos estudios revelan nuevos roles de los andrógenos y/o sus metabolitos producidos localmente en la (des)regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria masculina.

Palabras clave: gonadotropina coriónica humana, ratones transgénicos, hipotálamo, hipófisis, andrógenos.

Abstract

In mammals the reproductive function is controlled by the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. During perinatal life, mechanisms mediated by gonadal steroids occur, which exert an imprinting on the hypothalamic-pituitary unit, establishing sexual differences in the circuits that control reproduction in males and females. During the perinatal stage in males, the testicular production of testosterone increases drastically, and this hormone exerts such a modeling at the central level that induces the development of masculine neuronal structures and shutting down the feminine, thus programming the male reproductive axis. In the present study we analyzed the function of the hypothalamic-pituitary unit of transgenic male mice that overexpress both α - and β - subunits of human chorionic gonadotropin (hCG). This hormone is a super-agonist of the luteinizing hormone (LH) and binds to the same cognate receptor. Transgenic males present with chronic hyperandrogenism due to the constant hCG stimulation on the testicular androgen production. To evaluate the role of androgens on the transgenic phenotype, males were subjected to antiandrogen treatment from perinatal and infantile life, and analyzed at prepuberty and adulthood. Our results show that, in male mice, there is a critical window of time between gestational day 18 and postnatal day 14, when chronically elevated androgens induce a premature activation of the hypothalamus and a concomitant silencing of the pituitary gonadotropin production. These findings reveal new roles for androgens and/or their locally-produced metabolites on the developmental programming of the male hypothalamic-pituitary axis (dys)regulation.

Key words: human chorionic gonadotropin, transgenic mice, hypothalamus, pituitary, androgens.

Introducción

El eje hipotálamo-hipófiso-gonadal

En los mamíferos de ambos sexos, la reproducción depende de interacciones endocrinas entre la

unidad hipotálamo-hipofisaria y el tracto reproductivo, este último conformado por las gónadas y los órganos sexuales accesorios. La interacción entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas se denomina *eje hipotálamo-hipófiso-gonadal* (HHG), el cual se encarga de coordinar dos procesos claves en la reproducción sexual: la síntesis de esteroides y la producción de gametas. Los esteroides sexuales son vitales en la función gonadal, donde participan en la espermatogénesis y la maduración folicular. Asimismo, actúan sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria influenciando la secreción de gonadotrofinas mediante sistemas de retroalimentación y cumplen un rol fundamental en el comportamiento sexual¹.

La hipófisis produce las gonadotrofinas adenohipofisarias *hormona luteinizante* (LH) y *hormona foliculoestimulante* (FSH), cuya producción está bajo el control directo de la secreción hipotalámica de la *hormona liberadora de gonadotrofinas* (GnRH). Tanto la LH como la FSH son secretadas por un mismo tipo celular: los gonadotropos, que son el blanco de la GnRH, un pequeño péptido de 10 aminoácidos producido por neuronas peptidérgicas localizadas en el hipotálamo, denominadas *neuronas GnRH*. Dichas neuronas proyectan sus axones hacia la eminencia media y secretan GnRH en forma pulsátil al sistema vascular portal hipofisario, por donde llega hasta la adenohipófisis y estimula la secreción de LH y FSH^{2,3}. Las gonadotrofinas viajan por el sistema circulatorio y actúan en las células blanco del ovario y testículo orquestando la producción de ovocitos y espermatozoides, así como la secreción de hormonas esteroideas y peptídicas.

El eje HHG es el pilar fundamental en la regulación endocrina de la función reproductiva. Cualquier alteración en el control de las diferentes hormonas o receptores involucrados en el funcionamiento de este eje puede provocar cambios en el inicio de la pubertad, infertilidad, desarrollo de cáncer, y otras alteraciones relacionadas con niveles elevados o reducidos de hormonas esteroideas^{4,5}.

Impronta perinatal de los esteroides sexuales sobre el funcionamiento del eje HHG

Uno de los eventos clave en el desarrollo y la diferenciación del eje HHG es la inducción de diferencias estructurales y funcionales permanentes en el hipotálamo y otras áreas especializadas del cerebro. Este mecanismo de *impronta* (*imprinting*) opera durante un período crítico de la vida prenatal/posnatal temprana, que en roedores abarca desde el nacimiento hasta la primera semana de vida, induciendo la organización de circuitos neuronales específicos según el sexo, que controlan una gran variedad de funciones neuroendocrinas, comportamentales y cognitivas⁶. En el macho, la activación

transitoria del eje HHG durante la vida perinatal produce un aumento de testosterona, que actúa como un “factor organizador” de estructuras neuronales típicamente masculinas. En los roedores machos, los niveles de testosterona aumentan progresivamente y exhiben dos picos: uno en la gestación tardía (día gestacional 17-19)⁷, y otro en la vida neonatal temprana (pocas horas luego del nacimiento)⁸. El aumento neonatal de testosterona es responsable de la masculinización y defeminización del cerebro, y una gran cantidad de evidencias experimentales demostraron que los estrógenos y la dihidrotestosterona (DHT) derivadas de la testosterona por aromatización y 5 α -reducción, respectivamente, son críticos en estos procesos^{9,10}.

La conversión de testosterona a DHT ocurre a través de dos enzimas 5 α -reductasas, las cuales son productos de genes distintos: 5 α -reductasa I, con baja afinidad por la testosterona y considerada una enzima constitutiva, y 5 α -reductasa II, con alta afinidad por la testosterona y que actúa en la androgenización de las estructuras periféricas dependientes de andrógenos¹¹. La testosterona se aromatiza a estradiol a través de la acción de la enzima *aromatasa*, y se considera que el estradiol convertido localmente es el efector principal de los procesos de masculinización. De acuerdo con el rol inductor de mecanismos de impronta postulado para estradiol, la expresión de aromatasa muestra un perfil ontogénico muy específico, con aumentos de actividad en el hipotálamo medio basal y área preóptica que coinciden con los aumentos de testosterona¹². El rol de la DHT en la masculinización no está aún completamente esclarecido, pero se demostró que la expresión de 5 α -reductasa II aumenta en el cerebro en paralelo con el perfil de síntesis de testosterona por el testículo en desarrollo. Por otra parte, estudios in vitro mostraron que la testosterona induce fuertemente su expresión en células hipotalámicas¹³. Además, el receptor de andrógenos se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro fetal/neonatal y muestra una mayor concentración en las áreas que controlan la reproducción, y su expresión aumenta considerablemente en el nacimiento, que es mayor en los neonatos masculinos. Esto sugiere un efecto directo de los andrógenos en los fenómenos de impronta perinatal⁹.

Al igual que con la diferenciación sexual embrionaria, el fenotipo neuroendocrino preestablecido sería femenino, y la secreción perinatal aguda de testosterona sería la responsable de masculinizar las acciones de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre la secreción de GnRH, eliminando los complejos mecanismos regulatorios que operan en las hembras y conservando un único mecanismo de retroalimentación negativa¹⁴. El modelado inducido por la testosterona y/o sus metabolitos altera los circuitos del cerebro en desarrollo

e impide que se ejerza en el macho la regulación positiva del estradiol sobre la descarga de GnRH/LH, que normalmente ocurre en las hembras en la etapa preovulatoria. En contraste, roedores macho castrados durante la ventana crítica del desarrollo perinatal son capaces de mostrar, en la adultez, picos de LH como los que presentan las hembras^{15, 16}.

Activación de las neuronas GnRH e inicio de la pubertad

La ontogenia de la secreción pulsátil de GnRH y gonadotrofinas se caracteriza por presentar concentraciones elevadas de gonadotrofinas durante las últimas etapas del desarrollo fetal y el estadio neonatal, seguido por una declinación progresiva que alcanza un estado hipogonadotrófico quiescente durante la etapa infantil, con una disminución paralela en la capacidad de respuesta hipofisaria a la GnRH administrada exógenamente. Luego de este período de quiescencia, la pubertad se inicia cuando la secreción pulsátil de GnRH nuevamente comienza a aumentar, estimulando la secreción de gonadotrofinas y la producción de esteroides sexuales, e iniciando la maduración gonadal y la capacidad de expresar un comportamiento reproductivo¹. El mecanismo por el cual las neuronas GnRH se activan al inicio de la pubertad ha sido intensamente investigado, y en la actualidad sigue despertando profundo interés. Varios factores se han propuesto como reguladores centrales de las neuronas GnRH^{17, 18}, entre ellos la kisspeptina, la cual, actuando a través de su receptor GPR54, es uno de los activadores más potentes de la descarga de GnRH¹⁹ y esencial en el inicio de la pubertad en varias especies^{16, 20}. En roedores, la expresión de kisspeptina presenta diferencias sexuales en los núcleos hipotalámicos arcuato y AVPV (anteroventral-periventricular)^{15, 20}, donde actuaría como mediador de los efectos de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre la liberación de GnRH en machos y hembras^{21, 22}. Además del dimorfismo sexual que presenta el circuito kisspeptina-GPR54, las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas también establecen conexiones muy importantes con las neuronas GnRH, y están implicadas en el establecimiento de las diferencias sexuales del cerebro en desarrollo por la acción de los esteroides perinatales²³. El glutamato es uno de los transmisores excitatorios dominantes en el hipotálamo y funciona como un mediador central fundamental en la regulación neuroendocrina de diversos procesos como el inicio de la pubertad, la ciclicidad menstrual, la conducta reproductiva, etc.²⁴. A su vez, la exocitosis de glutamato puede ser inhibida por GABA (ácido γ -amino butírico)²⁵; estos dos sistemas se encuentran íntimamente relacionados ya que el glutamato es el precursor natural de la síntesis de GABA, a través de la acción de la

enzima glutamato decarboxilasa 67 (GAD67)²⁶. En las neuronas GnRH se identificaron receptores de glutamato del tipo NMDA (N-metil D-aspartato) y receptores de GABA tipo A y B²⁷⁻²⁹.

El modelo de ratones hipersecretores de hCG (ratones hCG $\alpha\beta$ +))

Los modelos transgénicos han aportado evidencias sobre la importancia de las gonadotrofinas en disfunciones reproductivas y tumorigénesis gonadal. Muchos desórdenes endocrinos son atribuidos a una secreción hormonal excesiva, que supera los niveles fisiológicos³⁰. Recientemente se han desarrollado ratones transgénicos capaces de secretar niveles elevados de la hCG^{31, 32}. Esta hormona es normalmente secretada por la placenta humana durante el primer trimestre del embarazo y está íntimamente relacionada en estructura y función con la LH, interactuando ambas con el mismo receptor³³. La hCG está ausente en el ratón, pero administrada exógenamente es capaz de estimular la esteroideogénesis ovárica y la ovulación. A través de la hiperproducción intencional de hCG en ratones, se han logrado reconocer fenotipos novedosos, tanto en machos como en hembras, que no podrían haber sido detectados siguiendo protocolos de administración exógena de gonadotrofinas, o en modelos animales con moderada secreción de gonadotrofinas. Para tal fin, se crearon y caracterizaron dos modelos de ratones transgénicos: ratones que contienen el gen de la subunidad hCG α (ratones hCG α +) y ratones que contienen el gen de la subunidad hCG β (ratones hCG β +)). Ambos transgenes se encuentran bajo el control del promotor humano ubiquitina C, el cual dirige la expresión génica en una amplia variedad de tejidos desde la última etapa de la vida fetal. Con la intención de obtener un modelo animal capaz de producir niveles farmacológicos de hCG, se cruzaron hembras hCG α + con machos hCG β + y se obtuvieron crías doble transgénicas hCG $\alpha\beta$ + que coexpresan ambas subunidades de hCG en diferentes tejidos y secretan niveles elevados de la forma dimérica de hCG (1000 a 2000 veces superior en términos de bioactividad de hCG/LH), que si bien alcanzan valores farmacológicos, en comparación con los humanos, no exceden los hallados en el embarazo^{32, 34}.

A diferencia de los machos hCG β +, los doble transgénicos hCG $\alpha\beta$ + son infértiles, presentan severas alteraciones en los órganos reproductivos y un significativo aumento en la esteroideogénesis testicular³². El análisis histológico del testículo revela la aparición de adenomas de las células de Leydig durante la infancia y prepubertad. Por definición, se considera adenoma cuando los islotes de células de Leydig presentan un diámetro mayor al del túbulo seminífero^{35, 36}. Los adenomas de células de Leydig desaparecen con la llegada de la adul-

tez, ya que derivan de la población de células de Leydig fetales, lo que indica que sólo estas células son capaces de responder a niveles suprafisiológicos de LH/hCG y desarrollar adenomas³⁷.

La hipersecreción de hCG en los ratones hCG- $\alpha\beta$ + impacta en las gónadas desde edades tempranas del desarrollo, estimulando fuertemente la esteroidogénesis. Nos propusimos estudiar las consecuencias de la hiperproducción de hCG sobre el funcionamiento del eje reproductivo masculino, postulando como hipótesis que los niveles elevados de esteroides gonadales en los ratones hCG- $\alpha\beta$ + actuarían sobre el eje HHG alterando la síntesis y secreción de hormonas y factores clave en la función reproductiva. Dichos esteroides participarían, directa o indirectamente, en las disfunciones reproductivas que presenta este modelo.

Resultados y discusión

Evaluación de los niveles hormonales de los ratones machos hCG- $\alpha\beta$ +

En primer lugar, nos propusimos estudiar los niveles séricos de testosterona y FSH en edades representativas del desarrollo: la infancia (7 y 10 días), la prepubertad (21 y 28 días) y la adultez (90 días) en los machos hCG- $\alpha\beta$ + comparados con los de la cepa salvaje (WT) (FIGURA 1). Se estudió principalmente la regulación de FSH en lugar de LH, ya que las similitudes de estructura y función entre LH y hCG, junto con los elevados niveles de hCG producidos por los machos hCG- $\alpha\beta$ +, dificultan la interpretación de los resultados basados en la secreción de LH. La concentración sérica de testosterona en los machos transgénicos resultó significativamente elevada, comparados con los controles WT, en todas las edades estudiadas (FIGURA 1A). En contraste,

la concentración sérica de FSH en los machos hCG- $\alpha\beta$ + se encontró disminuida en todas las edades estudiadas y fue significativamente menor que la de los machos WT a partir de los 10 días de edad (FIGURA 1B).

Con el fin de evaluar el efecto de los andrógenos sobre la regulación de la secreción de FSH, se utilizaron machos WT y hCG- $\alpha\beta$ + tratados con el antiandrógeno flutamida, el cual compite con la testosterona y la DHT por la unión al receptor y bloquea la transducción de la señal androgénica³⁸. Los animales se trataron con flutamida desde los 14 días de edad y se sacrificaron a los 28 y 90 días de edad. De manera comparativa, se realizaron castraciones en ambos grupos y se sacrificó a los animales a las mismas edades. En los controles WT, los niveles séricos de FSH aumentaron significativamente en respuesta al tratamiento con flutamida y a la castración (TABLA I). Por el contrario, los niveles séricos de FSH de los machos hCG- $\alpha\beta$ + castrados o tratados con flutamida permanecieron significativamente menores que los de WT para ambas edades. Estos resultados indican que ni la castración ni el tratamiento antiandrogénico desde la edad infantil lograron restaurar los niveles séricos de FSH en los machos hCG- $\alpha\beta$ + al alcanzar la edad prepuberal o adulta.

Debido a que la acción fisiológica de la GnRH sobre la liberación de gonadotropinas es ejercida de manera pulsátil, se determinó si la concentración de la GnRH hipotalámica y la pulsatilidad de la GnRH ex vivo estaban afectadas en este modelo. Se observó un aumento en la concentración de la GnRH hipotalámica y una aceleración en la frecuencia de pulsos de GnRH en machos transgénicos prepúberes comparados con el grupo WT³⁹. La activación temprana del generador de pulsos de GnRH podría interpretarse como un signo de

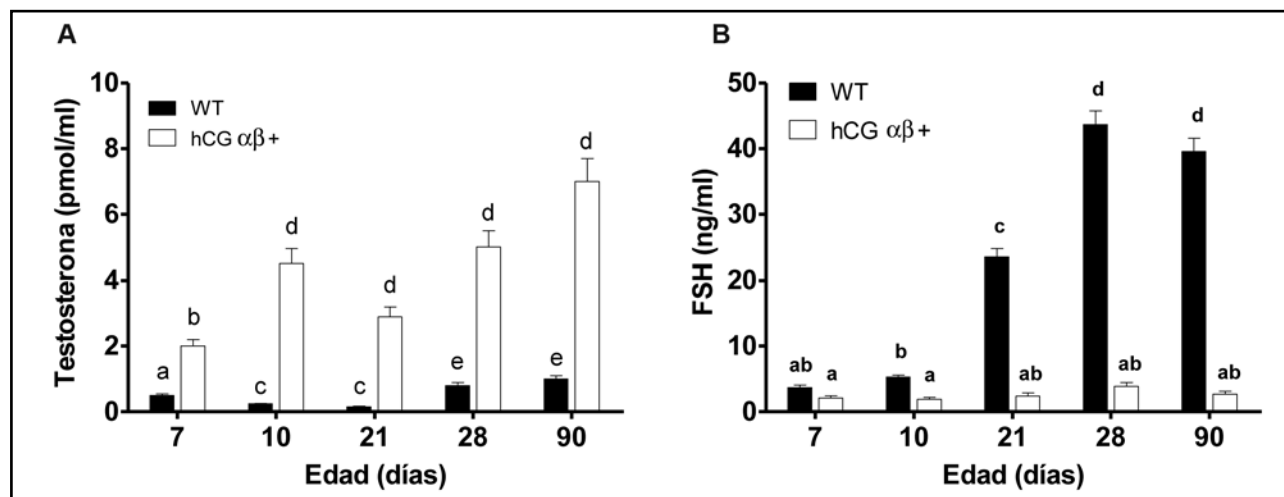


Figura 1: A) Concentración de testosterona sérica en machos WT y hCG- $\alpha\beta$ + a los 7, 10, 21, 28 y 90 días de edad. ANOVA de 2 factores-Bonferroni. Se obtuvieron efectos significativos del genotipo ($p < 0,001$). N=5-7, letras distintas: $p < 0,05$. B) Concentración de FSH sérica en machos WT y hCG- $\alpha\beta$ + a los 7, 10, 21, 28 y 90 días de edad. ANOVA de 2 factores-Bonferroni. Se obtuvieron efectos significativos del genotipo, la edad y la interacción ($p < 0,001$). N=5-7, letras distintas: $p < 0,05$.

	28 días		90 días	
	WT	hCG $\alpha\beta$ +	WT	hCG $\alpha\beta$ +
Control	43,6 $\pm$ 2,2 ^a	3,9 $\pm$ 0,3 ^b	39,6 $\pm$ 2,0 ^a	2,7 $\pm$ 0,4 ^b
Flutamida	57,7 $\pm$ 1,7 ^d	4,2 $\pm$ 1,1 ^{bc}	47,0 $\pm$ 3,4 ^a	2,9 $\pm$ 0,4 ^{bc}
Castración	77,5 $\pm$ 2,0 ^e	7,4 $\pm$ 0,4 ^c	65,7 $\pm$ 7,2 ^d	5,0 $\pm$ 0,5 ^c

Tabla 1. Concentración de FSH sérica en machos WT y hCG $\alpha\beta$ + prepúberes (28 días) y adultos (90 días) tratados con flutamida desde los 14 días de edad o castrados dos semanas previas al sacrificio.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores-Bonferroni.

pubertad precoz en los machos hCG $\alpha\beta$ +. Sin embargo, estudios previos realizados en el modelo no encontraron signos de pubertad precoz, estimados por la edad en que aparece la separación balano-prepucial, a pesar de los niveles elevados de andrógenos presentes en el modelo³⁷, lo que refuerza el concepto que indica que el inicio de la pubertad es un fenómeno intrínseco del sistema nervioso central, que involucra tanto mecanismos dependientes como también independientes de hormonas gonadales¹⁴.

Evaluación de la expresión génica en hipófisis de ratones machos hCG $\alpha\beta$ +

Se analizó la expresión génica de las subunidades de gonadotrofinas FSH β , LH β y la subunidad común α en hipófisis de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + prepúberes (FI-

GURA 2). En coincidencia con los niveles séricos de FSH, los niveles de expresión de las subunidades FSH β y α común resultaron significativamente disminuidos en la hipófisis de machos hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT. La expresión de la subunidad LH β también se encontró disminuida en los machos transgénicos comparados con los WT, que indica que no sólo la producción de FSH, sino también la de LH se encuentran afectadas en este modelo. Se analizó también la expresión de genes clave en la regulación de gonadotrofinas, tales como: i) el receptor de estrógenos α , mediador principal de los efectos de retroalimentación de los esteroides gonadales sobre la producción de LH; ii) el receptor de GnRH, el cual transduce la señal del GnRH hipotalámico a los gonadotropos; y iii) la folistatina, la cual es un inhibidor

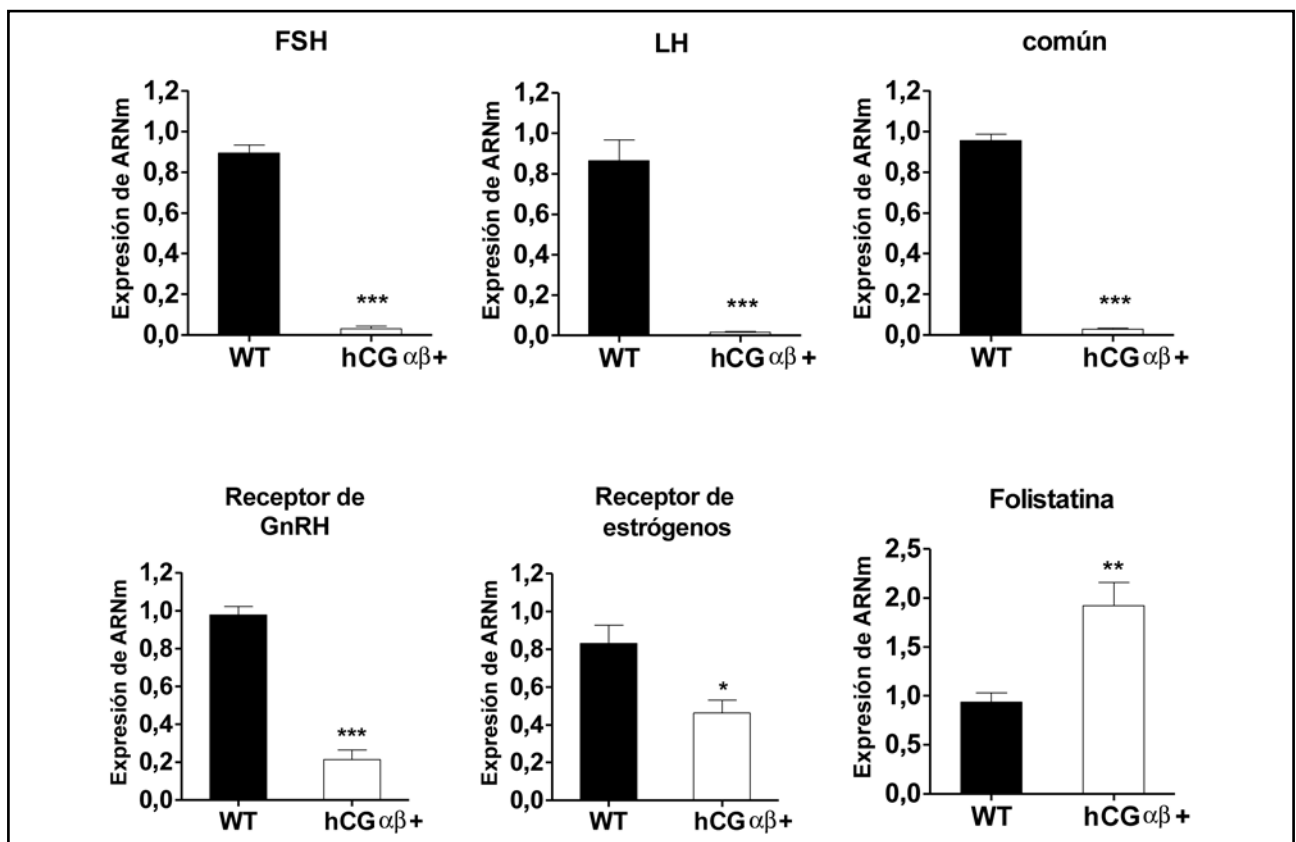


Figura 2. Perfil de expresión génica en hipófisis de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + de 28 días de edad evaluada por PCR en Tiempo Real. Prueba t de Student, N=4, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

paracrino clave en la regulación de la secreción basal de FSH (FIGURA 2). Tanto los niveles de ARNm del receptor de estrógenos α como del receptor de GnRH se encontraron disminuidos, mientras que los de folistatina resultaron elevados en los machos hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT.

Existen evidencias de que la capacidad de respuesta de los gonadotropos a la GnRH se correlaciona con el número de receptores de GnRH en la hipófisis y con la frecuencia hipotalámica de pulsos de GnRH⁴⁰. La secreción pulsátil de GnRH en tiempos cortos induce un aumento en la expresión de su receptor, mientras que la exposición prolongada a altas concentraciones y/o a una alta frecuencia de pulsos de GnRH induce una disminución de aquella, seguida de supresión de la síntesis y secreción de gonadotropinas^{41, 42}. Se ha demostrado además que la aplicación de GnRH de manera continua o en pulsos de alta frecuencia induce un aumento en los niveles de ARNm de folistatina en la hipófisis⁴³. En los machos hCG $\alpha\beta$ +, el aumento en la concentración hipotalámica y la secreción pulsátil de GnRH fue acompañado por un aumento en la expresión del ARNm de folistatina y una disminución en la expresión del ARNm del receptor de GnRH en hipófisis. Es posible, por lo tanto, que la supresión de la producción de gonadotropinas en los machos hCG $\alpha\beta$ + se deba, al menos en parte, a un aumento en la descarga de GnRH desde el hipotálamo, que induciría una regulación por descenso prematura del receptor de GnRH, y podría alterar el desarrollo y/o la funcionalidad de los gonadotropos.

Evaluación de la expresión génica en hipotálamo de ratones machos hCG $\alpha\beta$ +

Con el fin de estudiar la posible influencia de la metabolización de esteroides gonadales sobre la regulación de la producción de las gonadotropinas hipofisarias, se evaluó el perfil de expresión de dos enzimas esteroideogénicas reguladas por andrógenos: la aromatasa y la 5 α -reductasa II⁹, en el hipotálamo de machos WT y hCG $\alpha\beta$ +. Se evaluó también la expresión génica de kisspeptina y GAD67, como posibles mecanismos moduladores de la actividad de las neuronas GnRH en el hipotálamo. Se estudiaron estos parámetros en dos momentos relevantes de la regulación de la función hipotalámica, como es el estadio neonatal (4 días) y prepuberal (28 días) (FIGURA 3). La expresión de aromatasa presentó un aumento significativo en el hipotálamo de machos hCG $\alpha\beta$ + a los 28 días de edad comparados con los WT, mientras que a los 4 días no mostró diferencias significativas entre genotipos. La expresión de 5 α -reductasa II no presentó cambios a ninguna de las edades estudiadas. Mientras que a los 4 días de edad la expresión de kisspeptina no mostró diferencias significativas entre genotipos, a los 28 días ésta resultó significativamente menor en el hipotálamo del grupo hCG $\alpha\beta$ + con respecto al WT. En el caso de GAD67, se encontró lo opuesto a kisspeptina, se observaron niveles de expresión elevados de la enzima productora de GABA en el hipotálamo hCG $\alpha\beta$ + de 4 días, sin detectarse diferencias entre genotipos a los 28 días.

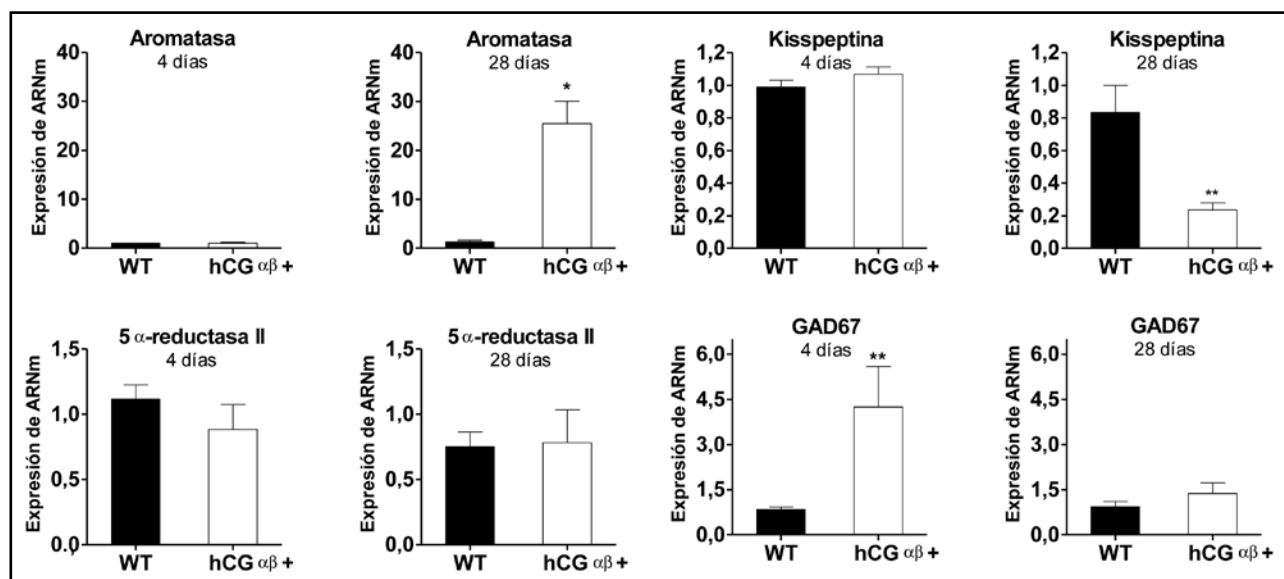


Figura 3. Perfil de expresión génica en el hipotálamo de machos WT y hCG $\alpha\beta$ + a los 4 y 28 días de edad evaluada por PCR en Tiempo Real. Prueba t de Student, N=4, *: p<0,05, **: p<0,01.

Los niveles reducidos en la expresión de kisspeptina detectados en los hipotálamos de machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes concuerdan con la acción supresora de los elevados niveles circulantes de testosterona. Además, se demostró que la administración neonatal de compuestos estrogénicos provoca una disminución dosis-dependiente en los niveles de expresión génica de kisspeptina tanto en machos como en hembras prepúberes⁴⁴; en los machos hCG $\alpha\beta$ + los niveles crónicamente elevados de testosterona indican que la conversión local de estrógenos neonatales podría estar aumentada en este modelo y contribuir a la disminución prepuberal de los niveles de expresión de kisspeptina. Sin embargo, los bajos niveles de expresión de este factor no explican la concentración y pulsatilidad de GnRH elevadas que se observaron en el hipotálamo de los machos hCG $\alpha\beta$ +. Este efecto podría atribuirse a la participación de otros moduladores igualmente implicados en el control de la liberación de GnRH, tales como GABA y glutamato²³, así como también moléculas de señalización derivadas de las células de la glía^{18, 45}. Un hecho importante es que los circuitos de neurotransmisores excitatorios y factores transinápticos gliales dependen del modelado ejercido por los esteroides gonadales durante la vida perinatal, que genera diferencias dimórficas sobre la arquitectura celular de machos y hembras^{23, 26, 45}. Si bien el rol inhibitorio del GABA sobre la neurona GnRH está extensamente documentado, se demostró la existencia de un período sensible durante la vida perinatal donde tanto el GABA como el glutamato son excitatorios, luego del cual el GABA lentamente cambia su acción y comienza a mediar procesos inhibitorios⁴⁶. En este sentido, se demostró que el estradiol estimula la síntesis del GABA, y es capaz de extender el tiempo durante el cual este neurotransmisor es excitatorio en células hipotálamicas en cultivo²³. Se detectaron, en hipotálamos de machos hCG $\alpha\beta$ + de 4 días de edad, niveles elevados de GAD67, la enzima limitante en la síntesis de GABA. Estos datos sugieren que la testosterona crónicamente elevada y/o sus metabolitos podrían estar alterando los circuitos excitatorios durante la vida perinatal, causando la aceleración de la pulsatilidad de GnRH en la edad prepuberal. Además de la capacidad de los esteroides gonadales de alterar parámetros de la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica durante la vida perinatal, se demostró que el estradiol es capaz de modular la funcionalidad de las células de la glía en el núcleo arcuato, alterando su morfología y sus acciones neuroplásticas, lo que conduce a alteraciones en las sinapsis⁴⁵. Finalmente, las neuronas GnRH expresan el receptor de estrógenos β y el receptor de LH^{47, 48}, por lo que la presencia de niveles elevados de estrógenos convertidos localmente y/o de hCG podría estar alterando la fisiología de dichas neuronas. Investigaciones futuras se dirigirán a

determinar si algunos de los factores previamente mencionados están compensando los niveles disminuidos de expresión de kisspeptina y son la causa principal de la activación prematura de la neurona GnRH en los machos hCG $\alpha\beta$ +

Efecto del tratamiento antiandrogénico aplicado desde la edad perinatal sobre el fenotipo de los machos hCG $\alpha\beta$ +

Con el fin de estudiar el efecto del bloqueo de los andrógenos desde la etapa perinatal, se administró flutamida a machos WT y hCG $\alpha\beta$ + desde el día gestacional 18 (DG18) hasta a los 28 días de edad. El tratamiento perinatal con flutamida fue capaz de elevar significativamente los niveles séricos de FSH en los machos hCG $\alpha\beta$ + (FIGURA 4A). Coincidiendo con el perfil obtenido para la FSH sérica, la expresión génica de FSH β hipofisaria aumentó en el grupo hCG $\alpha\beta$ + tratado con flutamida comparado con el transgénico no tratado, acompañado por un aumento concomitante en la expresión génica del receptor de GnRH (FIGURA 4B). En el hipotálamo, el tratamiento perinatal con flutamida normalizó la expresión génica de aromatasa y kisspeptina (FIGURA 4C).

La administración de flutamida a machos hCG $\alpha\beta$ + desde el DG18 demostró una inducción de los andrógenos, a través de su receptor, sobre la expresión hipotalámica del ARNm de aromatasa en la edad prepuberal, lo que sugiere que junto con los andrógenos de origen gonadal, la conversión hipotalámica a estrógenos podría ser clave en los mecanismos de supresión de gonadotrofinas en los machos hCG $\alpha\beta$ +. Así, la aromatización hipotalámica de testosterona sería un prerrequisito en la regulación mediada por estrógenos, debido a que el estradiol producido perinatalmente fuera del sistema nervioso central no estaría biodisponible debido a su unión a α -fetoproteína en suero⁴⁹.

Conclusiones

Varias líneas de evidencia indican que las hormonas esteroideas producidas por las gónadas en desarrollo son capaces de programar la función neuroendocrina y el comportamiento de machos y hembras. Estos procesos pueden alterarse durante etapas críticas de la diferenciación sexual del cerebro y manifestarse como disfunciones reproductivas en la adultez⁵⁰. Hemos demostrado que los machos hCG $\alpha\beta$ + presentan niveles elevados de testosterona y disminuidos de FSH durante toda la vida, así como también una falta de respuesta de la FSH a la castración y al tratamiento con el antiandrogénico flutamida, tanto en la etapa prepuberal como en la adultez. Estos resultados evidencian alteraciones persistentes en la regulación neuroendocrina que controla el eje de las gonadotrofinas. En

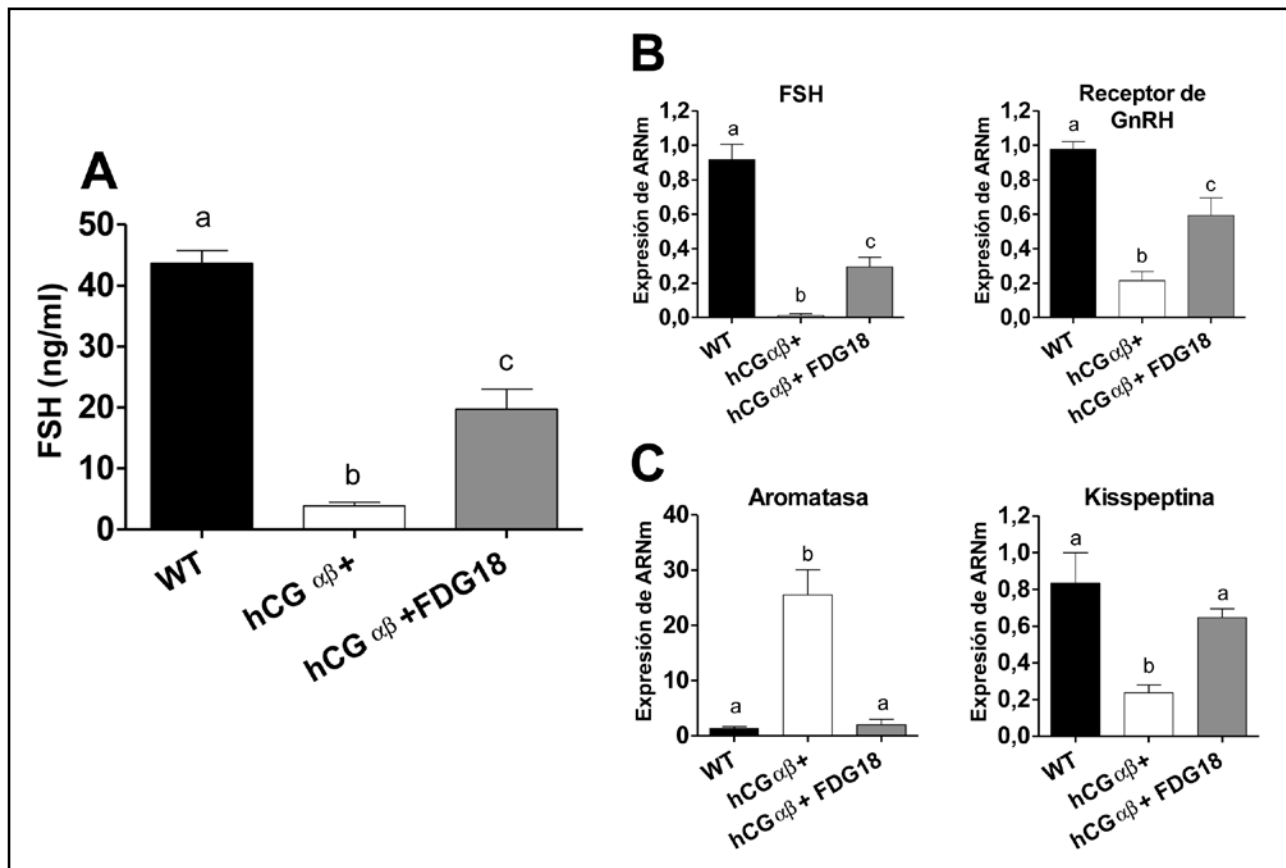


Figura 4. Efecto del tratamiento perinatal con flutamida sobre los niveles de FSH sérica y expresión génica en hipófisis e hipotálamo, de machos WT, hCG $\alpha\beta$ + y hCG $\alpha\beta$ + tratados con flutamida desde el DG18 hasta los 28 días de edad (hCG $\alpha\beta$ +FDG18). A) niveles séricos de FSH; ANOVA de 2 factores-Bonferroni, N=4, letras distintas: p<0,05. Se observaron efectos significativos del genotipo, el tratamiento y la interacción (p<0,001). B) Expresión génica de FSH β y receptor de GnRH, en hipófisis, y C) de aromatasa y kisspeptina, en hipotálamo, por PCR en Tiempo Real. ANOVA de 1 factor-Bonferroni, N=4, letras distintas: p<0,05.

contraste con la función hipofisaria, la función hipotalámica de los machos hCG $\alpha\beta$ + prepúberes resultó activada y se observó una mayor concentración hipotalámica y un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH ex vivo, que no se reflejó en los niveles de síntesis y secreción de gonadotrofinas.

Uno de los hallazgos más sorprendentes en los machos hCG $\alpha\beta$ + fue la inhibición de la síntesis de gonadotrofinas, independientemente de los esteroides gonadales, evidenciada por la falta de respuesta de la FSH a la liberación de la regulación negativa por medio de la castración o del tratamiento con flutamida, tanto en la prepubertad como en la adultez. Por el contrario, cuando el tratamiento con flutamida se inició el DG18 y se mantuvo hasta los 28 días de edad en los machos hCG $\alpha\beta$ +, ocurrió una recuperación parcial de la síntesis y secreción de FSH, que fue acompañada por un aumento en la expresión hipofisaria del receptor de GnRH. Estos resultados sugieren la existencia de una ventana de tiempo crítica en la vida perinatal, donde los andrógenos determinarían el nivel de activación del eje HHG.

Durante este período, niveles elevados de andrógenos serían capaces de inducir un apagado irreversible de la diferenciación de los gonadotropos, junto con la síntesis y secreción de gonadotrofinas, procesos en los cuales la regulación del receptor de GnRH juega un rol clave⁵¹. Estos resultados sugieren que el exceso de andrógenos durante la vida perinatal/infantil es capaz de perturbar de manera permanente la programación del eje reproductivo, y podría ser la causa fundamental de la infertilidad en los machos hCG $\alpha\beta$ +, ya que el tratamiento con flutamida a partir de los 14 días de edad no fue capaz de restaurar la fertilidad. En las hembras, está bien establecido que la exposición temprana a andrógenos provoca profundas alteraciones sobre el control neuroendocrino de los ciclos reproductivos en la adultez, lo que conduce a la pérdida de la capacidad de generar picos ovulatorios de GnRH/LH y a la infertilidad⁵². En los machos, la posible influencia de niveles elevados de andrógenos ha sido poco explorada, probablemente debido a que están normalmente expuestos a andrógenos desde etapas muy tempranas del desarrollo fetal. El análisis del modelo hCG $\alpha\beta$ + pone de

manifiesto que, en los machos, la exposición a un exceso de andrógenos durante etapas clave del desarrollo bien podría ser causa de infertilidad en la adultez.

Investigaciones recientes identificaron la presencia de compuestos químicos en el medio ambiente con capacidad de mimetizar a los andrógenos en sus mecanismos de señalización^{53, 54}. Debido a que la infertilidad idiopática en las parejas es relativamente alta, la posibilidad de que la exposición a concentraciones anormales de esteroides o compuestos con actividad esteroidea durante la gestación sea responsable de la perturbación en el control neuroendocrino de la reproducción masculina debería ser considerada en mayor profundidad en humanos. En este sentido, el modelo hCGαβ+ es una valiosa herramienta para investigar nuevos mecanismos mediados por los andrógenos y sus metabolitos en la (des)regulación del eje reproductor masculino.

Referencias

1. Sisk L, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience* 2004; 7:1040-1047.
2. Silverman AJ, Krey LC, Zimmerman EA. A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (GnRH) neuronal network in mammals. *Biol Reprod* 1979; 20:98-110.
3. Burger LL, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol* 2004; 33:559-584.
4. Achermann JC, Jameson JL. Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Mol Endocrinol* 1999; 13:812-818.
5. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 2000; 21:551-583.
6. Arnold AP, Gorski RA. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7:413-442.
7. Weisz J, Ward IL. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 1980; 106:306-316.
8. Corbier P, Kerdelhue B, Picon R, Roffi J. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology* 1978; 103:1985-1991.
9. Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, Casati L, Conti L, Celotti F. Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109:294-299.
10. Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *J Neuroendocrinol* 2009; 21:410-414.
11. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:25-61.
12. Colciago A, Celotti F, Pravettoni A, Mornati O, Martini L, Negri-Cesi P. Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 155:107-116.
13. Poletti A, Melcangi RC, Negri-Cesi P, Maggi R, Martini L. Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone-producing neuronal cell line GT1-1. *Endocrinology* 1994; 135:2623-2628.
14. Foster DL, Jackson LM, Padmanabhan V. Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255:109-119.
15. Kauffman AS. Sexual differentiation and the Kiss1 system: hormonal and developmental considerations. *Peptides* 2009; 30:83-93.
16. Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 314:164-169.
17. Ojeda SR, Skinner MK. Puberty in the rat. En: Knobil E (ed.). *The Physiology of Reproduction* (3ª edición), Vol. 1. San Diego, CA: Academic Press/Elsevier. 2006:2061-2126.
18. Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B, Mungenast A. Glia-to-neuron signalling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med* 2003; 35:244-255.
19. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005; 25:11349-11356.
20. Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev* 2008; 57:277-287.
21. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005a; 146:3686-3692.
22. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of Kiss-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005b; 146:2976-2984.
23. McCarthy MM, Auger AP, Perrit-Sinal TS. Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends in Neurosci* 2002; 25:307-312.
24. Brann DW, Mahesh VB. Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev* 1997; 18:678-700.
25. Feleder C, Ginzburg M, Wuttke W, Moguilevsky JA, Arias P. GABAergic activation inhibits the hypothalamic-

- pituitary-ovarian axis and sexual development in the immature female rat. Associated changes in hypothalamic glutamatergic and taurinergic systems. *Brain Res Dev Brain Res* 1999; 116:151-157.
26. Davis AM, Grattan DR, Selmanoff M, McCarthy MM. Sex differences in glutamic acid decarboxylase mRNA in neonatal rat brain: implications for sexual differentiation. *Horm Behav* 1996; 30:538-552.
 27. Pape JR, Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE. Profiling gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor subunit mRNA expression in postnatal gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons of the male mouse with single cell RT-PCR. *Neuroendocrinology* 2001; 74:300-308.
 28. Miller BH, Gore AC. N-Methyl-D-aspartate receptor subunit expression in GnRH neurons changes during reproductive senescence in the female rat. *Endocrinology* 2002; 143:3568-3574.
 29. Zhang C, Bosch MA, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling. *Endocrinology* 2009; 150:2388-2394.
 30. Sutton AL, Keri RA. The pleiotropic effects of excessive luteinizing hormone secretion in transgenic mice. *Semin Reprod Med* 2007; 25:360-367.
 31. Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I. Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2002; 143:4084-4095.
 32. Rulli SB, Ahtiainen P, Mäkelä S, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi I. Elevated steroidogenesis, defective reproductive organs, and infertility in transgenic male mice overexpressing human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2003; 144:4980-4990.
 33. Jameson JL, Hollenberg AN. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 1993; 14:203-221.
 34. Huhtaniemi I, Rulli S, Ahtiainen P, Poutanen M. Multiple sites of tumorigenesis in transgenic mice overproducing hCG. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234:117-126.
 35. Clegg ED, Cook JC, Chapin RE, Foster PM, Daston GP. Leydig cell hyperplasia and adenoma formation: mechanisms and relevance to humans. *Reprod Toxicol* 1997; 11:107-121.
 36. Cook JC, Klinefelter GR, Hardisty JF, Sharpe RM, Foster PM. Rodent Leydig cell tumorigenesis: a review of the physiology, pathology, mechanisms, and relevance to humans. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29:169-261.
 37. Ahtiainen P, Rulli SB, Shariatmadari R, Pelliniemi LJ, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi IT. Fetal but not adult Leydig cells are susceptible to adenoma formation in response to persistently high hCG level: a study on hCG overexpressing transgenic mice. *Oncogene* 2005; 24:7301-7309.
 38. Rulli SB, Gonzalez-Calvar SI, Campo S, Calandra RS. Effects of two non-steroidal antiandrogens on testicular function in prepubertal rats. *J Androl* 1995; 16:225-232.
 39. Gonzalez B, Ratner LD, Di Giorgio NP, Poutanen M, Huhtaniemi I, Calandra RS, Lux Lantos VAR, Rulli SB. Effect of chronically elevated androgens on the developmental programming of the hypothalamic-pituitary axis in male mice. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 332:78-87.
 40. Meidan R, Aroya NB, Koch Y. Variations in the number of pituitary LHRH receptors correlated with altered responsiveness to LHRH. *Life Sci* 1982; 30:535-541.
 41. Conn PM, Rogers DC, Seay SG. Biphasic regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by receptor microaggregation and intracellular Ca^{2+} levels. *Mol Pharmacol* 1984; 25:51-55.
 42. Cheng KW, Ngan ES, Kang SK, Chow BK, Leung PC. Transcriptional down-regulation of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH: role of protein kinase C and activating protein 1. *Endocrinology* 2000; 141:3611-3622.
 43. Kirk SE, Dalkin AC, Yasin M, Haisenleder DJ, Marshall JC. Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology* 1994; 135:876-880.
 44. Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, García-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 2009; 150:2359-2367.
 45. Garcia-Segura LM, Lorenz B, DonCarlos LL. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction* 2008; 135:419-429.
 46. McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 2008; 88:91-124.
 47. Mores N, Krsmanovic LZ, Catt KJ. Activation of LH receptors expressed in GnRH neurons stimulates cyclic AMP production and inhibits pulsatile neuropeptide release. *Endocrinology* 1996; 137:5731-5734.
 48. Chu Z, Andrade J, Shupnik MA, Moenter SM. Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J Neurosci* 2009; 29:5616-5627.
 49. De Mees C, Laes JF, Bakker J, Smits J, Hennuy B, Van Vooren P, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C. Alpha-feto-protein controls female fertility and prenatal development

of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol Cell Biol* 2006; 26:2012-2018.

50. Gore AC. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29:358-374.

51. Wen S, Ai W, Alim Z, Boehm U. Embryonic gonadotropin-releasing hormone signaling is necessary for maturation of the male reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:16372-16377.

52. Robinson J. Prenatal programming of the female reproductive neuroendocrine system by androgens. *Reproduction* 2006; 132:539-547.

53. Gray LE Jr., Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guillette L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl* 2006; 29:96-108.

54. Khalaf H, Larsson A, Berg H, McCrindle R, Arsenault G, Olsson PE. Diastereomers of the brominated flame retardant 1,2-dibromo-4-(1,2 dibromoethyl)cyclohexane induce androgen receptor activation in the hep2 hepatocellular carcinoma cell line and the Incap prostate cancer cell line. *Environ Health Perspect* 2009; 117:1853-1859.

Revisiones

Rol de las metaloproteasas en la gestación e impacto de la diabetes materna

Role of matrix metalloproteinases during gestation and impact of maternal diabetes

Dres. Romina Higa¹, Daiana Fornes¹, Daniel Musikan²

¹ Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, CEFyBO, CONICET, UBA

² Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA

E-mail: rominabiga@gmail.com

Resumen

Durante la gestación, existe una dinámica reestructuración de tejidos maternos y fetales que requiere de la acción controlada de las metaloproteasas (MMP), enzimas proteolíticas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular. En ciertas gestaciones patológicas, la actividad de las MMP se encuentra alterada, lo que provoca complicaciones a lo largo de la gestación. En esta revisión analizamos la participación de las MMP durante la implantación, el desarrollo embrionario y fetal, la placentación y el parto, y la influencia de la diabetes materna sobre la actividad de las MMP en dichos procesos.

Palabras clave: metaloproteasas, gestación, diabetes.

Abstract

During pregnancy there is a dynamic restructuring of maternal and fetal tissues that requires the controlled action of matrix metalloproteinases (MMPs), proteolytic enzymes involved in extracellular matrix remodeling. In certain pathological gestations, the activity of MMPs is impaired, thus leading to complications during pregnancy. In this review, we analyze the involvement of MMPs during implantation, embryonic and fetal development, placentation and parturition, as well

as the influence of maternal diabetes on the activity of MMPs in these processes.

Key words: matrix metalloproteinases, pregnancy, diabetes.

Introducción

La matriz extracelular (MEC) fue considerada durante mucho tiempo sólo una "red" que brindaba anclaje y soporte mecánico a las células. Actualmente, se sabe que la MEC es una estructura compleja y dinámica que contiene factores de crecimiento, proteínas de unión y otras biomoléculas, como así también sitios de unión de moléculas de la superficie celular. La MEC interactúa constantemente con las células, éstas se unen y se separan de esta estructura secretando proteínas que modifican el microambiente de la MEC. Por ser una estructura dinámica, la MEC sufre procesos de remodelación en los que están involucradas las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP). Estas enzimas en conjunto son capaces de degradar todos los componentes de la MEC y durante su proceso de remodelación se liberan fragmentos y pequeños péptidos, muchos de ellos con actividad biológica, y se activan factores de crecimiento y biomoléculas atrapados en la MEC¹. Por lo tanto, se postula que las MMP son proteínas críticas en diversos