



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE REGULAN LA APOPTOSIS Y
LA PROLIFERACIÓN CELULAR DURANTE LA DIFERENCIACIÓN
SEXUAL HIPOTALÁMICA DE LA RATA”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A

M.V.Z. HÉCTOR ARMANDO HERRERA GUTIÉRREZ

TUTOR: DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES
ASESORES: DR. ENRIQUE CANCHOLA MARTÍNEZ
DRA. MARTA ROMANO PARDO
M. en C. MARCELA VERGARA ONOFRE

MÉXICO, D. F.

JUNIO DE 2002

La Maestría en Biología Experimental con el número de registro 309-0 de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa se encuentra dentro del padrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca-crédito otorgada número 153025

¡AGRADECIMIENTOS!

A LA DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES:

Por haberme guiado y comprenderme durante toda mi formación.

AL DR. ADOLFO ROSADO GARCIA:

Por su tiempo y dedicación.

A LA DRA MARTA ROMANO:

Por su comprensión y guía.

A LA M. EN C. MARCELA VERGARA ONOFRE:

Por su amistad, tiempo y ayuda incondicional en el acontecer diario del trabajo.

AL DR. ENRIQUE CANCHOLA MARTINEZ:

Por su ayuda a la realización de esta tesis.

AL DR. MARCO ANTONIO RODRIGUEZ MEDINA:

Por permitirme realizarme y guiarme en este camino del trabajo científico.

AL DR. HECTOR CASTILLO:

Por su valiosa colaboración en los análisis estadístico de esta tesis.

A LA DRA. IVONNE HUEZE:

Por su contribución e la aportación del material biológico.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS MIREYA, GERARDO Y HUGO:

Sin USTEDES esto no sería posible.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO:

Juanita, Alejandro, Israel, Celso, Ángel y Beatriz.

¡GRACIAS!

A DIOS:

Por ayudarme a encontrar mí camino.

AQUELLOS QUE NO ESTAN FÍSICAMENTE:

Gracias por estar presente en mi mente, cuidarme y llevarme por el camino del saber.

A MI ESPOSA Y COMPAÑERA:

Por su ayuda y comprensión en todo momento, por ayudarme a cumplir mis metas, por estar conmigo en todo momento y por su amor incondicional.

A MIS PADRES: HÉCTOR Y PATY:

Por permitirme realizarme y por su apoyo moral.

A MIS HERMANOS:

Sergio, Adis, Ale y Ani. Por soportarme, por su cariño y respeto.

**Y A TODOS AQUELLOS LOS QUE HICIERON POSIBLE LA
REALIZACIÓN DE ESTA META:**

Señores Juanita y Felipe; mis cuñados Francisco, Israel, Sergio, Alfonso, Martha
y Juan

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. HIPOTÁLAMO.....	2
2. DIFEERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA.....	3
3. NÚCLEOS DIMÓRFICOS EN EL HIPOTÁLAMO.....	9
3.1 Núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM).....	9
3.2 Núcleo supraquiasmático (NSQ).....	10
3.3 Área Preóptica.....	11
3.4 Amígdala.....	14
3.5 Estria Terminal (ST).....	14
4. FACTORES QUE REGULAN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA.....	15
4.1 Neurogénesis.....	16
4.2 Sinaptogénesis y crecimiento neuronal.....	17
4.3 Migración celular.....	18
4.4 Neuroprotección.....	19
4.4.1 El estradiol como neuroprotector.....	20
4.4.1.1 Efecto de neuroprotección del estradiol independiente de receptores citoplasmáticos.....	21
4.4.1.2 Efecto de neuroprotección por los esteroides mediado Por receptores citoplasmáticos.....	22
4.4.2 Receptores a estrógenos.....	24
5. APOPTOSIS EN EL SNC.....	26
6. JUSTIFICACIÓN.....	30
7. OBJETIVOS.....	30
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
9. RESULTADOS.....	39
10. DISCUSIÓN.....	44
11. BIBLIOGRAFÍA.....	48

ABREVIATURAS

1. μL .- Microlitros.
2. $^{\circ}\text{C}$.- Grados centígrados.
3. AKT.- Cinasa proteica B.
4. AMPc.- Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico.
5. AMPc-CREB.- Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc."
6. APO.- Área preóptica.
7. APV.- Área paraventricular.
8. ATD.- 1,4,6-adrostendiona-3.17-diona.
9. AVPV.- Área anteroventral paraventricular.
10. Bcl-2.- Célula de linfoma B.
11. BH.- Homologo de Bcl-2.
12. BNST.- Base del núcleo de la estría terminal.
13. BrdU.- Bromodeoxiuridina.
14. Ca^{2+} .- Calcio.
15. Caspasas.- Proteasas específicas de aspartato.
16. cDNA.- Ácido Desoxirribonucleico complementario.
17. c-fos.- Familia de Fos.
18. DAB.- Tetracloruro de diaminobencidina.
19. DE. - Desviación estándar.
20. DNA.- Ácido Desoxirribonucleico.
21. DSH.- Diferenciación sexual hipotalámica.
22. EGF.-Factor de crecimiento epidermal.
23. ER.-. Receptor a estrógenos.
24. ERE.- Elemento de respuesta a estrógenos.
25. Fos.- Oncogen activador de genes de división celular.
26. FSH.- Hormona folículo estimulante.
27. G2.- Final de la síntesis del DNA y principio de la mitosis.
28. GABA.- Ácido-Gama-Amino-Butírico.
29. GAP-43.- Proteína activadora de la GTPasa.
30. GnRH.- Hormona liberadora de Gonadotrofinas.
31. GTPasa.- Enzima que hidroliza a la guanosina-5'-trifosfato (GTP).
32. H_2O_2 .-Peroxido de hidrógeno.
33. IGF-I.- Factor de crecimiento insulinoide1.
34. JNK.- Cinasa-Jun-N-Terminal.
35. K^+ .- Potasio.
36. KDa.- kilodaltons.
37. LH.- Hormona luteinizante.
38. M.- Fase en donde se divide el núcleo y el citoplasma.
39. MAP.- Proteína activadora mitogénica.
40. MAPK.- Proteína activadora de cinasas-mitogénica.

41. Mg²⁺.- Magnesio.
42. MI.- Mililitro.
43. NEM.- N-etilmaleimida.
44. NGF.- Factor de crecimiento neuronal.
45. NM.- Nanomolar.
46. NMDA.- N-metil-D— aspartato.
47. NSQ.- Núcleo supraquiasmático.
48. NVM.- Núcleo ventromedial del hipotálamo.
49. P21.- Inhibe la actividad de las enzimas.
50. PBS.- Búfer de fosfatos y sales.
51. PCNA. Antígeno de proliferación celular.
52. PI3K.- Fosfoinositol-3-quinasa.
53. PoliA⁻.- RNAm no poliadenilado.
54. PoliA⁺.- RNAm adenilado.
55. ProGnRH-GAP.- Hormona liberadora de GnRH.
56. PT.- Propionato de testosterona.
57. RNA.- Ácido ribonucleico.
58. RNAm.- Ácido ribonucleico mensajero.
59. RNAhn.- Ácido ribonucleico heterógeno-nuclear.
60. SDA-POA.- Núcleo Dimórfico sexual del área preóptica.
61. SN.- Sistema Nervioso.
62. SANP-25.- Proteínas solubles de acoplamiento a NSF.
63. SNB.- Núcleo espinal bulbo cavernoso.
64. SNC.- Sistema Nervioso Central.
65. ST.- Estría Terminal.
66. T.- Tamoxifen.
67. T.- Tamoxifen.
68. TATA.- Secuencia consenso hepanucleóide de Timina y Adenina.
69. TGF- α .- Factor de crecimiento transformante.
70. TNF- α .- Factor de necrosis tumoral alfa.
71. TNF.- Factor de necrosis tumoral.
72. TNF_L.- Ligando del Factor de necrosis tumoral.
73. VDAC.- Canales de aniones dependientes de voltaje.

RESUMEN

La secreción de gonatropinas hipofisarias y la conducta sexual en los cordados, son funciones controladas por el hipotálamo, el cual se organiza irreversiblemente mediante la acción del medio hemócrino hormonal que presente en la etapa perinatal. La administración exógena de hormonas esteroides a ratas en el periodo neonatal, interfiere con el patrón de expresión del DNA, RNA y proteínas, induciendo cambios morfológicos y funcionales en hembras y machos durante el periodo crítico de la diferenciación sexual hipotalámica de la rata. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la participación de los procesos apoptóticos y de proliferación celular durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata, para lo cual se sexaron crías y fueron tratadas 1 h post-nacimiento de acuerdo al siguiente esquema hormonal: Un grupo control para ambos sexos, administrándoles subcutáneamente 50 μ l de aceite de girasol y dos grupos experimentales a los cuales se les administro 30 μ g de propionato de testosterona (PT) a ratas hembras y 200 μ g de tamoxifen (T) a ratas machos, los animales fueron sacrificados a diferentes horas postratamiento (1, 3, 6, 12, 24 y 48 hrs.). Las modificaciones inducidas en el parámetro de apoptosis, se midió a través de la proteína bcl-2 (que es una proteína antiapoptótica), que es un indicador del número de células que están previniendo su muerte y para cuantificar los niveles de proliferación celular se utilizó un marcador clínico para células en proliferación. El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), estos dos marcadores bcl-2 y PCNA fueron analizados a través de la técnica de inmunohistoquímica en el área preóptica (APO). Los resultados muestran que la administración neonatal de T y PT en ratas neonatales durante el periodo de diferenciación sexual hipotalámica, tienen un efecto de feminización y masculinización, se muestra en los resultados que las ratas macho controles y las hembras tratadas con PT no tiene diferencias significativas ($P < 0.05$), mientras que las ratas hembras controles no tienen diferencias con los machos tratados con T. En cuanto a los niveles de expresión de bcl-2 en el APO fue la siguiente: en los machos controles y hembras tratadas (PT) se incrementó significativamente el porcentaje expresión, llegando a más del doble de expresión a las 6 h postratamiento (46.8 ± 2.6 y 40.2 ± 2.8 respectivamente) al compararlo con las hembras controles y machos tratados (T) (18.6 ± 2.3 y 18.45 ± 3.0), además los niveles de bcl-2 en los machos control y hembras tratadas aumentan con relación al tiempo y en las hembras controles y machos tratados se presenta una disminución. En cuanto a la presencia de PCNA en el APO no se encontró que existiera un incremento tan marcado como el de bcl-2, pero si se presenta una mayor cantidad de células positivas a PCNA en los machos control y hembras tratadas.

En suma, el presente estudio utiliza la naturaleza dimórfica del área preóptica hipotalámica para determinar el efecto postnatal del tamoxifen y de la testosterona como tratamientos en ratas, tanto en machos como en hembras. En donde se establece el papel de la influencia hormonal durante el periodo postnatal temprano, y que este ambiente hormonal tiene un efecto en los indicadores relacionados con la proliferación y la muerte celular durante el periodo de diferenciación hipotalámica, determinando así características sexuales, en cuanto a la morfología y funcionalidad entre los machos y las hembras.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN) de machos y hembras presenta diferencias estructurales y funcionales que involucran estructura, número y tamaño de neuronas, cantidad de contactos sinápticos que determinan la identidad y preferencia sexual. Estas diferencias se establecen durante la vida intrauterina o en los primeros días después del nacimiento, etapa a la que se denominó periodo crítico de diferenciación sexual cerebral (Dörner, 1981), y estas desigualdades pueden determinar las diferencias sexo específicas. Estas diferencias tiene que ver con el tamaño o conformación de los diferentes núcleos cerebrales, esto se puede deber, al volumen o área que el núcleo ocupe, así como, a diferencias en número de células o densidad del núcleo. La mayoría de los circuitos dimórficos del cerebro son parte o están íntimamente relacionados al hipotálamo. El hipotálamo regula la secreción de hormonas representa una interfase anatómico-funcional entre el sistema nervioso y el sistema endócrino, y presenta la mayor concentración de receptores a hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona) del cerebro se encuentra en el hipotálamo (Pfaff y Schwartz-Giblin, 1988). El hipotálamo se conoce como el centro ejecutor de funciones homeostáticas del cuerpo, además de regular las hormonas (sexuales y no sexuales), regula patrones de hambre, sed, sueño, temperatura del cuerpo y conducta sexual. La estructura del hipotálamo es compleja, tanto en términos neuroanatómicos como neuroquímicos; este se puede subdividir en 4 reuniones y en más de 25 núcleos de acuerdo a criterios anatómicos y funcionales. Los núcleos dimórficos del hipotálamo son: el área preóptica, el núcleo ventromedial y el supraquiasmático. El desarrollo de dimorfismo a nivel hipotalámico en la conducta sexual y del patrón de la secreción de gonadotropinas en los mamíferos, es el resultado de la presencia, masculinización, o ausencia, feminización, de andrógenos o de su metabolito el estradiol, en el período crítico de diferenciación. Es de vital importancia el ambiente hormonal que presente el hipotálamo, ya que este ambiente hemócrino es necesario para que se lleve a cabo la organización del sustrato anatómico y fisiológico y de vías neuroendocrinas pre-existentes que determinarán las diferencias sexo específicas. El proceso de los cambios en el volumen y número de células neuronales durante la diferenciación no se conoce por completo (Nielsen et al., 2000). Se han encontrado diferencias sexuales en el índice de muerte celular en áreas dimórficas del hipotálamo (influenciado por hormonas esteroidales durante el período crítico) (Davis et al., 1996). También se puede relacionar este cambio de volumen a una proliferación celular, se ha encontrado en cerebro de rata factores de proliferación (antígeno nuclear de proliferación celular) hasta los 4 días de edad. (Iino y Chiba, 2000). La existencia de dimorfismo sexual en núcleos específicos del hipotálamo es el resultado de la presencia perinatal de andrógenos, por lo tanto es importante conocer si el desarrollo de áreas características para cada sexo son el resultado de la proliferación de las neuronas de esa área o bien impedir el proceso de la muerte de sus células.

1. HIPOTÁLAMO

El diencefalo se encuentra en su mayoría oculto entre los hemisferios cerebrales, este representa el 2% del peso total del sistema nervioso central. Tiene numerosas conexiones de áreas de importancia y la mayoría de las vías sensitivas, motoras vegetativas tienen sinapsis con el diencefalo. El diencefalo se divide convencionalmente en cuatro partes, cada una de las cuales incluye el término tálamo. Estas partes son el epitálamo, que incluye a la glándula pineal y algunas estructuras neuronales cercanas; el tálamo dorsal, que habitualmente se denomina simplemente tálamo; el subtálamo, metatálamo y el hipotálamo. La única parte del diencefalo que se puede ver en un cerebro integro es la superficie inferior del hipotálamo (Dietrichs y Haines, 1989)

El hipotálamo es importante como integrador de las vías relacionadas con funciones autónomas, endocrinas, emocionales y somáticas. La estimulación de áreas hipotalámicas induce vasodilatación, ira, conductas alimentarias, alteraciones en la función hipofisaria y reproductivas. Las conexiones del hipotálamo son extensas y complejas pero se pueden dividir en tres clases principales: 1) interconexiones con varios componentes del sistema límbico, 2) eferencias que influyen a la hipófisis y 3) interconexiones con varios núcleos viscerales y somáticos, tanto motores como sensitivos, del tronco del encéfalo y de la médula espinal (De Groot y Critchlow, 1960; Heller, et al., 1978).

El hipotálamo recibe información del sistema límbico y del tálamo, para la regulación de conductas emotivas e instintivas de los individuos, detectan características de la sangre, como su temperatura, presión osmótica y concentración hormonal. El hipotálamo tiene una íntima relación con la hipófisis. La superficie inferior del hipotálamo, está expuesta directamente al espacio subaracnoideo, está limitado por el quiasma óptico, las cintillas ópticas y el margen posterior de los tubérculos mamilares. Esta área, exclusiva de los cuerpos mamilares, recibe el nombre de *tuber cinereum*, la superficie medial del hipotálamo se extiende hasta la lámina terminal, por la parte superior hasta la cisura hipotalámica y por la parte posterior hasta el borde caudal del diencefalo (Swanson, et al.. 1963; Barr Kierman, 1956).

El margen anterior del hipotálamo, técnicamente es el plano que atraviesa el borde anterior del quiasma óptico y el borde posterior de la comisura anterior. Sin embargo, el tejido neuronal situado frente a este límite formal se continúa estructural y funcionalmente con el hipotálamo y es llamada área preóptica, considerada como parte del telencefalo, se considera funcionalmente como parte del hipotálamo anterior (Nauta y Haymaker, 1969; Nolten, 1994). El hipotálamo se divide o está organizado en una serie de núcleos y que son mencionados en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Núcleos hipotalámicos.

Región	Área medial	Área lateral
Anterior	Núcleo preóptico Núcleo supraóptico Núcleo paraventricular Núcleo anterior Núcleo supraquiasmático	Núcleo preóptico lateral Núcleo lateral Parte del núcleo supraóptico
Tuberal	Núcleo dorso medial Núcleo ventromedial Núcleo arciforme	Núcleo lateral Núcleos tuberales laterales
Posterior	Tubérculo mamilar Núcleo posterior	Núcleo lateral

(Nolten. 1994)

2. DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA

El sexo se ha definido como la suma de las características genéticas, morfológicas, fisiológicas y psicológicas que distinguen al macho de la hembra. La reproducción sexual asegura la continuidad de las especies; en los mamíferos la determinación del sexo comienza en el momento de la fertilización y continúa durante la diferenciación gonadal; sin embargo, el proceso de diferenciación no se limita únicamente a estos procesos, sino que también incluye centros nerviosos superiores del cerebro, proceso conocido como diferenciación sexual hipotalámica (Barraclough, 1967; Gorski, 1965; Davis et al., 1996). El período de diferenciación sexual (período crítico) en los mamíferos varía de especie a especie y ocurre de acuerdo al nivel de maduración de la zona hipotalámica, que puede ser: prenatal, perinatal y posnatal temprano (ver cuadro 2). En la rata se presentan diferencias importantes con relación al sexo, particularmente obedeciendo a modificaciones de la sensibilidad al estímulo hormonal de los esteroides gonadales específicos de cada género que actúen durante la diferenciación (Christensen y Gorski, 1978; Döhler, et al., 1986; Gorski, 1985). Ha sido establecido que, durante los últimos días de la gestación y los primeros días después del nacimiento, la presencia de hormonas gonadales, fundamentalmente andrógenos o estrógenos resultantes de la aromatización "in situ" de las hormonas androgénicas en algunas regiones del encéfalo de los mamíferos, es capaz de inducir la diferenciación anatómica de regiones específicas del sistema nervioso central. Esta diferenciación morfológica es, a su vez, la causa de un desarrollo diferencial que termina con el establecimiento de un funcionamiento dimórfico sexual en el adulto.

Incluyendo fundamentalmente el patrón de secreción de las hormonas gonadotropas, y consecuentemente de las hormonas gonadales, y la presencia de una conducta sexual característica de cada sexo. Para considerar el papel del hipotálamo en la reproducción es necesario realizar una división fundamental en los niveles en los que se encuentra involucrado. El hipotálamo participa en la reproducción a dos niveles: en los procesos regulatorios intrínsecos en donde están involucrados la hipófisis y las gónadas, que regulan eventos como: diferenciación hipotalámica, pubertad, gametogénesis, ovulación, conducta sexual, gestación y parto; así como, en los procesos extrínsecos donde se involucra a dos individuos de la misma especie y sus factores sensoriales de estimulación (genital, olfatoria, visual y vocal) (Barraclough, 1967; Gorski, 1985; Davis, et al., 1996). Dentro de los parámetros mejor estudiados, que representan el fenómeno de diferenciación sexual de una manera más clara, son por supuesto las que participan directamente en el fenómeno reproductivo, esto es: las hembras presentan fluctuaciones cíclicas notables en el patrón de síntesis y liberación de las hormonas gonadotropas, lo cual se refleja en cambios cíclicos en el aparato reproductor. Estos últimos fundamentan la ciclicidad en la síntesis y secreción de hormonas gonadales, en la maduración y ovulación, en la posibilidad de establecer el desarrollo de una gestación normal a partir del ovocito fertilizado y, desde luego, en la ciclicidad de la conducta sexual típica de la hembra. Todo este patrón cíclico en el funcionamiento reproductivo se encuentra ausente en el macho, en el cual, se encuentra una secreción tónica de las hormonas gonadotropas (Gorski, 1965; Castro-Vázquez, 1975).

Adicionalmente, se debe mencionar que algunos otros parámetros del funcionamiento cerebral han sido relacionados con la diferenciación sexual de este órgano, entre ellos: la regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal, (Nance, 1975, 1977), conducta agresiva (Barr, 1976), marcaje de territorio, postura de Micción (Beach, 1974), conducta social y de juego, conducta de aprendizaje y/o ejecución (Dawson, 1975), lateralización de las funciones cerebrales, especialmente en el humano (Hines 1982), el papel durante la cópula (Ehrhardt, 1978), actividad espontánea y la reacción a varios estímulos sensoriales (Beatty, 1979).

La diferenciación sexual de las funciones hipotalámicas relacionadas con el ámbito reproductivo se ha estudiado en diferentes especies de mamíferos, tales como: ratón, cuyo, criceto, oveja, mono rhesus y la rata (Gorski, 1965) (Cuadro2). En la rata se han estudiado de manera muy amplia dos procesos fisiológicos, la regulación del patrón de secreción de gonadotropinas y de la conducta reproductiva (Akmaeu, 1995). Se ha establecido que la diferenciación sexual del encéfalo, como la del aparato reproductivo, se debe a la ausencia o presencia de estímulos hormonales que tienen un efecto en el periodo crítico de la diferenciación sexual, es decir, que en ausencia de un estímulo hormonal el organismo tendrá un patrón inherentemente femenino, independientemente de su sexo genético o gonadal.

CUADRO 1. Relación entre el período de gestación y el periodo crítico de desarrollo en la diferenciación sexual del Sistema Nervioso Central.

Especie	Tiempo de gestación (días)	Período crítico (días después del nacimiento)
Rata	20 a 22	18 a 27
Ratón	19-20	Posnatal
Hámster	16	Postnatal
Conejo de Indias	63-70	30-47
Hurón	42	Postnatal
Perro	55-63	Pre y Postnatal
Oveja	145- 155	30-90
Mono Rhesus	146-180	40-60

(Goy y McEwen, 1980)

Gorski (1981, 1985) establecen, que la diferenciación sexual hipotalámica en roedores, presenta a los investigadores un sistema de estudio que ofrece la ventaja de la aparente independencia entre el tiempo de diferenciación del sistema reproductivo (gónadas), que ocurre de manera temprana, y el tiempo en que se realiza la influencia hormonal sobre el cerebro, el cual tiene lugar en un tiempo tardío, cercano al nacimiento o inmediatamente después de él. Esta disparidad en el tiempo de diferenciación permite la modificación experimental del proceso de diferenciación sexual del hipotálamo sin necesidad de modificar el desarrollo de los genitales (Arnold, 1984).

Como resultado de los experimentos de Pfeiffer (1936), comprobados y extendidos después por numerosos investigadores (Gorski, 1979; MacLusky, 1951; McEwen, 1981), se postuló que las ratas machos y hembras, tienen la capacidad de secretar tónicamente hormonas gonadotróficas durante el estado adulto, ante la ausencia de un estímulo hormonal en el periodo crítico de diferenciación. Sin embargo, si durante el período crítico de diferenciación sexual hipotalámica, que comprende desde unos pocos días antes del nacimiento hasta unos pocos días después, existen en el medio ambiente neuronal niveles elevados de hormonas esteroides, bajo condiciones normales testosterona por la presencia de testículos en el macho, entonces se inducirá una diferenciación de tipo masculino que tendrá como consecuencia la aparición de un patrón tónico de secreción de gonadotrofinas al llegar a la edad adulta. La ausencia de testículos, normal o inducida artificialmente, da como resultado la aparición de un patrón de secreción cíclico de gonadotrofinas en la hembra, sin que la ausencia o presencia de ovarios parezca tener ninguna importancia (Pfeiffer, 1936). En la rata hembra los estrógenos a nivel gonadal son más abundantes que en los machos, sin embargo, este no es capaz de ejercer sus efectos en el hipotálamo, porque se encuentra retenido por una alfa feto proteína, que es altamente específica para los estrógenos, en cambio la testosterona administrada exógenamente pasa al interior de las neuronas fácilmente para ser aromatizada a estrógenos y ejercer sus funciones (Toren-Alleran, 1984).

En la rata, el período crítico de sensibilidad neuronal a hormonas esteroidales se presenta durante el período neonatal temprano, extendiéndose, con algunas fluctuaciones, desde el nacimiento hasta el día ocho de vida extrauterina, mostrando el animal mayor susceptibilidad entre los días 3o. y 5o. después de nacido (McLare, 1972; Goy, 1980). Recientemente se ha precisado que existen en la rata dos períodos críticos que coinciden con importantes picos de secreción de testosterona por los testículos fetales. De estos, uno ocurre alrededor del día 18 de vida intrauterina (Weiz, 1980) y el otro a las dos horas después del nacimiento (Goy, 1980; Rhoda, 1984).

Se acepta de manera General que las diferencias sexo-específicas en la fisiología sexual y reproductora en los roedores, y en otras especies de animales, es debida a la diferenciación sexual de los substratos neuronales, agrupaciones celulares y enlazamientos dendríticos, que regulan la actividad hipofisiarias y la conducta sexual. El concepto de la existencia de centros neuronales “reproductores”, es decir, específicamente relacionados con la fisiología reproductiva, obedece a que ciertas áreas neurales susceptibles a la presencia de hormonas gonadales, son indispensables para la liberación cíclica de LH (Hormona Leutinizante) y FSH (Hormona Folículo Estimulante) en la hembra y tónica en los machos, así como, la expresión de la conducta sexual en ambos sexos. Estos hechos llevaron a proponer que durante el desarrollo perinatal de los animales, la presencia de hormonas esteroides son capaces de propiciar una modificación en la organización anatómica y funcional de los circuitos neuronales (etapa organizadora), que participan en la regulación de la función neuroendocrina en el animal adulto (etapa activadora) y durante la edad adulta las hormonas tienen la función de activar, modular o inhibir selectivamente la funcionalidad de los circuitos neuronales previamente ya diferenciados (etapa funcional) (Gorski, et al., 1980; Pfaff, 1980, Rhees, et al., 1990).

Numerosas investigaciones han presentado evidencia de la existencia del dimorfismo sexual en la estructura y funcionalidad del cerebro (Pfaff, 1980, Goy, 1980; Gorski, 1983, Lustig, 1993), señalando la presencia de diferencias morfológicas, neuroquímicas y fisiológicas, así como la existencia de circuitos neuronales sexualmente específicos que van a formar parte de las bases somáticas que podrían explicar la importancia de la participación de la función cerebral en el mecanismo reproductivo de los animales (Cuadro 3).

Los esteroides gonadales, principalmente los estrógenos, participan activamente en la regulación de muchas funciones cerebrales y se ha descrito la presencia de células con receptores estrogénicos específicos en numerosas regiones del encéfalo (Pelletier, 1985). Particularmente en el hipotálamo, se ha descrito la eficiente capacidad de los estrógenos para inducir la síntesis de varias especies de proteínas importantes, entre ellas las llamadas proteínas reguladoras PR y c-fos, algunas enzimas que son pasos limitantes en caminos metabólicos indispensables para el buen funcionamiento del hipotálamo, como la tirosina hidroxilasa, la síntesis de algunos otros neurotransmisores, como la neurotensina y la neuromedina, la somatostatina, la hormona liberadora de la GnRH (proGnRH-GAP), la proencefalina, así como la síntesis de varios receptores, entre ellos el receptor a la

oxitocina, a la progesterona y, probablemente, a los andrógenos, así como también, la existencia de un aumento en la síntesis de RNAm de ratas hembras (Law, et al., 1994). A este respecto es importante mencionar los resultados obtenidos por Law y col. (1994), quienes encontraron que el estradiol provocó la activación de genes hipotalámicos en la rata hembra ya que se alcanzó una cifra record de RNA mensajeros. Esta cantidad de nuevos RNAm inducidos constituye una cifra record para cualquier otro tipo de tejido o cualquier tipo de hormona. Entre los genes activados, varios correspondieron a la producción de enzimas importantes en el metabolismo celular y pueden fácilmente explicar algunos de los cambios morfológicos observados en las neuronas hipotalámicas estimuladas por esta hormona (Sisk, 1995).

Cuadro 3. Características del dimorfismo sexual hipotalámico

1. Tamaño del llamado núcleo dimórfico sexual de la región preóptica (SDN-POA), que es mayor en el macho (Gorski 1978; Carrer y Aoki, 1982).
2. Tamaño nucleolar, diferencias dimórficas en el núcleo supraquiasmático, siendo aproximadamente dos veces más grande en la hembra (Dömer, et al., 1968; Dörner y Hinz, 1975; Robinson, et al., 1986).
3. Número de células y tamaño individual de las neuronas en todo el hipotálamo es mayor en los machos (Arnold y Gorski, 1984; Hammer y Jacobson, 1984).
4. Conectividad sináptica en los núcleos ventromedial y arqueado del hipotálamo, siendo mayor la densidad sináptica en la hembra que en el macho (Raisman y Field, 1973; Matsumoto y Ari, 1986; Lusting, et al., 1993).
5. Modelos de respuesta funcional en las neuronas (Brown, et al., 1988).
6. Diferencias en el desarrollo dendrítico del área preóptica y que este desarrollo es mayor en el macho (Greenough, et al., 1977).
7. La distribución de neuronas, fibras nerviosas y los niveles de recambio de los neurotransmisores, particularmente en su acción sobre los sistemas monoaminérgicos (Pelletier, et al., 1988).
8. Diferencias significativas en el número de sinapsis en los núcleos dimórficos (Raisman y Field, 1973).
9. Actividad enzimática del hipotálamo es mayor en el macho que en la hembra (Griffiths y Hooper, 1976; Negri-Cesi y col. 2001)
10. Actividad de las enzimas relacionadas con marcadores coJinérgicos (Lustig, et al., 1993).
11. Diferencias en el papel desempeñado por las neuronas peptidérgicas y los receptores neuropeptídicos en los procesos de diferenciación (Harbungen y Openheim, 1982 Alexander, et al., 1991).
12. La presencia de otros núcleos hipotalámicos dimórficos, distintos a los señalados por Gorski y su grupo, a saber, la parte ventrolateral del núcleo ventromedial y el núcleo arqueado (Rainbow, et al., 1982).
13. La cromatina unida puede mostrar diferencias entre los sexos, en células que constituyen los núcleos dimórficos (Luine y McEwen, 1983).
14. Diferencias en la concentración y distribución de calmodulina, en donde es mayor la concentración en el macho (Rodríguez, et al., 1998)

Investigaciones realizadas por Rodríguez y col. (2001), muestran que, en el caso de los machos normales, las principales modificaciones en la síntesis de proteínas específicas ocurren de manera muy temprana después del nacimiento, mientras que en las hembras estos cambios ocurren un poco más tardíamente, entre las 7 y las 12 horas post-nacimiento.

En la actualidad, se sabe que el tejido nervioso y particularmente el de los roedores, contiene consistentemente un porcentaje muy alto de RNAm no poliadenilado que es equivalente en su complejidad a la población de RNA Poli(A)+ y cuyas secuencias de bases no parecen ser similares (Chikaraishi, 1979; Van Ness, 1979; Dokas, 1983). Cuando Chikaraishi en 1979, estudio los productos de traducción de los dos diferentes tipos de mensajeros por medio de electroforesis bidimensional, encontró que las proteínas de mayor abundancia sintetizadas por ambos tipos de RNAm eran similares, siendo una de las más abundantes la β -actina. Sin embargo, la mayoría de las proteínas sintetizadas utilizando como templado el RNAm Poli(A)- fueron características de este sistema de conducir información y no se encontraron entre las proteínas sintetizadas a partir del RNAm. Poli(A)+.

Se ha considerado, que existen RNAm que se encuentran presentes en dos formas: mensajeros poli A+ y poli A-. Estos dos tipos de mensajeros pueden llevar la información requerida para inducir la síntesis de un mismo producto o iso-producto, como ocurre con los mensajeros de histonas y beta-actinas (Van Ness, 1979). Ambos poli A+ y Poli A- son heterodispersos en tamaño, reportados en cultivos de células Hela, por lo que se ha sugerido que puedan ser homólogos con respecto a su composición secuencial, ya que ambos codifican para caseína, globina, protaminas, histonas, activas. Sin embargo se ha observado, que muchas de las secuencias presentes en los RNAhn poli A-, no están presentes en las secuencias de los RNAhn poli A+ (Hahn, 1979). Estas diferencias en la presencia de secuencias que podrían indicar que los mensajeros Poli A-, juegan un papel importante en la síntesis de proteínas específicas en períodos determinados y cuya expresión durante los procesos de diferenciación sexual, ocasiona modificaciones permanentes en la estructura de los núcleos involucrados así como de sus sinapsis con el resto del sistema nervioso, relacionadas con la diferenciación sexual (Van Ness, 1979).

De particular importancia en la complejidad del patrón de mensajeros cerebrales es la presencia en este tejido de una considerable proporción de mensajeros no poliadenilados. Con algunas excepciones bien identificadas en tejidos diferentes al tejido nervioso, se ha restringido la presencia de RNAm no poliadenilado (Poli A-) al RNAm que codifica para las histonas y algunas otras proteínas estructurales como la actina. Kaufmann y col. (1977), mencionan que aunque es posible encontrar mensajeros no poliadenilados en diferentes tejidos, en general, estos sólo constituyen un pequeño porcentaje de la concentración total de RNAm y debe ser considerado, estrictamente, como una subpoblación derivada del metabolismo del Poli(A)+ RNAm.

Se sabe que la mayor cantidad de RNAm Poli(A)- aparece en el tejido cerebral de manera post-natal y que el número, variedad y complejidad de esta población de mensajeros aumenta con la edad, alcanzando un máximo a los 30-45 días después del nacimiento (Chaudhari, 1983). A pesar de que este tipo de mensajeros ha sido utilizado en la generación de cDNA su función específica es todavía desconocida y las proteínas que son modificadas por este importante material genético no han podido ser caracterizadas en su totalidad (Milner, 1987). En relación a estos puntos es importante discutir la evidencia reciente de que algunas hormonas esteroides no solo funcionan como inductoras de mensajeros específicos a nivel nuclear, sino que también tienen una función como reguladoras de la estabilidad y la degradación de un número importante de RNA mensajeros (Gorlach, et al., 1985; Nielsen y Shapiro, 1990). Estos hallazgos hacen particularmente importantes las diferencias en la proporción de RNA mensajero, que

parece ser característica de hembras y machos durante las horas iniciales después del nacimiento, sobre todo porque el patrón característico de cada sexo tiende a ser modificado por el tratamiento hormonal, a manera de semejar el sexo contrario, siendo esta una evidencia clara del papel que tiene las hormonas esteroidales en el ambiente hemócrino, sobre la constitución macromolecular de las células hipotalámicas (Nielsen y Shapiro, 1990).

Se acepta de manera general que las diferencias sexo-específicas en la fisiología sexual y reproductora en los roedores, y en otras especies animales, es debida a diferenciación sexual de los substratos neuronales, agrupaciones celulares y alargamientos dendríticos, que regulan la actividad hipofisarias y la conducta sexual. El concepto de la existencia de centros neuronales “reproductores”, es decir, específicamente relacionados con la fisiología reproductiva obedece a la demostración de que ciertas áreas neuronales susceptibles a la presencia de hormonas gonadales, son indispensables para la expresión de la conducta sexual y fisiología reproductiva, por ejemplo, la liberación de hormonas en hembras y machos (Gorski, et al, 1980; Pfaff, D., 1980; Gorski, R., 1985).

El dimorfismo neuro-anatómico ligado al sexo debe entonces ser relacionado con las diferencias en las funciones cerebrales relacionadas con el componente neuroendocrino de la actividad sexual. En el hipotálamo se presentan diferentes núcleos que muestran dimorfismo sexual en la rata y que pueden relacionarse con la fisiología y la conducta reproductiva, estos núcleos son el núcleo ventromedial, el núcleo supraquiasmático y el núcleo preóptico (Goy y McEwen, 1950; Robinson, et al., 1986; Döhler, et al., 1986).

3. NÚCLEOS DIMÓRFICOS EN EL HIPOTÁLAMO

3.1 Núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM)

Este núcleo regula la conducta sexual de las hembras (Davis, et al., 1979; Pfaff y Sakuma, 1979). En ratas, las hembras expresan receptividad sexual por medio de una respuesta refleja que se conoce como lordosis, esta conducta de receptividad sexual se expresa con niveles altos de hormonas sexuales del macho. El caso de dimorfismo sexual en el NVM es interesante porque no se debe a diferencias de tamaño o de densidad del núcleo sino a la complejidad estructural de las neuronas. Las neuronas se comunican entre sí por medio de señales químicas (neurotransmisores) a través de contactos especializados conocidos como sinapsis. En el NVM, la densidad sináptica es mayor en el macho que en hembras (Millery Aoki, 1991). Y del número de contactos sinápticos en la hembra varía a través del ciclo estral (Cohen y Pfaff, 1992). Por lo tanto el dimorfismo del NVM está claramente controlado por las hormonas sexuales, y en el caso de la hembra es regulado a lo largo de los ciclos hormonales, el caso de primates hembras, la actividad neurofisiológica del NVM está regulada por el acto sexual (Oomura, et al., 1989). Morfológicamente, 30% de las neuronas pertenecientes al núcleo ventromedial del hipotálamo respondieron a la estimulación con estrógenos mostrando un aumento significativo en todos los componentes celulares, núcleo, nucléolo y soma celular un

incremento notable en la cantidad de retículo endoplásmico y en el número de polirribosomas, indicadores de una aceleración en el metabolismo celular y particularmente en la síntesis de proteínas (Carrer. 1982). Las hormonas sexuales parecen participar en el crecimiento neurítico y en la sinaptogénesis de las regiones cerebrales que muestran receptores específicos para estas hormonas, sobre todo en la etapa prenatal, aunque también se ha referido esta actividad remodeladora de la sinapsis en algunas regiones del cerebro adulto, tales como el núcleo arqueado y el ventromedial del hipotálamo (Lustig. 1993; Law, et al., 1994).

3. 2 Núcleo supraquiasmático (NSQ)

El NSQ regula los ritmos cíclicos o ritmos circadianos del cuerpo. Este núcleo genera y coordina ritmos hormonales, fisiológicos y conductuales con una periodicidad de 24 horas. Se ha encontrado que el NSQ difiere entre hembras y machos (Swaab, et al., 1985) El impacto funcional de este tipo de dimorfismo no se ha determinado. Se ha sugerido que la forma del circuito neuronal pudiese depender del tipo de conexiones (aférentes y eférentes) que éste establezca con otros circuitos. En roedores de la pradera, se ha demostrado que la vasopresina (se encuentra en mayor cantidad en machos), media conductas asociadas a la reproducción: agresividad, territorialidad, monogamia y conducta paternal. La vasopresina aumenta todas estas conductas exclusivamente en machos (Young. et al., 1998). En el caso de animales de laboratorio se ha establecido que el NSQ también está asociado con la conducta sexual. Sördersten y col. (1981) determinaron que la amplitud de los ritmos circadianos en conducta sexual es mayor en ratas tratadas con anti- estrógenos durante el periodo neonatal. De igual modo, si se administran anti-estrógenos durante el periodo prenatal y postnatal, se ve un aumento del 59% de las neuronas que contienen vasopresina en el NSQ, así como conducta “heterotípica” en ratas, Si el tratamiento con anti-estrógenos se limita al periodo prenatal no se observan estos cambios (Swaab, et al., 1995). En términos de conducta sexual, Krujiver y col. (1993) lesionaron el NSQ en ratas machos para determinar si expresaban conducta “heterotípica” pero no se encontró tal efecto. Se ha observado que ratas tratadas con anti-estrógenos expresan conducta “bisexual” en el principio del ciclo nocturno y conducta “heterosexual” a finales de este ciclo nocturno, lo cual continúa apuntando al bNSQ como importante en la expresión de la conducta sexual, al menos en ratas (Bakker, et al., 1993). Esto implica que el dimorfismo del NSQ está bajo control de las hormonas sexuales y que factores postnatales juegan un papel importante en establecer este dimorfismo, al igual que en el área preóptica.

3.3 Área Preóptica

Para nosotros es particularmente importante el Núcleo dimórfico sexual del área preóptica (APO) del hipotálamo de la rata. Debido a que esta región se ha considerado el sitio donde probablemente reside el mecanismo de regulación diferencial de las características dimórficas relacionadas con el sexo, incluyendo el control de la conducta sexual y la liberación cíclica de gonadotrofinas y el mecanismo necesario para la ovulación (Gorski, et al., 1980; Montano, 1995).

El área preóptica es un área densamente poblada de neuronas. La densidad neuronal en esta región es varias veces más grande que otras regiones cercanas. En base a esto, Gorski y col. (1980), definieron esta área como un núcleo, el núcleo dimórfico sexual del área preóptica (SDN-POA). La importancia de éste núcleo reside en el hecho que se ha observado que en animales adultos es 3 a 6 veces más grande en machos que en hembras. Los resultados obtenidos mediante la provocación de lesiones, así como también los observados como consecuencia de la acción directa de implantes de esteroides en el área preóptica de neonatos hembra, han demostrado de una manera bastante clara el papel que este núcleo desempeña en el establecimiento de la conducta y fisiología reproductiva específica de la rata (Montano, 1995).

Aunque las neuronas del SDN-POA son capaces de acumular esteroides más rápidamente, que las neuronas situadas en otros núcleos cercanos, el volumen de este núcleo no parece ser sensible a la acción de los esteroides gonadales en el adulto. Así, el tratamiento de adultos gonadectomizados, tanto hembras como machos, con hormonas esteroides exógenas, restaura la conducta copulatoria tanto masculina como femenina, sin modificar el tamaño del SDN-POA. Por otro lado, se ha observado que los esteroides si son capaces de modular la morfología neuronal en los pájaros adultos, así como el aspecto morfológico del núcleo dimórfico demostrado en la espina cordal de la rata, es decir el llamado núcleo dimórfico espinal bulbo cavernoso (SNB) (Oomura, et al., 1988).

El SDN-POA es un área importante en el estudio de la diferenciación sexual, porque las diferencias sexuales en el volumen del SDN-POA quedan definitivamente establecidas durante la primera semana de vida postnatal, de manera casi simultánea al periodo en que también queda asentada la diferenciación sexual funcional del cerebro. Aunque el núcleo es claramente demostrable en el día 19 después de la fertilización, no presenta diferencias sexuales significativas en su volumen, sino que presenta alteraciones en su dimensión en un período que va del parto hasta 72 horas después de este. Aunque al nacimiento el volumen del núcleo SDN-POA es casi el doble en las hembras, durante los siguientes 10 días hay un incremento gradual en el volumen del SDN-POA de los machos, mientras que no hay cambios significativos en el tamaño del núcleo de la hembra (Jacobson, 1980). Esta diferencia en el patrón de crecimiento es el resultado de las hormonas de origen testicular que actúan en el macho (Lauber, et al., 1996; Hutchison, et al., 1999).

Como ya se hizo mención el crecimiento del SDN-POA, inducido inicialmente por la presencia de esteroides, parece realizarse durante los primeros 10 días de vida postnatal. Sin embargo, la maduración neuronal de hembras y machos en el área preóptica, en

términos de conectividad dendrítica, se prolonga hasta la 3a semana de desarrollo postnatal. Se ha propuesto que el establecimiento de las conexiones neuronales del SDN-POA deben continuar después de la terminación del período crítico para la organización funcional definitiva de este núcleo. Esto no es incompatible con el hecho de que los esteroides actúan únicamente durante el período 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 requerirán posteriormente para el adecuado funcionamiento neuronal (Raciman y Field, 1973; Lawrence y Raisman, 1980).

El SDN-POA empieza su desarrollo durante la vida fetal tardía, y depende enormemente de las características del ambiente hormonal durante el periodo de diferenciación sexual. El tratamiento perinatal de ratas hembras con andrógenos aromatizables, o con estrógenos, incrementa el volumen del SDN-POA, mientras que la castración de las ratas macho reduce el volumen de este núcleo. Aunque se ha descrito que algunas hormonas esteroides son capaces de modificar la estructura de algunos núcleos encefálicos durante la edad adulta, el ambiente hormonal parece no ser capaz de alterar el volumen del núcleo dimórfico del Área Preóptica en el animal adulto, independientemente del sexo de los animales que hayan sido tratados hormonalmente.

Los estrógenos regulan el desarrollo, crecimiento, diferenciación y función de las células blanco del SNC de hembras y machos (Pfaff y Keiner, 1973; Brown, et al., 1988). Para comprobar que los estrógenos llevan a cabo este proceso de diferenciación sexual, se llevaron a cabo estudios en donde se han utilizado antiestrógenos como el tamoxifen. El tamoxifen fue desarrollado como un agente terapéutico para el cáncer de mama y de útero (Gottardis y Jordan, 1987); ha sido demostrado que el tamoxifen en el organismo adulto se une a receptores estrogénicos intracelulares, evitando que estos sean ocupados por el estradiol. El tamoxifen actúa en forma similar en el organismo en desarrollo (Döhler, 1984), el tamoxifen impide que se forme el complejo receptor-estrógenos, de esta manera, en presencia de tamoxifen, los estrógenos no serán capaces de interactuar con sus receptores específicos intracelulares y consecuentemente no podrán tener ninguna actividad sobre la síntesis de macromoléculas en el núcleo de las células blanco (Watanabe, et al., 1997). El tratamiento postnatal con tamoxifen interfiere con el crecimiento y diferenciación del SDN-POA, esto se ha comprobado por la reducción entre un 26 y 40% en el volumen del SDN-POA en ratas machos a los cuales se aplicó de 10 - 100 µg de tamoxifen. En hembras se ha visto que el tratamiento postnatal con tamoxifen induce esterilidad anovulatoria en forma permanente, en la hembra, además de la reducción en el volumen del SDN-POA (Döhler, 1984a).

El efecto inhibitorio del tamoxifen en la vida postnatal sobre el desarrollo y diferenciación del SDN-POA en ratas macho parece deberse a su actividad sobre dos puntos claves del metabolismo hormonal del hipotálamo, ya que tiene un efecto inhibitorio sobre la aromatasa, impidiendo la aromatización de los andrógenos testiculares a estrógenos y fundamentalmente, interfiriendo con la subsecuente interacción de estos estrógenos con el material nuclear (Döhler, 1984b).

El efecto de los antagonistas estrogénicos sobre las funciones sexuales cerebrales, podría atribuirse a una posible actividad estrogénica de estos compuestos (Arnold, 1984).

Sin embargo, se ha visto, que los estrógenos perinatales estimulan la diferenciación del SDN-POA en ratas hembras, mientras que el tamoxifen inhibe su diferenciación en el macho, por lo cual parece claro que el tamoxifen no tiene un efecto estrogénico sobre la diferenciación del SDN-POA (Döhler, 1984b).

La administración de tamoxifen puede tener influencia sobre el desarrollo y la diferenciación del SDN-POA, por tener una acción directa sobre los receptores a hormonas esteroidales del sistema nervioso central (SNC). Según estudios realizados por Döhler (1986), en los cuales ratas hembras gestantes fueron tratadas con tamoxifen a dosis de 200 µg diarios a partir del día 16 de gestación hasta el momento del parto, a las crías se les sometió a un tratamiento durante 10 días, en los cuales, se les administró 10µg de tamoxifen, este tratamiento pre y postnatal de las ratas machos, da como resultado una reducción en el peso corporal y testicular, pero no tuvo influencia en el peso del cerebro. Los testículos de estos animales fueron pequeños y flácidos, y en la edad adulta, no mostraban la presencia de espermatozoides. Según investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, muestran que, una sola dosis de tamoxifen aplicada a las 2 horas post-nacimiento, es capaz de provocar un retardo pequeño, pero evidente, en el crecimiento ponderal de los machos después de 48 horas de la aplicación del fármaco. Este efecto no fue encontrado en las hembras, en donde se observa un crecimiento que no es estadísticamente diferente del registrado en el caso de las hembras controles de los grupos estudiados (Rodríguez, et al., 1998).

Se han descrito cambios en la distribución de RNA del cerebro de rata en especial en el área preóptica e hipotalámica (Mouri-Yamada, 1994). Mouri-Yamada describe que los niveles de RNAm aumentan en dos ocasiones: el primer aumento claro ocurre en la etapa embrionaria (18-20 días de gestación) y el segundo después del nacimiento, alcanzado en este caso el máximo nivel a los 2 días, a este último aumento sigue una notable disminución en los niveles de RNAm que comprende 4 a 8 días postnacimiento en las ratas hembras. En estudios realizados por Vergara (2001) en nuestro laboratorio, la máxima concentración de RNAm ocurre en las hembras alrededor de las 12 horas después del nacimiento y es seguido de una notable disminución que continúa hasta las 48 horas. La situación es totalmente diferente en el macho, en este caso la concentración de RNAm es prácticamente invariable desde una hora post-nacimiento hasta las 48 horas, existiendo una mayor concentración comparado con las hembras, inmediatamente después del nacimiento (Chong, 1995 y Vergara, et al., 2001).

Recientes evidencias parecen apoyar la idea de que el individuo que se diferencia activamente es el femenino, o bien que, por lo menos, los dos sexos deben ser susceptibles a efectores característicos. Por ejemplo, Don Carlos y Handa (1994) estudiaron la expresión del RNA mensajero que es codificado para el receptor estrogénico en el área preóptica de la rata recién nacida encontrando que: a) el gen que codifica para la síntesis del mensajero es transcrito activamente durante todo el periodo neonatal. b) existe un evidente dimorfismo sexual en la expresión del mensajero el cual presenta las siguientes

características: la cantidad de RNAm para el receptor estrogénico es mayor en las hembras que en los machos en los días 2, 4 y 7 después del nacimiento. La densidad de hibridación fue 2 a 3 veces mayor en las hembras que en los machos, mientras que la cantidad de este mensajero en el área preóptica se mantuvo constante durante el periodo estudiado en los machos, las hembras presentan una elevación en la expresión del gen en el día 2 de la vida extrauterina, seguida de un descenso hasta su nivel más bajo en el día 10. Vito y col (1982), estudian la fijación de estrógenos en bloques del hipotálamo y del área preóptica, se ha encontrado un rápido aumento en la fijación del esteroide entre los días 2 y 4 después del nacimiento, que era, aparentemente, de la misma magnitud en ambos sexos o mayor en el macho que en la hembra.

Otras áreas que presentan dimorfismo entre hembras machos fuera del hipotálamo son: la amígdala, estria terminalis.

3.4 Amígdala

La amígdala medial es 85% mayor en machos que en hembras (Hines, et al., 1992). La amígdala es considerada como el centro de las emociones y regulador de reacciones de agresividad, miedo y ansiedad. La amígdala al igual que el hipotálamo se subdivide en varios sub-núcleos por criterios anatómicos y funcionales. La porción anterior de la amígdala corticomedia aumenta receptividad en ratas hembras, mientras que, la porción posterior del núcleo lateral reduce receptividad (Masco y Carreer, 1980). En contraste con el NVM, se cree que la amígdala no regula directamente respuestas lordóticas en las hembras, sino que, contribuye a la motivación o excitación sexual. En el caso de las ratas machos esta posibilidad es más clara ya que se ha demostrado que la amígdala medial contribuye a la excitación sexual (evidenciándolo por la erección) sin contacto sexual (Kondo, et al., 1997).

3. 5 Estria Terminal (ST)

La ST es la conexión eferente principal de la amígdala (Seller y Smith, 1982). La ST se puede dividir en varias regiones. La porción base de la ST (bed nucleus of the stria terminalis, BNST) es 97 % más grande en volumen en machos que en hembras (Hines, et al., 1992). En ratas, la lesión del BNST altera la secuencia de copulación en machos, los machos aumenta la cantidad de penetraciones antes de lograr la eyaculación y en casos severos, no logran la eyaculación, a pesar de otros aspectos del repertorio sexual no aparecen ser alterados (Claro, et al., 1995). En otro estudio, se demostró que en animales con lesiones en el BNST no logran una estimulación sexual (Liu, et al., 1997).

4. FACTORES QUE REGULAN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA

De acuerdo a todo lo mencionado anteriormente podemos concluir que los estrógenos son los responsables de la organización del funcionamiento neuroendócrino y consecuentemente la conducta sexual, mediante la modificación de las intercomunicaciones entre las neuronas que participan en la regulación de estos procesos. La participación de los estrógenos en los procesos de diferenciación sexual ha quedado bien establecida por los siguientes experimentos: la castración neonatal, la administración sistémica de 1,4,6- androstriene-3,17-dione (ATD) un inhibidor competitivo de la aromatasa (McEwen, et al, 1979), la aplicación de tamoxifen (Hutchinson, et al., 1996) o la administración intracerebral de oligonucleótidos anti-sentido contra el receptor citoplasmático para estrógenos (Gorski, R., 1985). Todos estos tratamientos experimentales modifican el número de neuronas (Williams y Herrup, 1988) y/o la densidad sináptica de los núcleos dimórficos mencionados, así como el desarrollo normal de la conducta y fisiología reproductiva de la rata.

Se ha propuesto que el establecimiento de las conexiones neuronales de áreas dimórficas deben continuar después de la terminación del período 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 período 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 (Lawrence y Raisman, 1980; Williams y Herrup, 1988; García-Segura et al., 1994; Woolley, 1998). Los esteroides pueden influir en la determinación del número de neuronas que componen los núcleos dimórficos. En resumen se puede sugerir cinco posibles mecanismos:

1. Los esteroides pueden estimular la neurogénesis o prolongar el período en el que ocurre la neurogénesis.
2. Los esteroides pueden modular la migración de neuronas recientemente formadas a la región del APO.
3. Los esteroides pueden promover la supervivencia neuronal, por medio de una neuroprotección, durante el período crítico de diferenciación.
4. Los esteroides pueden modular el reconocimiento de la superficie celular sobre los sitios de inmovilización migratoria de las neuronas, determinando la agregación de las neuronas en el APO.
5. También pueden influir sobre la localización neuronal, en términos de funcionalidad o identificación neuroquímica.

4.1 Neurogénesis.

Datos publicados por varios autores, indican que el tiempo durante el cual se realiza la neurogénesis del APO medial de la rata, es fundamentalmente, alrededor del día 16 después de la concepción (Gorski, 1978; Altman y Bayer, 1978; Goldstein et al., 1990). La administración de Tiamidina tritiada a hembras en diferentes días de gestación, seguida del sacrificio de sus crías 30 días después, demuestran por medio del análisis autoradiográfico de los cerebros (Bernstein et al., 1989) que la neurogénesis en el APO media cesa, en general, a los 16 días de gestación. Sin embargo, la neurogénesis de aquellas neuronas que forman el APO fue más prolongada, observándose que continúa hasta el día 20 después de la concepción. El grupo de Jacobson (1981), encontró dos diferencias importantes dependientes del sexo de la cría en la neurogénesis del APO, cuando la inyección de Tiamina- 3H se realiza en el día 14 de la gestación, el índice de la marca del APO es inicialmente mayor en las hembras que en los machos. Esta diferencia sexual se revierte a los 17 días de gestación (Bernstein et al., 1989), momento que coincide con la presentación del primer pico de secreción de testosterona durante el desarrollo embrionario (Döhler et al., 1986; Matsumoto y Arai, 1986). Sin embargo, estos resultados deben de ser considerados con cuidado, ya que en estos trabajos las ratas fueron sacrificadas hasta el día 30 de vida extrauterina, por lo que los resultados pueden ser modificados por otros factores diferentes a la neurogénesis propiamente dicha, tales como la migración y la sobrevivencia. Otros experimentos realizados en el área preóptica de la rata, usando marcadores como la bromodexosiridina (BrdU), un análogo de la timina, y un anticuerpo específico a BrdU, para células que se encuentran en proliferación, estos fueron administrados en ratas durante los días 13 y 18 de la gestación, indicando, que en las crías el proceso de neurogénesis ocurre durante este lapso de la gestación (Nishizuka, et al., 1993).

En la rata adulta se conoce el efecto de los estrógenos sobre las síntesis de RNAm específicos, particularmente aquellos relacionados con la sinaptogénesis. Se ha demostrado recientemente diferencias sexuales en la génesis de células hipotalámicas de cerebros adultos de machos y hembras bajo control hormonal, que lleva a una desfeminización una masculinización, las hembras exhiben un mayor número de células nuevas en el área ventricular y no es así en el área paraventricular y el núcleo ventral, donde no existieron diferencias estadísticas, sugiriendo que los estrógenos regulan una alta actividad mitótica, mientras que, las células en proliferación en el área preóptica se ven correlacionadas con la edad, es decir, que los estrógenos en el APO tiene un mayor efecto durante el periodo crítico de diferenciación (Döhler et al., 1984; Law et al., 1994).

Durante el proceso de neurogénesis, se han encontrado en cerebro de rata factores de proliferación celular: el Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), p21, Gadd45, ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas hasta los 4 días de edad. (Ino y Chiba, 2000). Estos factores de proliferación oscilan periódicamente de acuerdo con el ciclo celular. Estos factores son sintetizados en la fase S del ciclo (en donde son más abundantes), inmediatamente precedido por la síntesis de DNA, la cantidad de estos factores empieza a declinar durante la fase G2/M. Las proteínas reguladoras de la proliferación, como PCNA, pueden ser usados como marcadores de células en proliferación (Kurki y Ogata, 1988). Es

bien conocido que en cerebros de animales adultos, son pocas las células en proliferación, las neuronas pierden la habilidad para dividirse y no proliferan bajo ninguna condición. El antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA, es una de las proteínas que participa en la replicación del DNA, funciona como una abrazadera deslizante de la polimerasa. Esta proteína no sólo tiene una participación principal en la replicación del DNA, es una proteína con una masa aparente de 36kDA, que forman complejos homotriméricos en una forma de un anillo cerrado con un hueco en el centro que encierra al DNA y funciona como un factor accesorio de la DNA polimerasa. PCNA tiene la finalidad de anclarse al DNA y esto permite que se deslice a lo largo de él, una vez que la replicación se ha completado, PCNA se separa del DNA. El PCNA funciona como un factor para que la δ polimerasa avance sobre el DNA durante la replicación, la cual también le permite interactuar con otras proteínas, incluidas las nucleasas, DNA ligasas, inhibidoras de cinasas, etc. Esta gran variedad de interacciones entre PCNA y proteínas que intervienen en el metabolismo del DNA implica que PCNA es un factor central en la coordinación de la replicación del DNA, su reparación, la herencia epigénica y el control del ciclo celular (Ino y Chiba, 2000).

4.2 Sinaptogénesis y crecimiento neuronal

El dimorfismo sexual del cerebro, involucra la diferenciación en el árbol dendrítico que es estructurada por la acción del estradiol en la infancia, la diferenciación depende de eventos coordinados de biosíntesis de proteínas. Ya que se ha demostrado que el estradiol induce biosíntesis de proteínas específicas relacionadas con la formación de sinapsis y sus interacciones, en el cerebro neonatal (Ani, 1980). Algunas proteínas que se han asociado con la modulación del crecimiento neuronal y con la sinaptogénesis (GAP-43, SCG-10 y SNAP-25) muestran dimorfismo sexual en la rata recién nacida siendo más activas en el macho que en la hembra (Relación M/H= 1.76 para GAP-43, 1.46 para SCG-10 y 1.44 para SNAP-25) (Law, et al., 1994). En el macho recién nacido que es tratado con inhibidores de la aromatasa o con antagonistas de los estrógenos, como el tamoxifen, se encontró una disminución del 30% en los niveles de RNA mensajero que codifican para la síntesis de tres proteínas reguladoras del crecimiento: M/H, GAP-43 y SCG-10, dando niveles intracelulares semejantes a los observados en las ratas hembras controles. El descenso en la concentración de estos mensajeros fue notable sobre todo alrededor del día 2 después del nacimiento. Estos resultados están de acuerdo con los nuestros en mostrar dimorfismo sexual en los niveles de RNA mensajero, susceptibles de ser modificados por el tratamiento hormonal adecuado (Van-Den.Pol, 1995 y Vergara, et al., 2001).

Los estudios hechos por Lustig y col. (1993) y Law y col. (1994), muestran que la presencia de distintos RNAm específicos, pueden expresarse en diferentes tiempos para la síntesis específica de una proteína, así por ejemplo, Lustig y col. (1993), señalan que los niveles de RNAm del núcleo ventro-medial que codifican para la GAP43 muestran un aumento notable alrededor del tiempo señalado como el período crítico de la diferenciación sexual y después disminuye rápidamente con la edad, mientras que los que codifican para la SNAP-25 disminuyen primero y luego aumentan. El RNAm que sirve como templado para la síntesis de la SCG-10 permanece relativamente constante a través de todo el desarrollo postnatal. Recientemente se ha demostrado que los estrógenos son capaces de

modular la sinaptogénesis en la rata hembra adulta. Se ha encontrado que la ovariectomía disminuye drásticamente (alrededor del 50%) el número y la densidad de las sinapsis, así como, la estructura morfológica de las uniones nerviosas en los núcleos del área hipotalámica ventromedial, por el contrario, la aplicación de benzoato de estradiol es capaz de restaurar el número y la densidad sináptica en la áreas afectadas por la ovariectomía. Otros estudios realizados son los que involucran una regeneración de axones, que se ve modulada también por los estrógenos, ya que involucra la regulación de la proteína llamada GAP-43, proteína presináptica implicada en el crecimiento y regeneración de axones, esta regulación se encuentra en las neuronas del APO, tanto en su desarrollo como en el estado adulto de la rata (Shughrue y Dorsa, 1993).

4.3 Migración celular

Para identificar las vías de migración, Jacobson y col. (1985) inyectaron timina radioactiva a ratas gestantes en el día 18 de esta, y se sacrificaron las crías a diferentes edades. Dos horas después de la inyección, las células marcadas se encontraban en el límite del tercer ventrículo, y después se lateralizaron y se colocaron en forma dorsal para llegar al APO. El destino final de estas neuronas es desconocido, ya que se ha observado que ellas pueden continuar su migración hasta más allá de los bordes laterales del APO media. Estos resultados han llevado a proponer que existen sustancias neurotropas específicas capaces de determinar la migración de grupos celulares (Harburgen y Openheim, 1982; Wickens, 1990).

Las hormonas esteroidales para que puedan tener las acciones anteriores, deben participar activamente en la modulación de las actividades que participan en la duplicación del DNA y en la transcripción de la información genética almacenada en las células blanco, para terminar en la síntesis de proteínas específicas necesarias para el crecimiento, metabolismo y protección celular. Basados en los descubrimientos, que demostraron que la administración de algunos inhibidores específicos de la síntesis de RNA y de proteínas, tales como la actinomicina D o la cicloheximida atenúan o evitan por completo el efecto del propionato de testosterona, puede aceptarse, por consiguiente, que el ciclo celular y la síntesis de proteínas deben estar involucrados en la generación del dimorfismo sexual (Hutchison et al., 1996).

4.4 Neuroprotección

A través de varios estudios se ha encontrado que algunas hormonas esteroidales (como la testosterona y estradiol) juegan un papel importante en la diferenciación sexual cerebral, influyendo a las células que componen los núcleos dimórficos, funcionando como un neuroprotector, esta función reguladora de los esteroides no está totalmente esclarecida. La función neuroprotectora de estas hormonas en la diferenciación sexual, depende de la susceptibilidad del área, periodo de exposición y de la dosis. Las hormonas esteroidales pueden ser utilizadas como terapias en enfermedades neurodegenerativas, ya que pueden alterar algunos de los síntomas de las neuropatologías, así como, estar asociadas con un gran número de beneficios clínicos, este proceso de recuperación se ve relacionado a diferencias sexuales, ya que los estrógenos pueden tener diferente efecto tanto en hembras como en los machos, debido a la distinta sensibilidad que presenta el tejido hacia las hormonas, del tipo de receptor y la localización de estos; también la neuroprotección se ve mediada por la cantidad suministrada de la hormona (Green y Simpkins, 2000; García-Segura et al., 2001).

La neuroprotección, se refiere a una serie de eventos en cascada, ya que la exposición a hormonas esteroidales promueve un aumento de la supervivencia y viabilidad de células, estos efectos se han visto tanto “in vitro “ como “in vivo ”, en esta serie de eventos se encuentran la promoción de la sinaptogénesis, la prevención del acortamiento de las dendritas y axones, y se alteran los niveles de neurotransmisores y sus receptores, como también, se puede regular los sistemas de segundos mensajeros, y con esto, las hormonas puede modular y establecer una disminución en los síntomas de enfermedades neurodegenerativas, al aumentar la viabilidad de las neuronas, así como también, la modulación del efecto neuroprotector que tienen los estrógenos en las enfermedades neurodegenerativas, ha abierto el panorama del conocimiento y ha permitido transpolar descubrimientos científicos a la diferenciación sexual (Wolley et al., 1997).

Con la acción neuroprotectora de los esteroides, se ven reducidos o retrasados los síntomas de enfermedades neurodegenerativas, así como, el aumento de la recuperación neuronal de enfermedades traumáticas o crónicas, como pueden ser: el Alzheimer, Parkinson, depresión, anorexia/bulimia, esquizofrenia y traumatismos por golpes. Algunos de estos desórdenes en humanos son diferentes en hombres y en mujeres (dimorfismo sexual), ya que los niveles hormonales en el cerebro no sólo dependen del sexo sino de la etapa de la vida del sujeto, como por ejemplo: la pubertad, menopausia, andropausia o gestación (Frick et al., 2000; García-Segura et al., 2001).

4.4.1 El estradiol como neuroprotector

Se han obtenido reportes que el estradiol es un potente factor neurotrófico y de neuroprotección durante la etapa embrionaria y neonatal de mamíferos (Toran-Alleran, et al., 1999). La adición de 17β -estradiol en medios de cultivos de diferentes tejidos de origen neuronal (hipotalámico, corteza, hipocampo y neocortical), origina un aumento en la viabilidad y supervivencia disminuyendo la muerte celular, causada por diferentes factores como son: el estrés oxidativo (ya sea por la exposición a peróxido de hidrógeno, hierro o hemoglobina o por la activación de genes pro apoptóticos), aminoácidos excitatorios glutamato, proteínas β -amiloides, NMDA, privación de suero y anoxia (Sudo et al., 1997). Estos tratamientos con 17β -estradiol en células, que no tenían las condiciones apropiadas para su supervivencia, dan como resultado un aumento en la viabilidad de las células, que va de un rango del 48% al 52% más que en células que no fueron tratadas con 17β -estradiol (Wang et al., 1999). La concentración que ha demostrado mayor efectividad para ejercer su acción neuroprotectora, va de un rango de 0.1 nM (Briton et al., 1997) a 50 μ M (Moosman y Behl, 1999).

Los distintos tipos de tejido neuronal. poseen diferente sensibilidad a la acción de los estrógenos (Green y Simpkins, 2000), además, esto tiene relación al tipo y relativa cantidad de receptores intracelulares para estrógenos presentes en las células neuronales y tales receptores pueden contribuir con la cantidad de estrógenos necesarios, para que las hormonas puedan tener un efecto positivo sobre un área determinada, funcionando como un neuroprotector, así también, los receptores a estrógenos tiene relación con el tiempo en que se presenta una respuesta; Yang y col. (2000) menciona que el tiempo donde empieza a demostrarse una respuesta al administrar un tratamiento con estrógenos es de 3 horas después de que se induce un tipo de daño neuronal.

Además de los efectos que pudiera tener la administración exógena de estrógenos, resulta de gran interés los estudios realizados por Garcia-Segura et al (2001), en donde describe, que existe un incremento de la aromatasa (que sirve para catalizar el paso de testosterona a estradiol) en astrocitos de áreas del cerebro donde existe un daño causado por ácido cainico o físicos, y lo cual sugiere que puede existir un mecanismo de compensación por parte del organismo para autoprotegerse, incrementando sus niveles de estradiol circulante ante un daño neuronal. Se han encontrado diferencias sexuales en cuanto a la concentración de RNAm de la aromatasa, ya que en el macho se encuentra mayor cantidad de RNAm en el día 20 de gestación y el primer día después del parto en el APO y ST comparado con las hembras, estos resultados sugieren, que la regulación diferencial de la expresión del RNAm de la aromatasa, durante el período crítico de diferenciación sexual, puede mediar en parte el establecimiento de algunos de los muchos parámetros que median el proceso de diferenciación del cerebro de la rata (Hutchinson, et al., 1997). El mecanismo de acción de los estrógenos se puede ver mediado por la activación de receptores a estrógenos citoplasmáticos y a mecanismos que no dependen de la activación de estos receptores.

4.4.1.1 Efecto de neuroprotección del estradiol independiente de receptores citoplasmáticos

En general, los efectos rápidos de los estrógenos, son mediados por la interacción de la hormona con canales dependientes de voltaje, como por ejemplo, a la subunidad β de los canales de K^+ , en donde, los estrógenos activan estas compuertas dependientes de voltaje, así como también, se ven mediados estos efectos rápidos que tiene los estrógenos por medio de receptores a estrógenos que se encuentran en la membrana plasmática. Durante estos efectos rápidos se puede incluir la modulación de la excitabilidad neuronal, que ha sido observada en varias regiones del cerebro por ejemplo: hipotálamo, amígdala, cerebelo, neocorteza e hipocampo (Behl y Manthey, 2000).

En investigaciones que se han realizado en diferentes tipos de células neuronales para demostrar que el efecto de protección es independiente de la activación de receptores intracelulares para los estrógenos, ya que se han utilizado diferentes tipos de antagonistas a los estrógenos (como el tamoxifen), ante diversos agentes que pueden inducir la muerte celular como son: NMDA, pro-oxidantes y glutamato, en donde se ha encontrado que persiste el efecto protector de los estrógenos (Moosmann y Behl, 1999; Toran-Allerand, 1999).

Un ejemplo, en donde los estrógenos pueden poseer una acción antioxidante, es que puede disminuir la muerte celular causada por factores pro-oxidantes, y con ello, suprimir el riesgo de estrés oxidativo que puedan sufrir las neuronas, y esto se puede deber, al grupo hidroxilo en el C3 del anillo A de la molécula del esteroide (que tiene la propiedad de donar e^- y este mecanismo es independiente de la activación de receptores a estrógenos, ya que se usaron antagónicos como el tamoxifen y no se ve disminuida la acción antioxidante de los estrógenos (Moosmann y Behl, 1999; Behl y Manthey, 2000). Estos estudios se realizaron “*in vitro*” y la administraron de la hormona fue a dosis altas (10- 5M), para que tuviera una acción antioxidante, pero esto es cuestionable para estudios “*in vivo*” sobre todo en un sentido clínico (García-Segura, et al., 2001).

Otros de los mecanismos por los cuales no se ve la interacción de los receptores de estrógenos, es la modulación de los neurotransmisores. Los estrógenos regulan la liberación de la dopamina y la disminución de la afinidad de su transportador (Disshon, et al., 1998; Dluzen, 2000). El sistema más abundante en los circuitos dimórficos (APO, NVM, NSQ, BNST y la amígdala es el ácido gama-amino-butírico (GABA) (Wagner, et al., 1997). La función principal del GABA es inhibir la actividad eléctrica del cerebro. En términos de conducta sexual se ha demostrado, que los niveles de GABA en el cerebro (McCarthy, 1995), así como, el número de receptores de GABA (Jüptner y Hiemkel, 1990), son susceptibles a las hormonas sexuales. También se ha demostrado que la neurotransmisión de GABA en el NVM es necesaria para la expresión de lordosis en hembras (McCarthy, et al., 1995). Otros estudios han demostrado que los receptores de GABA presentan un dimorfismo sexual en el NVM, en donde en hembras hay mayor cantidad de receptores que en los machos (Smith, et al., 1996).

Así también, la activación de la neuroprotección ante un daño, se ve mediada por la

activación de segundos mensajeros como son: proteínas G. regulación de cinasas (MAP), fosforilación de AMPc (Raap et al., 2000, Walton y Dragunow, 2000). En cuanto a la traducción de señales, por parte del AMPc por la vía AMPc-CREB (elemento de unión a proteína), se ven afectadas por la testosterona, en zonas hipotalámicas, durante el periodo crítico de diferenciación sexual, en donde se han encontrado diferencias sexo-específicas. Así también, se han visto alterados los niveles de calcio (Miller et al., 1999); en nuestro laboratorio se han encontrado diferencias sexo-específicas en cuanto la concentración del sistema calcio-calmodulina encontrando diferencias significativas, en cuanto sexo y edad, dando como resultado una asimetría funcional (Rodríguez et al., 1998, 2001). El aumento de los niveles intracelulares de calcio, también se ve mediado por la acción que tienen los estrógenos sobre el aumento en la modulación del efecto del ácido gama-aminobutírico (GABA), ya que su actividad para despolarizar canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, durante el período crítico de diferenciación sexual (no así en el estado adulto), puede mediar el proceso de diferenciación sexual (Perrot-Sinal et al., 2001).

Este mecanismo por el cual no tienen intervención los receptores intracelulares de estrógenos, pueden permitir al estradiol actuar más rápidamente a través de la fosforilación y activación de proteínas ya existentes o para tener la regulación de genes que dependen de una fosforilación para su activación (Wise et al., 2001).

4.4.1.2 Efecto de neuroprotección por los esteroides mediado por receptores citoplasmáticos

Los receptores citoplasmáticos, inicialmente descritos por Jensen y Jacobson (1962), están formados por ligandos de alta afinidad ($K_d \approx 10^{-10}$ M) para las hormonas y se encuentran presentes en baja cantidad ($2-6 \times 10^4$ moléculas por célula) específicamente en células blanco. Después de fijar a los esteroides estos receptores experimentan cambios conformacionales que forma parte de una secuencia de activación, la cual aumenta la afinidad del complejo hormonal por el ADN presente en los cromosomas en interfase. La fijación del complejo hormona-receptor al ADN se realiza con gran afinidad en lugares particulares del genoma localizados relativamente lejos (-222 a -95 pares de bases) de la llamada "caja TATA", secuencia que se acepta como parte del promotor en las células eucariotas (Ma et al, 1994). Estos sitios de fijación se caracterizan por la presencia de secuencias específicas en el extremo 5'-terminal. La interacción del complejo con el ADN y el ARN polimerasa II induce la síntesis de moléculas precursoras ARN heterogéneo nuclear (ARNhn) de ARNm específicos, esta estimulación es demostrable dentro de los 30 minutos siguientes a la penetración del esteroide al citoplasma celular. El estrógeno y su receptor se unen a una secuencia específica del DNA, llamada elemento de respuesta a los estrógenos (ERE), y son localizados en la región promotora de los genes que son sensibles a los estrógenos, estos EREs funciona como un amplificador en los genes, para dar una respuesta específica, así como, tener influencia en el índice de transcripción del gen (Pettersen et al., 1997). Los EREs han sido identificados en regiones promotoras de múltiples genes que son esenciales para que el cerebro lleve un adecuado funcionamiento, así como también, están relacionados con algunas de las disfunciones del cerebro. Algunos de estos genes son los que sintetizar acetilcolintransferasa (Miller, et al.,

1999), esta inducción de los EREs pueden contribuir a los efectos de neuroprotección, ya que el gen de la familia de Bcl-2 contiene la secuencia específica (ERE) (García-Segura et al., 2001 ; Pike, 1999), otros genes que contiene secuencias de EREs son: fos, en donde, se han encontrado diferencias sexo específicas, en la síntesis de este elemento, ciclina D1 (Sabbah et al., 1999; Arrieta et al., 2000).

Se ha observado que en respuesta a la penetración de los esteroides se produce una acumulación de RNAhn, dentro del núcleo de las células blanco y un poco después del ingreso de los esteroides se produce un aumento en la concentración de RNAm tanto en el núcleo como en el citoplasma. Este último hallazgo ha llevado a considerar que los receptores específicos, activados por la fijación de las hormonas esteroides, pueden funcionar como estabilizadores del RNAm y de las moléculas precursoras del RNAhn, tanto en aquellas cuya síntesis se induce mediante la interacción hormona-receptor-DNA, tal sucede, por ejemplo, en el caso de la vitalogenia (Bernstein et al., 1989).

Hasta el momento se acepta que la fijación del estradiol a receptores intranucleares, pueden funcionar como factores reguladores de la transcripción, induciendo tanto cambios en el aumento y la estabilidad del material genético y de sus precursores (Rainbow et al., 1982). Se ha podido identificar un número considerable de proteínas y ARNm que son regulados por la presencia de estrógenos; algunas de estas proteínas, participan de manera directa en el mecanismo de transmisión del impulso nervioso (Law, et al., 1994) y pueden seguramente constituir parte importante de los cambios de comunicación inter-neuronal, inducidos por la presencia de hormonas esteroides. Se ha observado que subsecuentemente a la modificación genómica inducida por los estrógenos, es posible observar cambios morfológicos en las neuronas que acumulan estas hormonas esteroides, tales como el NVM del hipotálamo, los cambios observados incluyen: a) aumento en la concentración intracelular de ARN y consecuentemente, b) en el número de ribosomas, c) en la cantidad de retículo endoplasmático, d) aumento en el número de vesículas de secreción y e) en la síntesis de proteínas importantes para la función nerviosa, tales como las encefalinas (Funabashi y Kimura, 1994). Estas observaciones corroborar, a un nivel molecular, los resultados de estudios anteriores, que habían demostrado que la síntesis de ARN y de proteínas inducida por los estrógenos es indispensable para la inducción de la diferenciación sexual (Young et al., 1995).

Como ya se hizo mención, el estradiol tiene influencia en la regulación de la expresión de numerosos genes, que pueden mediar el mecanismo de neuroprotección, los cuales son: los involucrados en la relación de apoptosis y supervivencia, función mitocondrial, la funcionalidad de los astrocitos, síntesis y secreción de neurotransmisores, expresión de neurotrofinas, factores de crecimiento, así como, sinaptogénesis y elongación axonal y/o dendrítica (Shughrue y Dorsa, 1993; García-Segura et al., 2001).

Para que los estrógenos puedan mediar su función neuroprotectora, deben de unirse a su receptor específico, que en el caso de los estrógenos existen 2 tipos de receptores, y que para su mecanismo de acción depende de la cantidad, localización y del tipo de receptor que se encuentre en el núcleo, para que se dé la acción protectora o la muerte de la célula (Nielsen, et al., 2000).

4.4.2 Receptores a estrógenos

Los receptores a estrógenos (ER) son el α y β , estos tienen estructuras muy similares y presentan una alta homología en la secuencia de aminoácidos, particularmente en la dominancia a la unión del ADN (Kuiper et al., 1996), ambos tienen una función de activar el dominio amino terminal (AF-1 y 2), que son sitios de dominio para que los estrógenos tengan un sitio de unión al ADN, ya sea una zona central o una área carboxilo terminal del ADN. "in vivo", los receptores a estrógenos forman parte de un complejo de proteínas que incluyen, proteínas de shock e inmunofilinas (Tsai y O'Malley, 1994), estos receptores se encuentran distribuidos en el cerebro anterior, hipotálamo y amígdala, así como, en las subdivisiones de estas regiones, sobre todo en aquellas regiones que son necesarias para las funciones reproductivas (Pfaff y Keiner, 1973; Don Carlos et al., 1995).

Los receptores a estrógenos en mamíferos, son ER α y β , los cuales se expresan durante el desarrollo de hembras y machos en el APO. La cantidad de receptores que se presentan durante el desarrollo y el estado adulto de las ratas, se presentan diferencias entre hembras y machos en el APO, ya que los niveles de RNAm del receptor α y el propio receptor, son más altos en las hembras que en los machos (Zhou et al., 1995). Además se ha encontrado que los estrógenos desregulan la expresión de ER α en el APO de ratas macho; pero los niveles de expresión de RNAm del ER β son más altos en los machos que en las hembras en el periodo pre y post-natal (día de gestación 17 y a los 15 días después del parto, no así en el estado adulto) (Don Carlos, et al., 1995; Karolczak y Beyer, 1998). Además está comprobado que en las ratas, los machos muestran una mayor cantidad de estrógenos al momento de nacimiento en el APO (Beyer, et al., 1993). Así, una sobreexpresión de ER β es acompañada con altos niveles de síntesis de estrógenos y la expresión de aromatasa en el APO del macho, estos factores pueden regular la diferenciación sexual (Karolczak y Beyer, 1998; Patrone, et al., 2000). También parece ser que en el estado adulto, los machos tienen menor capacidad para sintetizar receptores, sin embargo, cuando ocurre un daño en el SNC se ven aumentados los niveles de aromatasa y de una acción neuroprotectora, y con este incremento, el macho tiene más defensas o respuestas ante una enfermedad neurodegenerativa, no así las hembras que son más susceptibles a estas enfermedades (como el Alzheimer's), esto también estaría involucrado en el periodo crítico de diferenciación sexual (García-Segura et al., 2001).

Se ha encontrado que existen más similitudes que diferencias entre los dos tipos de receptores, los ERs reconocen el mismo ERE (Kuiper, et al., 1998); en contraste con estas observaciones, la creación de ratones knockout a ER α y β , sugieren que los dos tipos de receptores tienen distintas funciones fisiológicas, la ausencia del ER α resulta en la pérdida del efecto de inducir hiperplasia en el útero por parte de los estrógenos, además de provocar un comportamiento anormal e infertilidad, por el contrario, la ausencia del ER β no provoca en el ratón estos cambios (Korach, 1994). Así se puede mostrar que los dos tipos de ERs en un mismo tipo de célula, pueden tener un efecto diferente en el proceso fisiológico o metabólico, entonces los estrógenos pueden inducir diversas señales intracelulares y con ello distintas respuestas fisiológicas y metabólicas y que estos resultados puedan servir para entender el proceso de desarrollo de las células neuronales; los ER β pueden tener una función en el proceso de diferenciación de las células y la

activación de los ER α está implicado el proceso de sinaptogénesis ambos durante el desarrollo y el estado adulto del CNS (Patrone, et al, 2000; Temple, et al., 2001). Además se ha sugerido que el ER β tiene una respuesta neuronal dimórfica a los estrógenos para el comportamiento sexual y liberación de gonadotropinas (Temple, et al., 2001).

No obstante lo mencionado sobre la protección ejercida por los estrógenos, estos también pueden causar un daño a las neuronas, esto depende del tipo de receptor presente en el tejido, la localización de los receptores en áreas dimórficas como lo son: el área preóptica, anteroventral, expresan diferentes receptores durante su desarrollo (Kuhnemann et al., 1994; Don Carlos et al., 1995), en el área preóptica se demuestra una supervivencia neuronal en el macho (Döhler et al., 1984) y se muestra una muerte celular en área paraventricular en ratas hembras adultas, cuando se administra un tratamiento con esteroides, ya que en el APO presenta los dos tipos de receptores y en el APV solo tiene el receptor β (Arai et al., 1996; Davis et al., 1996); en el estudio realizado por Yoshida y col. (2000), muestra la presencia de apoptosis en el área preóptica media en ratas neonatales, donde la distribución y cantidad de células apoptóticas depende del sexo, subdivisión del área y el periodo de administración de las hormonas.

En el trabajo realizado por Nielsen et al (2000) en células hipotalámicas de rata "in vitro", en donde utiliza estrógenos y un anti-estrógeno (tamoxifen), se demostró que la utilización de tamoxifen en la línea celular RCF-8.1 bloquea la acción de los estrógenos, induce un incremento en la proliferación de las células y disminuye el índice de supervivencia en otras líneas celulares (RCFI2 y RCA-6), también hacen mención, que para que los estrógenos tengan una acción neuroprotectora y por consiguiente un aumento en la supervivencia de las líneas celulares deben presentar los dos tipos de receptores (α y β), y que, en células que solo presentan el receptor β , las neuronas presentan un incremento en la muerte, ya que, el receptor β tiene un efecto sinérgico a la muerte de las células (Temple et al., 2001), en estas células los estrógenos actúan sobre el receptor α para inducir la sobreexpresión de genes antiapoptótica de la familia de Bcl-2, en el caso de las células que solo expresan el receptor β , este puede estar relacionado con la activación del sistema Fas-Fas ligando (FasL), este sistema es un mecanismo primario para la inducción de apoptosis en células y tejidos (Mor et al., 2000). Se ha demostrado que los estrógenos regulan la expresión del FasL (Gutiérrez et al., 1999), este sistema activa a la caspasa 10, que a su vez actúa activando a la caspasa 3, que es la encargada de la activación de endonucleasas, encargadas de fragmentar el ADN durante el proceso de apoptosis, estos estudios de Nielsen han sido comparados con trabajos previos de varios autores (García- Segura et al., 2001).

5. APOPTOSIS EN EL SNC

Durante la diferenciación sexual las células neuronales sufren un proceso apoptótico. Los estrógenos pueden regular la muerte celular de las neuronas por apoptosis. Se han realizado estudios, donde se observan células apoptóticas en el desarrollo del dimorfismo sexual en la SDN-POA, así como, en procesos naturales y patológicos (Davis, et al., 1996; Maky, et al., 2000; Nielsen, et al., 2000; Adrienne, et al., 2000).

En el desarrollo del cerebro, alrededor de la mitad de las células mueren (Oppenheim, 1991; Mooney y Miller, 2000), las neuronas que mueren durante el proceso de desarrollo cerebral presentan signos de apoptosis y este tipo de muerte es un importante mecanismo, que determina el tamaño y forma del SNC (Chia, et al., 2000).

El nombre de apoptosis fue propuesto por Kerry Searle (1972), que proviene del griego Apo (desde) y Ptoxis (caída o prolapso de un órgano o parte de él). La apoptosis es una forma de muerte celular, que ocurre en los tejidos ya sea en condiciones fisiológicas normales o patológicas. Es un fenómeno fundamental en el desarrollo embrionario, metamorfosis (Kerr, et al., 1972), atrofia tisular y regresión tumoral (Kerr y Searle, 1973; Ucker, 1991) tanto en animales vertebrados como invertebrados.

La apoptosis es una forma activa de muerte celular, inducida por factores reguladores, generalmente extrínsecos a la célula misma, que pueden afectar al programa genético intrínseco de muerte, que se caracteriza, por el encogimiento de la célula, condensación de la cromatina y la formación de pequeños pedazos esféricos de membrana que contienen fragmentos nucleares, referidas como cuerpos apoptóticos. La característica fundamental de la apoptosis es la activación de una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , la cual rompe el DNA de manera específica en el espacio internucleosomal produciendo fragmentos de 180-200 pares de bases o sus múltiples. Estos fragmentos pueden ser observados en un gel de agarosa como bandas características en forma de escalera, que son marcadamente diferentes del patrón electroforético difuso que resulta del rompimiento del DNA al azar que ocurre en la necrosis (Hsueh, et al., 1996). Las células que mueren por apoptosis son fagocitadas rápidamente por las células vecinas ya que la fagocitosis ocurre antes de que se pierda la integridad de la membrana, de tal manera que tampoco hay componentes citoplásmicos en el espacio intercelular que produzcan una reacción inflamatoria (Hsueh, et al., 1994).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que la fragmentación internucleosomal del DNA era el primer cambio ocurrido durante la apoptosis, evidencias actuales indican que la célula apoptótica sufre una serie de cambios en la membrana celular que aparentemente preceden a la fragmentación del DNA, entre estos cambios podemos mencionar: la expresión de sitios de unión a la trombospondina (Parker, et al., 1998), la pérdida de residuos de ácido siálico (Saidapur, 1978) y la exposición de fosfatidilserina (Vaux, et al., 1992). Se sabe que en las células que sufren apoptosis, se altera la asimetría en la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática, quedando expuestos en la cara externa de la membrana fosfolípidos, como la fosfatidilserina, que normalmente solo

pueden encontrarse en la cara interna de la membrana celular. Se ha propuesto que estos cambios superficiales tempranos son los que ocasionan que las células apoptóticas sean rápidamente reconocidas por las células que las fagocitan, evitando así procesos inflamatorios en este tipo de muerte celular (Vaux, et al., 1992).

Las investigaciones en los últimos años, indican que la mitocondria juega un papel decisivo en esta fase efectora de la muerte celular, ya que eventos claves del proceso de la apoptosis están relacionados con la mitocondria. La liberación de activadores de las caspasas, cambios en transporte de electrones, pérdida del potencial de membrana, alteraciones en actividades de oxido-reducción celular y la participación de proteínas de la familia de Bcl-2, son algunas de las diferentes señales que convergen en la mitocondria para inhibir o activar el proceso de muerte (Henker, 1996; Adrienne, et al., 2000).

Existen 2 tipos de proteínas que se ven involucradas en la apoptosis y que pueden ser estimulados por los estrógenos, estos son la familia de Bcl-2 y las caspasas. La familia de Bcl-2 consta de aproximadamente 15 miembros y puede ser dividida en dos grupos funcionales, y estos se encuentran en diferentes compartimientos subcelulares en ausencia de una señal de muerte, estos grupos son: pro-apoptóticos (bax, bad, bak, bok, bid, bim, bik y blk), estos se localizan en el citosol o citoesqueleto (Gross, et al., 1998) y anti-apoptóticos (bcl-2, bcl-Xs, bcl-W, Mcl-1 y bcl-XL), estas proteínas se encuentran principalmente en la mitocondria. pero también se han localizado en el retículo endoplasmático y membrana nuclear (Cuadro 4) (Zhu, et al., 1996); la proteína bcl-2, de aproximadamente 25 kDa, es una proteína integral de membrana que puede bloquear la muerte neuronal durante el desarrollo del cerebro, además, se ha demostrado que las células que sobreexpresan bcl-2 son resistentes a diversos estímulos de muerte (Farlie, et al., 1995); los niveles de proteínas anti y pro-apotóticas, determinan el destino de la célula, ya que pueden bloquear o estimular la muerte de la célula (Chia, et al., 2000). Las caspasas son una familia de proteínas que pueden activar la muerte por apoptosis (existen 14 tipos de caspasas). La familia de Bcl-2 y las caspasas, participan en una serie de eventos en cascada que termina con la activación de endonucleasas que fragmentan al ADN en cuerpos apoptóticos (Korsmeyer, 1999).

Los principales reguladores intracelulares de la apoptosis son la familia de Bcl-2, proteína de mamíferos homóloga estructural y funcionalmente a la proteína CED-9, esencial para la prevención de la muerte celular en *C. Elegans* (Hengartner y Horvitz, 1994). Los miembros de la familia de Bcl-2, poseen los dominios homólogos conservados, llamados BH1 y BH2 y algunos como bcl-2, bcl-Xs y bcl-W contiene dominios adicionales BH3 y BH4, que corresponden al segmento de la anfipática α hélice (Reed, 1998). Estas proteínas presentan un dominio c-terminal hidrofóbico que les permite anclarse a la cara citoplasmática de las membranas de la mitocondria, retículo endoplasmático y de la envoltura nuclear, de forma que puedan regular la muerte de las células (Green y Reed, 1998).

Los miembros anti-apoptóticos, muestran una conservación en sus dominios homólogos. Las moléculas pro-apotóticas conservan menos esta homología, sobre todo en el segmento BH4. En estudios de mutagénesis y delección, se argumenta que el dominio BH3 en la proteínas pro-apoptóticos, sirve como un punto crítico para la muerte. Las proteínas proapoptóticas pueden ser divididas por la presencia o ausencia de los dominios

BH1 y BH2, las proteínas que tienen presente estos dominios son bax, bak, y bok, y las proteínas que no presentan estos dominios son bid, bik y blk. Seguido de una señal de muerte, los miembros proapoptóticos sufren un cambio conformacional, que le permite integrarse al interior de la membrana externa de la mitocondria. Las proteínas pro y antiapoptóticas que participan en el proceso de muerte de las neuronas son: bcl-2, bcl-XL y Bax (González-García, et al., 1995), en experimentos realizados en ratones mutantes que no tienen el gen para sintetizar bcl-KL, mueren durante el desarrollo embrionario, presentan muerte masiva de neuronas postmitóticas inmaduras del cerebro, médula espinal y ganglios de la raíz dorsal (Montoyama, et al., 1995). Los ratones mutantes nulos para sintetizar bcl-2 completan su desarrollo embrionario, pero mueren 30 días después del parto, mostrando pérdida progresiva de las motoneuronas faciales y sensoriales (Michaelidis, et al., 1996). Los mutantes que sobreexpresan bcl-XL o bcl-2 presentan un incremento en el número de neuronas sensoriales y una mayor supervivencia ante estímulos externos que puedan provocar la muerte de la célula (Martinou, et al., 1994; Parsadanian, et al., 1998). Los animales mutantes nulos para Bax se desarrollan normalmente, pero presentan un incremento en el número de neuronas (Deckwerth, et al., 1996).

Se ha establecido en modelos con liposomas que llevan los canales de porina mitocondrial (también llamados canales de aniones dependiente de voltaje o VDAC) que muestran que las proteínas pro-apoptóticas bax y bak aceleran la apertura del VDAC (por cambios conformacionales), mientras que las proteínas anti-apoptóticas bcl-2 lo cierran por unión directa a bax y bak y no permiten al citocromo c pasar a través VDAC fuera de los liposomas. Algunos autores (Martinou, et al., 1994), sugieren que Bcl-2 estimula que se cierren los canales VDAC en liposomas, mientras que bax y bak facilita su apertura. Sin embargo, bax y bak, permite el paso de citocromo c para pasar a través de VDAC. Esto está soportado porque el diámetro de VDAC es normalmente pequeño para permitir el paso de citocromo c. Shimizu y colaboradores (1999), proponen que después de que VDAC interactúa con bax y bak sufren cambios conformacionales y esto permite a VDAC (posiblemente en combinación con bax o bak) formar un megacanal que permita al citocromo c atravesar la membrana plasmática de la mitocondria y la liberación del citocromo c provoca la activación de las proteasas (caspasas) (Vander Hein, 1999).

Las caspasas son proteínas que contiene cisteína y una proteasa específica a aspartato, se presentan como pro-enzimas en células vivas, estas caspasas presentan tres dominios: un dominio n-terminal, una sub-unidad menor y una mayor (Alnemri, et al., 1996). Las caspasas responden al estímulo apoptótico, mediante la activación de una cascada intracelular proteolítica que ocasiona la activación o inactivación de diferentes sustratos celulares y con ello provocar la muerte de la célula. Las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas, denominadas procaspasas, la activación de las procaspasas involucra un proceso proteolítico entre sus dominios, por la asociación de su sub-unidad menor y la mayor, para formar una forma activa, como, heterodímero o tetrámero (Thomberry y Lazebnik, 1998). Una vez activadas las caspasas, estas pueden activar a otras caspasas y a otros sustratos celulares, como puede ser, el factor de fragmentación de DNA (que es activado por la caspasa 3, que es uno de los causantes de los cambios típicos de la apoptosis (Liu, et al., 1991). Las caspasas que participan en la apoptosis pueden dividirse en 2 grandes grupos: caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10), que se actúan

en respuesta a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), las cuales proteolizan sustratos celulares provocando los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Thomberry y Lazebnik, 1998). Las caspasas 3 y 9, tienen efectos en la muerte de las neuronas durante el desarrollo del SNC (Hakem, et al., 1998). La activación de la caspasa 9 activa a la 3 y permite la liberación del citocromo c de la membrana caspasa efectoras (3, 6 y 7), las cuáles proteolizan sustratos celulares provocando los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Thomberry y Lazebnik, 1998). Las caspasas 3 y 9, tiene varios efectos en la muerte de las neuronas durante el desarrollo del SNC (Hakem, et al., 1998). La activación de la caspasa 9 activa a la 3 y permite la liberación del citocromo c de la membrana mitocondrial durante el proceso de apoptosis. Se conocen unos 40 sustratos celulares de las caspasas (Cryns y Yuan, 1998), entre estos se encuentran proteínas que inhiben o activan la muerte celular, como la familia de Bcl-2, proteínas que participan en la reparación del ADN o en la organización de la cromatina (Casciola-Rosen, et al., 1996) y proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto (Rudel y Bokoch, 1997). En la muerte de las células del SNC puede participar otra proteasa, la calpaína, cisteína proteasa dependiente de Ca^{2+} ; en ocasiones la apoptosis neuronal requiere la participación conjunta de calpaína y las caspasas (Squier, et al., 1994).

Las proteínas de la familia de Bcl-2 y las caspasas, a su vez, son reguladas por señales extra celulares de supervivencia o de muerte. Diversas familias de neurotrofinas y factores de crecimiento forman parte de las moléculas que median la supervivencia de las neuronas en el SNC. Sus señales de supervivencia se pueden traducir por la vía intracelular que implica a la PI3K (fosfoinositol-3 cinasa) (Kulik y Weber, 1998) y consecuente activación de la proteína-cinasa B o Akt (Franke, et al., 1997) o por la vía que implica a las MAPK (del inglés, Mitogen —Activated Protein Kinases) (Nuñez y del Paso, 1998). La activación de Akt supone la fosforilación directa de Bad (Datta, et al., 1997) que se mantiene unido a la proteína 14-3-3 y con ello ejercer una inactivación de Bad. Por el contrario, Bad no fosforilado se une a bcl- XL o bcl-2 impidiendo que estas proteínas ejerzan su función de supervivencia (Zha, et al., 1996). Existe, además, otra vía de inducción de muerte que implica la señalización de los llamados receptores de muerte. Los mejor caracterizados son Fas y el receptor TNF (Factor de Necrosis Tumoral), a los que se les une sus respectivos ligandos Fas-Ligand y TNF-Ligand (Ashkenazi y Dixt, 1998). Un caso sorprendente que tiene lugar durante el desarrollo del sistema nervioso, es el de la activación por NGF del receptor de neurotrofinas p75, que contienen una secuencia con homología de dominio de muerte. Este receptor participa en la apoptosis inducida por NGF en retina de pollo (Frad, et al., 1996) y es esencial para la muerte celular que afecta el desarrollo de las neuronas simpáticas (Bamji, et al., 1998). La sobreexpresión de su dominio intracelular puede inducir la muerte de algunas neuronas “in vivo” (Majdan, et al., 1997). A unión de NGF a p75 puede producir la liberación de ceramida y la activación de JNK (del inglés, c-Jun N-terminal Kínase) en células gliales, ambas rutas implicadas en la muerte por apoptosis. También se ha demostrado que la muerte por apoptosis, se encuentra regulada por algunos factores como son: 1) gonadotropinas y estrógenos, 2) varios factores de crecimiento y supervivencia como (IGF-I, EGF, TGF- α , TGF- β , PCNA, p53. etc.). 3) proteínas inhibitoras de la apoptosis (AIPs) y 4) algunas citocinas como la interleucina 1- β . En contraste los andrógenos, el GnRH y el TNF- α ejercen una regulación positiva (Casaccio-Bonnefil, et al., 1996).

JUSTIFICACIÓN:

El mecanismo(s) de acción a través del cual actúan perinatalmente las hormonas esteroidales para inducir la organización del hipotálamo en la rata, no ha sido aclarado en su totalidad, ya que, se presume que el macho es el que se diferencia por la presencia de hormonas gonadales en la etapa perinatal. Debido a que se han presentado algunas evidencias que parecen apoyar la idea de que el individuo que se diferencia activamente es el femenino, o bien que los dos sexos deben ser susceptibles a efectores característicos (Williams y Herrup, 1988; Alexander, et al., 1991), en este trabajo se propone estudiar que este cambio activo de las hembras o de los machos, quizá se deba a la presencia de un factor de proliferación celular o a factores apoptóticos que inhiban o activen la apoptosis y que esto se manifieste en el dimorfismo sexual hipotalámico durante la diferenciación sexual hipotalámica y el estado adulto de la rata, así como, el efecto que pudieran tener sobre la desfeminización y la masculinización de las mismas.

HIPOTESIS:

La inhibición de la apoptosis predomina sobre la proliferación celular durante la diferenciación sexual hipotalámica.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la participación de los procesos apoptóticos y de proliferación celular durante la diferenciación sexual hipotalámica.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Establecer la relación de expresión de factores antiapoptótica en el área preóptica durante la diferenciación sexual hipotalámica de ratas hembras y machos tratados neonatalmente con propionato de testosterona (PT) y tamoxifen (T) respectivamente, así como en los animales control.
- Señalar el nivel de proliferación neuronal en el hipotálamo, mediante la distribución del antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA), durante la diferenciación hipotalámica de ratas hembras y machos tratados neonatalmente con propionato de testosterona (PT) y tamoxifen (T) respectivamente, así como en los animales control.

ESQUEMA DE TRABAJO

SELECCIÓN DE LAS RATAS PROGENITORAS



CICLADO Y CRUZA



SELECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS CRÍAS
(Rodríguez, et al., 1998)



OBTENCIÓN DE CEREBROS
(Skinner, 1975)



**PROCESAMIENTO DE CEREBROS PARA CORTES
HISTOLÓGICOS (CORONALES)**
(Skinner, 1975)



**IDENTIFICACIÓN DE bcl-2 Y PCNA POR MEDIO DE
INMUNOHISTOQUÍMICA**
(Davis, et al., 1996)

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El material biológico se obtuvo del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Se utilizaron en la parte experimental de este trabajo ratas de la cepa Wistar tanto hembras adultas (madres) como sus respectivas crías y se mantuvieron de acuerdo a las siguientes condiciones:

- a) Condiciones constantes de luz-oscuridad (14 h de luz-10 h de oscuridad)
- b) Temperatura 21 ± 1 ° C
- c) Humedad controlada.
- d) 11 a 15 cambios de aire por hora
- e) Sanitización programada
- f) Agua y alimentación "ad libitum".

Como el principal propósito biológico es estudiar las crías a tiempos muy cercanos a la hora del nacimiento, fue necesario tener un control exacto del tiempo en que ocurre este evento. Con este objeto se decidió llevar un control del tiempo de la fecundación y así determinar con mayor precisión el momento de los partos.

MADRES

- 1) Se seleccionaron ratas hembras de 60 días de edad, para tener la certeza de su normalidad endócrino-reproductiva, se realizó en cada una de ellas el estudio de la regularidad del ciclo estral mediante la determinación diaria de citología vaginal durante un mínimo de tres ciclos.
- 2) Las ratas cuyo ciclo estral presentó características normales fueron colocadas en presencia de machos para permitir una primera gestación.
- 3) Se comprobó el estado de preñez visualizando la presencia de espermatozoides, por medio de un frotis vaginal post-coital (Dokas, 1983).
- 4) Es importante mencionar que bajo estas condiciones de observación se tuvo un tiempo de gestación de 502 ± 10 horas.

CRÍAS

- a) Se consideró como hora cero, el nacimiento de cada una de las crías de la camada.
- b) Una hora después del nacimiento, se realizó el tratamiento de las ratas machos y hembras. Se agruparon en lotes de ≤ 8 crías y se administraron los tratamientos hormonales pre-definidos, de acuerdo al siguiente esquema (Rodríguez, et al., 1998):

HEMBRAS

Controles: 20 μ l de aceite de girasol (libre de colesterol)

Tratadas: Propionato de Testosterona 30 μ gen 20 μ l de aceite de girasol.

MACHOS

Controles: 20 μ l de aceite de girasol (libre de colesterol)

Tratados: Tamoxifen 200 μ g en 20 μ l de aceite de girasol

Con este tratamiento se evita el segundo pico hormonal que se presenta a las 3 horas después del nacimiento.

- a) La vía de administración que se utilizó fue la subcutánea, aplicándose el tratamiento en la zona dorsal. Una vez realizada la inyección la parte afectada del animal fue cubierta con petrolatum.
- b) Las ratas se sacrificaron por decapitación después del tratamiento a los siguientes tiempos:

1, 3, 6, 12, 24, 48 h.

- c) Inmediatamente después del sacrificio se realizó la obtención del cerebro.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos (intracardiamente) con una solución de glutaraldehído al 2% en un buffer de fosfatos con un pH de 7.4 a 1 M (PBS), esta solución debe mantenerse a una temperatura de 4°C. Seguida de la perfusión los animales se decapitaron y se removió el encéfalo, el cuál fue post-fijado con glutaraldehído al 2% en PBS a 4° C por 46 h, se realizaron 2 cambios de solución a las 24 h cada uno: seguido de la fijación el tejido, se crioprotegió con 10% de sacarosa en un buffer de PBS por 24 h a 4° C, los cerebros se mantuvieron a —70°C hasta que fueron utilizados (Davis, et al., 1996).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cerebros fueron seccionados a 4µm por medio de un criostato (Cryo-Cut AOP) a - 20° C (laboratorio de histopatología de la UAM-X y el área de neurociencias de la UAM-I). Previamente se realizó una comparación con un atlas estereotáxico, para verificar la presencia del tercer ventrículo, el quiasma óptico y la comisura anterior, que sirven como referencia para localizar el APO (Skinner, 1975); los montajes de las secciones de los tejidos se realizaron sobre portaobjetos usando poly-L-lysine (PLL) (Huang, 1983). Para determinar un control en los cambios morfológicos de los cortes, se usó una tinción de hematoxilina-eosina para cada tiempo y tratamiento de ambos sexos.

IDENTIFICACIÓN DE bcl-2 Y PCNA

Se identificaron la presencia de estas moléculas utilizando anticuerpos para bcl-2 y PCNA, los cuales fueron utilizados en los cortes histológicos, para comprobar la presencia de un proceso anti-apoptóticos y proliferación celular en el área preóptica, y su visualización por medio de microscopia; esto se realizó siguiendo las metodologías de Davis, et al., (1996) e Ino y Chiba (2000).

Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron de los siguientes laboratorios:
bcl-2 (Lab. Santa Cruz Biotechnology)
PCNA Kit (Lab. ZIMED, USA)

Expresión de PCNA por inmunohistoquímica

Se utilizó el estuche comercial de PCNA Zymed PCNA Stainig, USA.

Material:

Solución bloqueadora.

Biotinylated mouse anti-PCNA.

Estreptovidina marcada con peroxidasa de rábano.

Mixture DAW (Tetracloruro de diaminobenzidina). La mezcla contiene 50 µl búfer de sustratos, 50 µl tetracloruro de diaminobencidina y 30 µl de peróxido de hidrógeno (0.6%), todo esto en 1.5 ml de agua destilada.

Hematoxilina:

PBS (pH 7.4, 1 Mol).

Procedimiento:

La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con 50 µl de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 min.

Se lavaron los cortes en tres cambios de PBS durante 2 min, cada uno.

Se aplicó 25 µl de solución bloqueadora para cubrir el corte y se incubó por 10 min., a temperatura ambiente, con el fin de eliminar las reacciones inespecíficas.

Se drenó la solución y se aplicaron 25 µl del anticuerpo biotinilado de ratón anti-PCNA para cubrir el corte y fue incubado por 30-60 min. a temperatura ambiente.

Se realizaron tres lavados con PBS durante 2 min. cada uno.

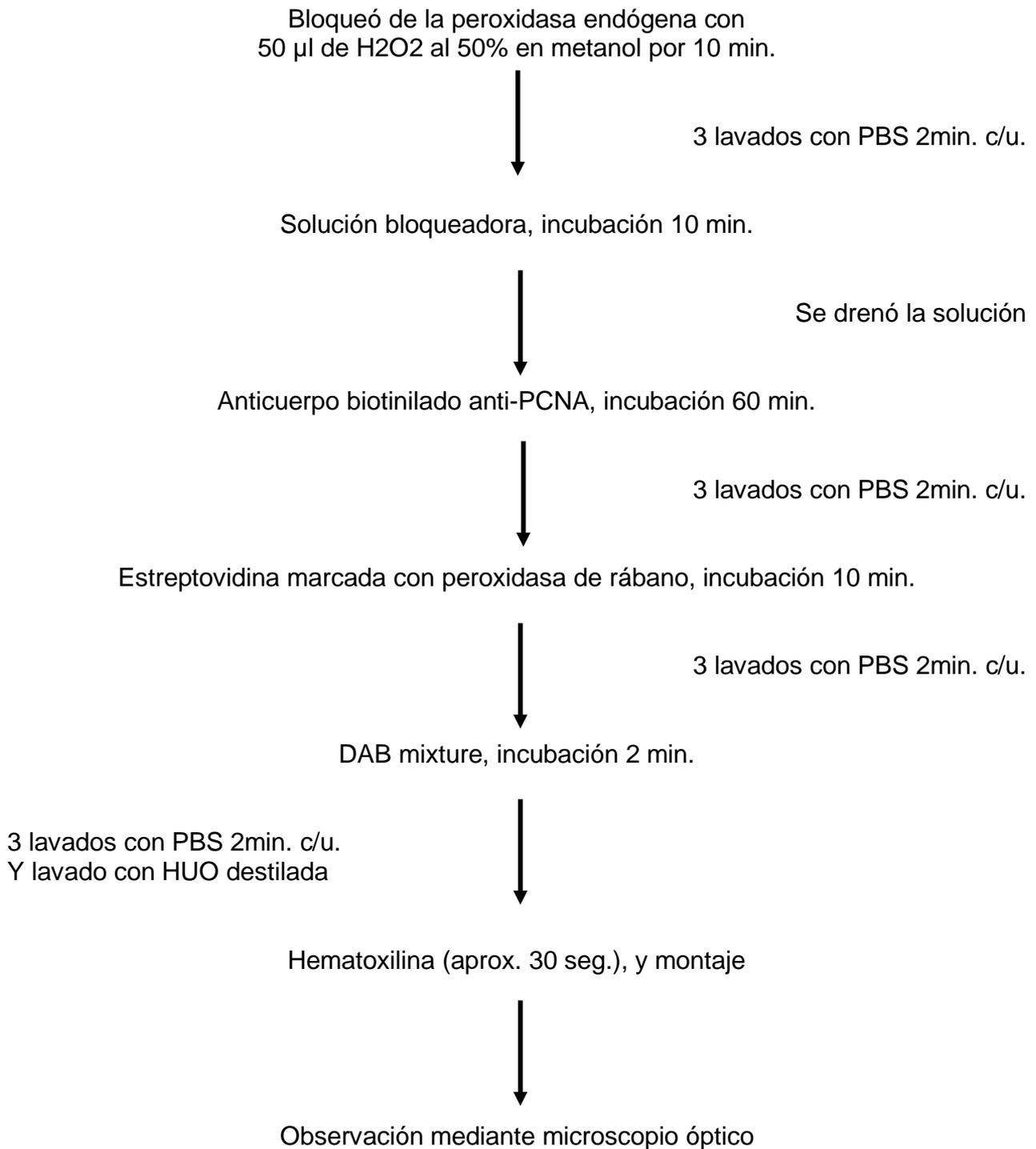
Se aplicó 25 µl de estreptovidina marcada con peroxidasa de rábano para cubrir el tejido y se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente.

Las laminillas se lavaron con PBS 3 veces durante 2 min.

Posteriormente se depositó en el corte 25 µl de mezcla DAB y los cortes se incubaron por 2-5 min. a temperatura ambiente.

Para la tinción de contraste se adicionó 50 µl de Hematoxilina hasta cubrir el corte durante 1-2 min., la laminilla se lavó en agua destilada (Para frenar la reacción de la Hematoxilina). Seguido los cortes se sumergieron en PBS hasta que tomaran una coloración azul (aproximadamente 30 seg.). Y por último fueron montados para su observación.

Inmunodetección de PCNA



Inmunodetección de bcl-2

Material

Solución bloqueadora.

Anticuerpo primario anti-bcl-2.

Anticuerpo biotinilado.

Estreptovidina marcada con peroxidasa de rábano.

Mixture DAB (Tetracloruro de diaminobenzidina). La mezcla contiene 50 µl búfer de sustratos, 50 µl tetracloruro de diaminobenzidina y 50 µl de peróxido de hidrógeno (0.6%), todo esto en 1.5 ml de agua destilada.

Hematoxilina.

PBS (pH 7.4. 1 Mol).

Procedimiento de trabajo:

La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con 50 µl de H₂O₂ al 3% en metanol por 10 min.

Se lavaron los cortes en tres cambios de PBS durante 2 min. cada uno.

Se aplicó 25 µl de solución bloqueadora para cubrir el corte y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente, con el fin de eliminar las reacciones inespecíficas.

Se drenó la solución y se aplicaron 25 µl del anticuerpo primario anti-bcl-2 para cubrir el corte y fue incubado por toda la noche a una temperatura de 4°C.

Al siguiente día se aplicó el segundo anticuerpo biotinilado durante 30 min. y se lavó 3 veces con PBS durante 2 min. cada uno.

Se aplicó 25 µl de estreptovidina marcada con peroxidasa de rábano, para cubrir el tejido y se incubaron por 10 min. a temperatura ambiente.

Las familias se enjuagaron con PBS 3 veces durante 2 min. cada uno

Posteriormente se aplicó 25 µl de DAB mixture y se incubó por 30 seg. Y se lavaron con agua destilada.

Para la tinción de contraste se adicionó 50 µl de Hematoxilina por 1-2 min. El tejido se colocó en PBS hasta que las secciones se tiñeran de azul (aproximadamente 30 seg.). Y finalmente se montaron para realizar su análisis al microscopio.

Immunodetección de bcl-2

Bloqueo de la peroxidasa endógena con
50 µl de H₂O₂ al 50% en metanol por 10 min



3 lavados con PBS 2 min. c/u

Solución bloqueadora 10 min



Se drenó la solución

Anticuerpo Primario anti-bcl-2
Por 1 noche a 4°C



3 lavados con PBS 2 min. c/u

Anticuerpo biotilnado 30 min.



3 lavados con PBS 2 min. c/u

Estreptovidina marcada con peroxidasa de rábano, incubación 10 min.



3 lavados con PBS 2 min. c/u

DAB mixture, incubación 30 min.



3 lavados con PBS 2 min. c/u. Y lavado
Con H₂O destilada

Hematoxilina (aprox. 30 seg), y montaje



Observación mediante microscopio óptico

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron comprobados, utilizando el método de “t” student pan grupos independientes; y ANOVA, para datos intergrupales. La n=5 para todos los experimentos; el intervalo de confianza fue de $P < 0.05$. Fueron contadas 100 células en el APO de todos los grupos y para cada n.

7. RESULTADOS

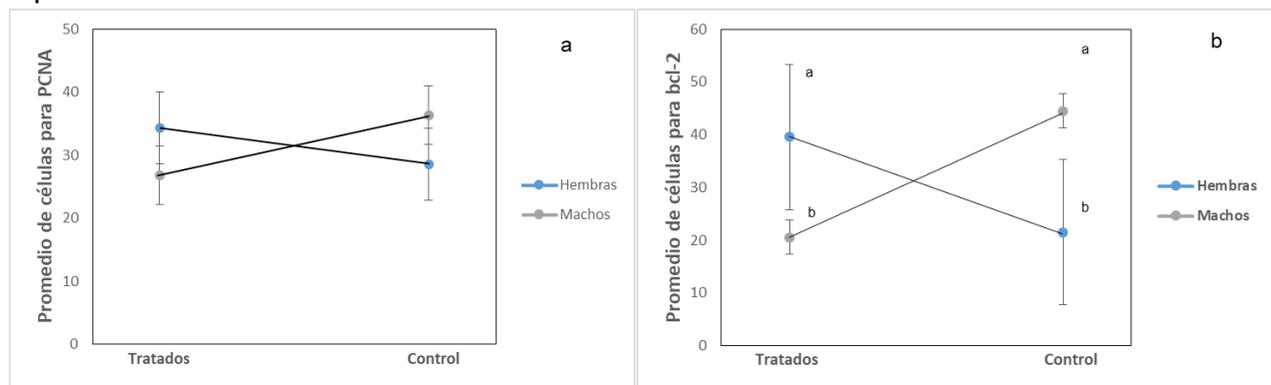
En el área preóptica (APO) de ratas se calcularon los niveles de bcl-2 y PCNA, en hembras y machos control, así como, el de hembras masculinizadas y machos feminizados, en diferentes estadios de vida neonatal. Primero se presentan los resultados de los promedios generales que presentan PCNA y bcl-2 en todos los tiempos post-tratamiento (Grafica 1 a y b; Cuadro 1), para que con ello, podamos verificar que el tratamiento tuvo un efecto en el proceso de diferenciación de hembras y machos. Provocando una “masculinización” de las hembras y una “feminización” de los machos experimentales, y que estos presenten un comportamiento similar en la expresión de los niveles de PCNA y bcl-2. Los promedios de bcl-2 en machos control y hembras experimentales demuestran similitud entre ellos (44.53 ± 14.64 y 39.35 ± 13.85 , respectivamente), aunque presentan diferencias estadísticas ($P < 0.05$), el porcentaje de efectividad del tratamiento fue del 88.36%. Para PCNA en los mismos animales el promedio fue de 36.53 ± 4.61 para machos y para las hembras de 34.3 ± 5.75 , teniendo una efectividad del tratamiento del 93.89%. Para las hembras control y machos “feminizados” los resultados fueron los siguientes: bcl-2 en las hembras presentó un promedio de 21.53 ± 4.19 y en los machos de 20.53 ± 3.25 , teniendo una efectividad del 95.35% y en la presencia de PCNA tuvo una efectividad del 93.72%, en donde las hembras presentaron un promedio de 28.54 ± 6.14 y los machos “feminizados” tuvieron un promedio de 26.75 ± 6.02 .

Cuadro 1. Porcentaje general de células positivas a bcl-2 y PCNA en el APO de ratas control y tratadas durante la diferenciación sexual hipotalámica.

	bcl-2	PCNA
♀ Control	$21.53 \pm 4.19b$	28.54 ± 6.14^a
♀ Tratadas	39.53 ± 13.83^a	34.30 ± 5.75^a
♂ Control	44.53 ± 14.34^a	36.35 ± 4.61^a
♂ Tratados	$20.53 \pm 3.25b$	26.75 ± 6.02^a

Se presentan los promedios y las DE. Literales iguales muestran diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) al compararse animales controles o tratados para PCNA y bcl-2 respectivamente.

Gráfica 1. Relación de células positivas para bcl-2 y PCNA en el APO de hembras y machos neonatales controles y tratados con T y PT durante la diferenciación sexual hipotalámica.



A) Se presenta la relación entre hembras y machos controles y tratados para PCNA. En el eje de las Y se muestra el promedio general de células para PCNA \pm DE y en el eje de las X se grafica el estadio de los animales. B) Se presenta la relación entre hembras y machos controles y tratados para bcl-2. En el eje de las Y se muestra el promedio general de células positivas para bcl-2 \pm DE y en el eje de las X se grafica el estadio de los animales. Literales diferentes muestran diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

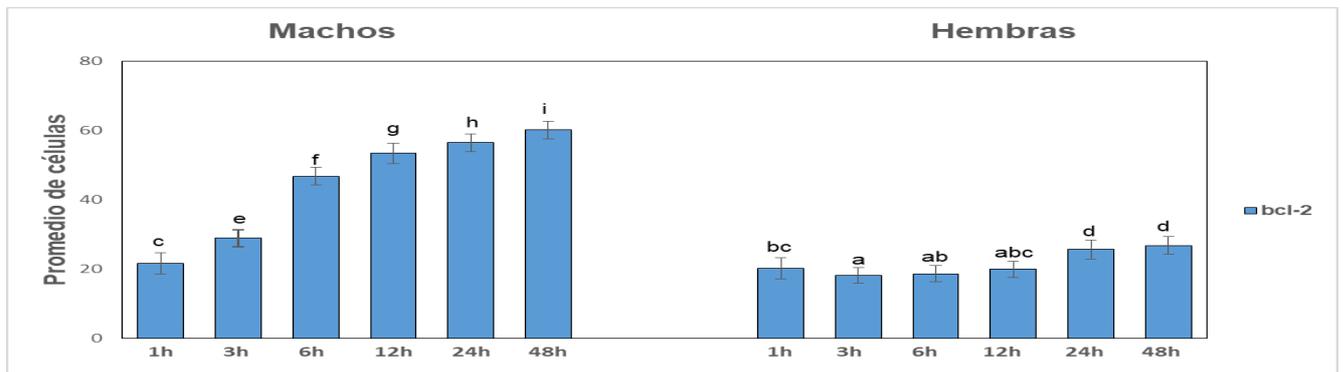
En las gráficas 2 y 3 se presentan los resultados para cada tiempo post-tratamiento en las ratas control. Los machos controles muestran un incremento significativo en los niveles de bcl-2, siendo superior en un 200% el aumento a las 48 horas comparadas a la hora de tratamiento, no así, en el caso de las hembras controles donde el incremento a las 48 horas es aproximadamente de un 30%. La tendencia en los machos control, muestran un incremento en el porcentaje de células positivas a bcl-2, con respecto al tiempo, encontrando en todos los tiempos diferencias significativas; para las hembras (cuadro 2) la tendencia, es también, la de un incremento. pero este no es tan marcado como en el macho, ya que en las hembras en la primera hora muestran un promedio de 20.2 ± 3.1 células positivas a bcl-2, el cual tiene un incremento paulatino hasta llegar a su máximo nivel de expresión a las 48 horas post-tratamiento, teniendo un promedio de 26.8 ± 2.52 células, y en los machos se presenta un incremento en la primera hora con un valor de 21.65 ± 3 y un pico máximo a las 48 horas (60.1 ± 2.5 células).

Es importante resaltar las diferencias que se observan en la expresión de bcl-2 en el APO de las ratas hembras y machos controles (Gráfica 2). En las hembras se observan concentraciones relativamente bajas de bcl-2 en todos los tiempos, mientras que en los machos controles hubo diferencias significativas en todos los tiempos, siendo la diferencia más grande entre 3 y 6 horas, alcanzando el nivel más bajo a la hora de tratamiento, no encontrando diferencias significativas entre machos y hembras controles a la primera hora post-tratamiento. En cuanto a la presencia de PCNA la tendencia fue la siguiente: en hembras como en machos controles el índice de células positivas a PCNA muestran un decremento, el cual en los machos sólo es significativo a partir de las 24 horas, mientras que en las hembras es a las 6 horas. Cuando los datos se compararon por sexo, se encontró que en la primera hora no hubo diferencias significativas (37.35 ± 4.1 vs. 37.55 ± 2.9) entre machos y hembras controles, sin embargo, si las hubo en el resto de los tiempos estudiados (Cuadro 3, Gráfica 4).

En los animales experimentales en cuanto a la expresión de bcl-2 (Gráfica 4 y Cuadro 2), se observó que en las ratas hembras tratadas (masculinizadas) hubo un incremento significativo en el número de células positivas a bcl-2 conforme aumento el tiempo post-tratamiento, siendo el aumento más importante el observado entre las 3 y las 6 horas postratamiento (76.3%). Aunque los porcentajes de células positivas a bcl-2 en las hembras tratadas nunca alcanzaron los mismos valores de los machos control, el patrón que siguió esta proteína fue igual en ambos grupos.

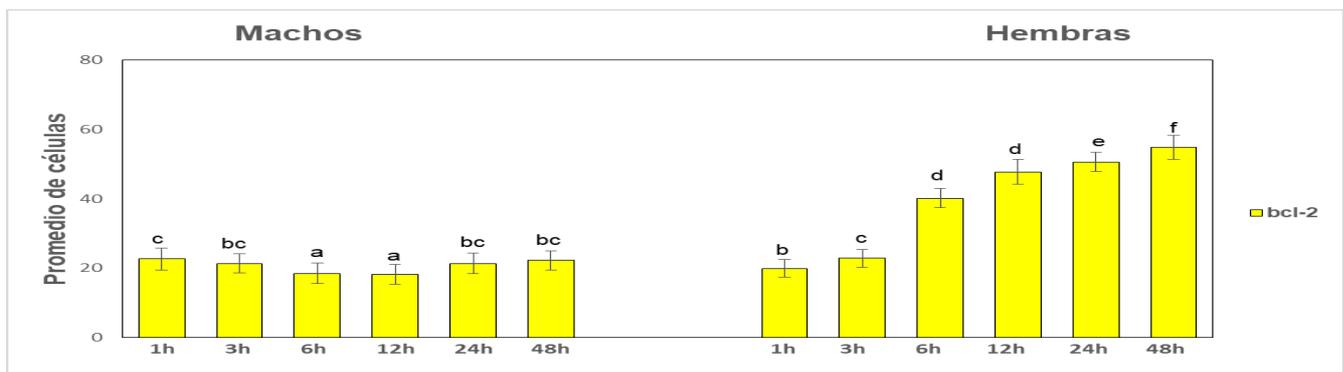
Cabe mencionar que en los machos controles se presentó un aumento importante en la expresión de bcl-2, a las 3 y 6 horas, el cual no ocurrió en las hembras controles, pero si en las hembras tratadas (Gráficas 2 y 5).

Gráfica 2. Porcentaje de células positivas a bcl-2 en ratas neonatales control en el APO durante la diferenciación sexual hipotalámica.



En el eje de las X se muestra el tiempo post-tratamiento, y en el eje de las Y el promedio \pm DE de células positivas para bcl-2. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Gráfica 3. Promedio de células positivas a bcl-2 en ratas neonatales tratadas con T y PT en el APO durante la diferenciación sexual hipotalámica.



En el eje de las X se muestra el tiempo post-tratamiento, y en el eje de las Y el promedio \pm DE de células positivas para bcl-2. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Cuadro 2. Relación tiempo-tratamiento para células positivas para bcl-2 de ratas neonatales control y tratados durante la diferenciación sexual hipotalámica.

Tratamiento	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
♀ control	20.20 ±3.1 ^{bc}	18.10 ±2.2 ^a	18.60 ±2.3 ^{ab}	19.90 ±2.4 ^{abc}	25.60 ±2.7 ^d	26.80 ±2.5 ^d
♂ control	21.65 ±3.0 ^c	28.90 ±2.4 ^c	46.80 ±2.6 ^f	53.35 ±2.9 ^g	56.40 ±2.6 ^h	60.10 ±2.5 ⁱ
♀ tratadas	19.90 ±2.5 ^b	22.80 ±2.5 ^c	40.20 ±2.8 ^d	47.75 ±3.6 ^d	50.60 ±2.8 ^e	54.85 ±3.4 ^f
♂ tratados	22.60 ±3.2 ^c	21.30 ±2.8 ^{bc}	18.45 ±3.0 ^a	18.15 ±2.8 ^a	21.35 ±2.9 ^{bc}	22.20 ±2.7 ^{bc}

Porcentaje ± DE de células positivas a bcl-2 en el APO durante la diferenciación sexual hipotalámica. Literales diferentes muestran diferencias significativas $P \leq 0.05$ para cada grupo de animales controles o tratados.

Cuadro 3. Relación tiempo-tratamiento para células positiva para PCNA de ratas neonatales control y tratados durante la diferenciación sexual hipotalámica.

Tratamiento	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
♀ control	37.35 ±4.1 ^d	31.65 ±4.3 ^{cd}	29.25 ±3.3 ^{bc}	27.70 ±2.8 ^b	23.05 ±2.6 ^a	22.05 ±2.2 ^a
♂ control	37.55 ±2.9 ^e	39.80 ±2.5 ^e	39.90 ±3.3 ^e	38.30 ±2.8 ^e	34.05 ±2.5 ^d	29.60 ±2.8 ^{bc}
♀ tratadas	36.55 ±3.8 ^e	39.75 ±2.8 ^f	39.10 ±3.1 ^f	34.75 ±3.4 ^e	28.75 ±2.3 ^{cd}	26.90 ±2.8 ^{bc}
♂ tratados	35.60 ±3.9 ^e	30.50 ±3.2 ^d	27.25 ±2.9 ^{bc}	24.95 ±3.0 ^b	21.05 ±2.0 ^a	21.15 ±3.2 ^a

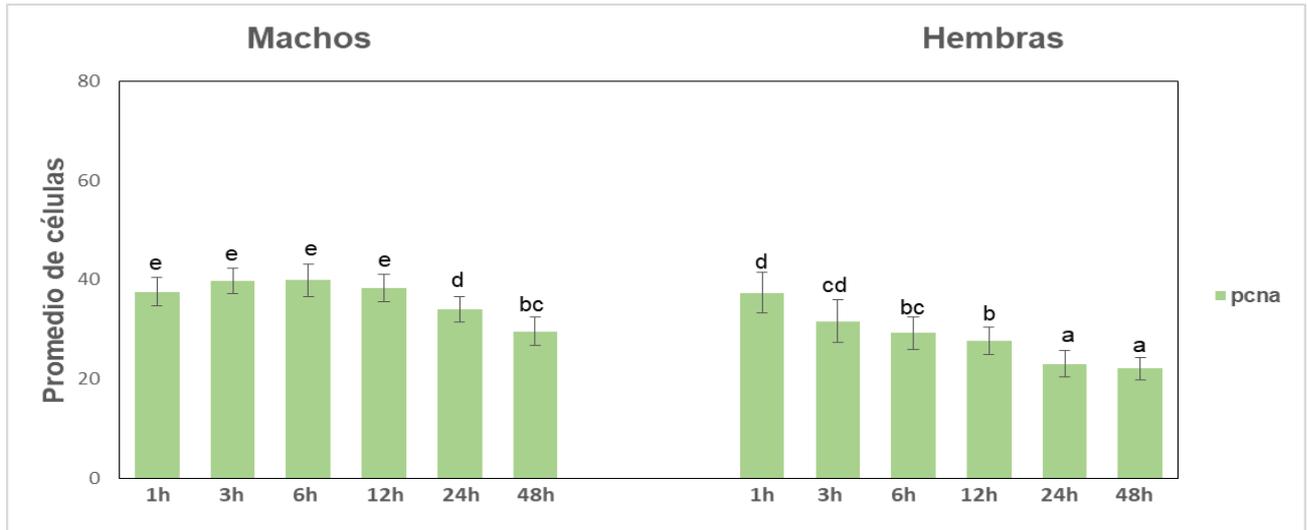
Porcentaje ± DE de células positivas a PCNA en el APO durante la diferenciación sexual hipotalámica. Literales diferentes muestran diferencias significativas $P \leq 0.05$ para cada grupo de animales controles o tratados.

Los porcentajes de PCNA (Gráfica 5), no se observan diferencias tan marcadas como en bcl-2, sin embargo, se observa una disminución del contenido de PCNA en machos controles (37.5 ± 2.9) a la hora con respecto a las 48 horas (29.60 ± 2.8) (Cuadro 3).

En los machos tratados (feminizados), la concentración de bcl-2 tiende a disminuir hasta las 12 horas post-tratamiento, para después aumentar a las 24 y 48 horas, este patrón de comportamiento de bcl-2 fue contrario a lo observado en los machos controles y muy semejante, aunque con valores distintos al de las hembras controles.

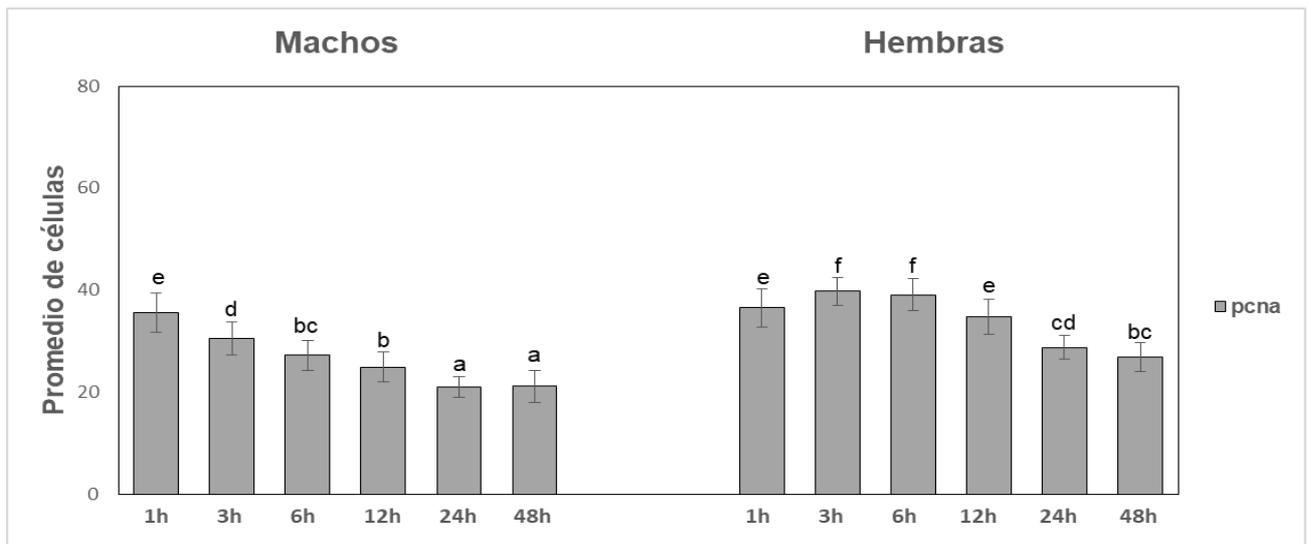
En hembras tratadas (masculinizadas) el porcentaje de PCNA fue muy similar al patrón de comportamiento que tuvo esta proteína en los machos control, en ambos casos hubo una disminución significativa en el porcentaje de células positivas para esta proteína después de las 24 horas en los machos controles y un poco más anticipada (12 horas) en las hembras tratadas, así mismo, el patrón de expresión de PCNA en machos tratados fue muy similar al de las hembras controles, en ambos casos se observa una disminución significativa con respecto al tiempo.

Gráfica 4. Promedio de células positivas a PCNA en ratas neonatales control en el APO durante la diferenciación sexual hipotalámica.



En el eje de las X se muestra el tiempo post-tratamiento, y en el eje de las Y el porcentaje \pm DE de células positivas para PCNA. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Gráfica 5. Promedio de células positivas a PCNA en ratas neonatales tratadas con T y PT en el APO durante la diferenciación sexual hipotalámica.



En el eje de las X se muestra el tiempo post-tratamiento, y en el eje de las Y el promedio \pm DE de células positivas para PCNA. Literales diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

7. DISCUSIÓN

El presente estudio utiliza la naturaleza dimórfica del área preóptica hipotalámica para determinar el efecto postnatal del tamoxifen y el uso de testosterona como tratamientos en ratas, tanto en machos como en hembras. En donde se establece el papel de la influencia hormonal durante el periodo postnatal temprano, y que este ambiente hormonal tiene influencia en los indicadores relacionados con la proliferación y la muerte celular durante el período crítico de la diferenciación sexual hipotalámica (DSH).

Los resultados de nuestro trabajo nos permiten proponer que la administración de tamoxifen (T) y propionato de testosterona (PT) a ratas machos y hembras respectivamente, durante el periodo crítico de diferenciación, inducen feminización en los machos y masculinización en las hembras, por otra parte nuestros resultados nos permiten proponer también, que en los procesos de diferenciación sexual hipotalámica de la rata participan eventos diferentes en machos y en hembras. En los machos el proceso de diferenciación es aparentemente mediado por un aumento en la neurogénesis y en la prevención de la muerte neuronal, en cambio en la hembra es mediado por una disminución en el proceso neurogénico y un aumento en la muerte de las neuronas. Como se muestra en las gráficas 1 a y b la administración de T a machos a la hora de nacidos induce una disminución estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) en la concentración de la proteína antiapoptótica bcl-2 y de la concentración del antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA, que es utilizada como un marcador de células en proliferación, en cambio en las hembras la administración de PT provoca un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en los niveles de bcl-2 y PCNA.

En la gráfica 2 mostramos que en los machos controles, el número de células positivas a bcl-2 es mayor que en las ratas hembras control, con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) a partir de las 3h post-tratamiento, y un aumento en la expresión con respecto al tiempo, es posible que este efecto sea modulado por la neuroprotección ejercida por los estrógenos, ya que se sabe que esta hormona activa a los elementos de respuesta a los estrógenos (EREs), que se encuentra en el gen de Bcl-2, y con ello modular el proceso de la apoptosis. En concordancia con esta idea, se sabe que en los machos existe un aumento considerable de testosterona de origen testicular y que el proceso de aromatización que permite la transformación de testosterona a estrógenos aumenta considerablemente en el día 18 de gestación y a las 2 horas después del parto (Rhoda, et al., 1984). En cambio en las hembras los niveles de bcl-2 son menores y no presentan un incremento significativo en la expresión de bcl-2 a las 3h post-tratamiento, ni tampoco se ven incrementados los niveles de estas proteínas con relación al tiempo, probablemente estos eventos se deban a la ausencia de testosterona de origen testicular y aunque la hembra secreta cantidades considerables de estradiol en este tiempo, es probable que estos no actúen, ya que como se ha propuesto estos son ligados e inactivados por la alfa feto proteína, la cual es de mayor concentración en las hembras que en los machos durante los períodos de elevación hormonal y por consiguiente el estradiol secretado por las hembras no tiene interacción con los EREs (Toran-Alleran, 1984; Gorski, 1985).

En la gráfica 3 se muestra la expresión de bcl-2, en machos tratados con tamoxifen,

como se puede apreciar los machos tratados presentan un patrón parecido al de las hembras controles y viceversa, las hembras tratadas con PT, presentan un aumento en los niveles de bcl-2, teniendo una semejanza en los niveles de expresión de bcl-2 al de los machos controles, véase gráfica 2. Las hembras tratadas presentan un aumento significativo en los niveles de bcl-2 a las 3 h postratamiento, al igual que los machos controles, no existiendo diferencias estadísticamente significativas a las 12 h y una diferencia discreta a las 24 y 48h, lo anteriormente descrito para las hembras tratadas se podría explicar, por la administración de PT que eleva la presencia de testosterona, semejante a la que presenta el macho, y el metabolismo del PT en el hipotálamo a estradiol mediado por el citocromo P₄₅₀ aromatasasa (Hutchison, et al., 1999), ejerce un efecto preventivo de la muerte celular, a través de la inducción de una mayor síntesis de la proteína antiapoptótica bcl-2. El comportamiento en los niveles de bcl-2 en los machos “desmasculinizados” que son parecidos al de las hembras control, podría deberse a que el tamoxifen al ser un antagonista de los receptores para estrógenos (Watanabe, et al., 1997), bloquea la acción de estos y con ello se previene la síntesis de bcl-2, y por consiguiente se disminuye el efecto protector de esta hormona, aumentando el número de células que mueren por apoptosis, como ha sido sugerido por otros autores (Davis, et al., 1996; Yoshida, et al., 2000).

Por otra parte los resultados de esta investigación, en lo que se refiere a la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), que es utilizado como un marcador de células en proliferación, y que se ha visto que durante el periodo prenatal y postnatal temprano es necesario para la replicación y reparación del DNA (Ino y Chiba, 2000), así como para la posterior síntesis de proteínas específicas de importancia en el proceso de diferenciación sexual, actuando en un periodo determinado, y que ocasionan modificaciones permanentes y de vital importancia para la expresión reproductiva en ambos sexos (Law, et al., 1994). Nuestros resultados en la gráfica 4, muestran diferencias significativas en los niveles de PCNA en hembras y machos controles y que estos niveles disminuyen en ambos sexos con relación al tiempo, en las ratas machos controles los porcentajes de PCNA no presenta diferencias estadísticas significativas en los primeros 4 tiempos estudiados, en cambio, a las 24 y 48 h se encontró menores concentraciones de PCNA estadísticamente diferentes a los tiempos previos. En las hembras controles se aprecia una disminución progresiva con respecto al tiempo, siendo esta disminución mayor a las 24 y 48 h. En la gráfica 5 se presenta el comportamiento en los niveles de expresión de PCNA para los machos tratados con T y hembras tratadas con PT, en donde se muestra que las ratas machos tratados presentan un patrón parecido al de las hembras control y las hembras “masculinizadas” tienen niveles de expresión para PCNA similares al de los machos control. Es importante mencionar que los resultados de PCNA no muestran un incremento significativo a lo largo del tiempo, a diferencia de bcl-2 el cual muestra un incremento significativo a las 3 horas post-tratamiento en los machos control y hembras tratadas, esto pudiera sugerir que en la neurogénesis participa el principal metabolito de la testosterona, el estrógeno.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Ino y Chiba, (2000), quienes

encuentran que el PCNA se expresa durante el desarrollo embriológico del sistema nervioso central y durante los primeros 4 días de vida extrauterina de la rata, coincidiendo este fenómeno de expresión de PCNA con el tiempo crítico de diferenciación sexual y con la etapa de mayor división celular en el SNC.

Por otra parte, los resultados de nuestros experimentos en cuanto a los niveles de expresión de PCNA en el APO de hembras y machos neonatales, tanto en animales controles como en tratados, no coinciden con los resultados de Berstein, et al., 1989; Goldstein, et al., 1990; Nishizuka, et al., 1993, quienes reportan que la neurogénesis hipotalámica y particularmente del APO en la rata se presenta entre los días 13 y 18 de gestación. También se ha reportado que la neurogénesis es diferente entre hembras y machos, siendo mayor en el macho (Matsumoto y Arai, 1986), lo cual coincide con nuestros resultados en cuanto a los niveles de PCNA en el APO.

También se ha reportado que la administración de andrógenos a hamsters, aumentan la incorporación de nuevas células en el bulbo olfatorio (Huang, et al., 1999), y que en ratonas en gestación el proceso de la neurogénesis se encuentra aumentado (Kaba, et al., 1988). Sin embargo, es importante mencionar que en el proceso de diferenciación sexual hipotalámica de la rata, no sólo participa el proceso de la neurogénesis.

Las hormonas esteroides, testosterona y estrógenos, participan en la diferenciación, proliferación y prevención de la muerte celular en el SNC (McEwen, 1992), los estrógenos estimulan la diferenciación y modulan la supervivencia neuronal tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" (Brinton, et al., 1997) y la testosterona afecta el crecimiento, diferenciación, morfología y supervivencia neuronal probablemente no por sí misma, sino, por su conversión a estradiol (Goldstein, et al., 1990; Brooks, 1998). Sin embargo el mecanismo mediante el cual actúan estas hormonas en los procesos de regulación neuronal es parcialmente conocido (MacEwen, 1992; Zhang, et al., 2000).

En la diferenciación sexual del hipotálamo y particularmente del APO en la rata la apoptosis pareciera ser uno de los fenómenos celulares que median las características morfológicas del dimorfismo como lo ha propuesto Davis y col (1996), quienes proponen que la masculinización del hipotálamo es el resultado de la acción de la testosterona en el cerebro, incrementando el número de células en el APO, probablemente debido a un aumento en la estimulación de la neurogénesis, o incrementando la migración o diferenciación de las neuronas, o previniendo la muerte celular y con ello aumentar el número de células durante el desarrollo del núcleo dimórfico en los machos. Sin embargo Dodson y col. en 1988, ponen en duda que la testosterona y su metabolito el estradiol actúen incrementando el número de neuronas del núcleo preóptico medio.

Zhang y col (2000), utilizando dos marcadores, uno para observar células en división, bromodeoxiuridina, BrdU, y otro para células en diferenciación, una β -tubulina (TUJ 1), para estudiar el efecto que tienen los estrógenos y la testosterona sobre la diferenciación y la proliferación, en cultivo de células de la neocorteza de embriones de

rata, de 14 días de gestación, que es el período cuando inicia la diferenciación neuronal y se incrementa la proliferación celular, encuentran en estas células que los estrógenos y la testosterona inducen la diferenciación y no la proliferación de las neuronas, sin embargo es importante mencionar que este estudio es realizado en células de la neocorteza y no hipotalámicas.

Nuestros datos su quieren que el dimorfismo sexual en el APO de la rata, ocurre en respuesta a los diferentes niveles hormonales en hembras y machos dado que estos niveles hormonales inducen una regulación en el proceso de muerte celular. Referente a estas conclusiones, nuestros resultados presentados en las gráficas 2, 3, 4, y 5 podrían sugerir que el mecanismo de apoptosis, que es modulado por esteroides, durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata es de vital importancia para la conformación del dimorfismo del APO, ya que en los machos controles y en las hembras tratadas con PT existe una mayor expresión de bcl-2 y con ello podría regularse el proceso de apoptosis, y que este factor se ha determinante para que el APO de estos animales sea mayor que el de las hembras controles y los machos tratados con T. Ya que las hembras control y los machos tratados con T presentan una menor cantidad de bcl-2, y con ello sus células podrían sufrir una muerte por apoptosis. Y que los niveles de PCNA en hembras y machos controles y tratados, no parecieran tener un efecto sobre la diferenciación sexual, ya que estos niveles disminuyen con relación al tiempo post-tratamiento y no existen diferencias significativas entre los grupos controles y tratados.

Nuestros resultados parecen estar de acuerdo con los de otros autores que han estudiado el proceso de muerte de las células de áreas dimórficas del hipotálamo; por ejemplo, Davis (1996), demuestra que el número de células que no presentan reacción a la técnica de ISEL (no apoptóticas) de animales intactos en un periodo de 1 a 13 días de nacidos, en donde muestra un incremento significativo ($P \leq 0.0001$) en el número de células no apoptóticas en los machos y que al compararlo con las hembras las cuales no muestran un incremento significativo en el número de células no apoptóticas. La incidencia de apoptosis encontrada en machos y hembras intactos en el primer día de nacidos muestra diferencias significativas entre machos y hembras, ya que las hembras presentan un mayor número de células apoptóticas que los machos. En los estudios realizados por Yoshida y col (2000), en ratas neonatales que van del día 1 al 14, utilizando la técnica de túnel para la detección de células apoptóticas, muestran que en las hembras existe un mayor número de células apoptóticas comparado con el número de células apoptóticas que presenta el macho en el núcleo preóptico medio. También se ha demostrado que el número de neuronas del APO decrece en las hembras entre el día 4 y 10 postnatal, y que la administración de PT perinatal en hembras previene la pérdida de estas neuronas y que el tratamiento en machos de PT no induce un cambio apreciable en el del número de neuronas en este mismo período (Dodson y Gorski, 1993); nuestros resultados sugieren que las hormonas esteroides pueden actuar reduciendo la pérdida de las neuronas en el APO, posiblemente por afectar el mecanismo de muerte celular, al incrementarse la neuroprotección que se ve mediada por el incremento de bcl-2 en los machos controles y hembras tratadas con PT.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Adrienne M., Ceccatelli S. y Orrenius S. 2000. Role of mitochondria in neuronal apoptosis. *Developmental Neuroscience* 22:348-358.
2. Alexander, M. J., Koraly, Z. J., Leeman. S.E. 1991. Sexually dimorphic distribution of neurotensin/neuromedin N mRNA in the rat preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 311:84-96.
3. Alnemri. E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
4. Altman. J. y Bayer, S. 1978. Development of the diencephalons in the rat: II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time or origin of its neurons. *J. Comp. Neurol.* 182:973-994.
5. Ani, M, Butterworth P, and Thomas, P.T. 1980. Effect of estradiol on neurotransmitter Sensitive adenilate cyclase its possible role in "Sexual Differentiation". *Brain Res.* 183:341-353.
6. Arai, Y., Sekine, Y., Murakami, S. 1996. Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci. Res.* 25:403-407.
7. Arnold, A. y Gorski. R. A. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 7:413-442.
8. Arrieta, I., Camacho, A., Mendoza, R. y Cerbon, M. 2000. c-Fos gen expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area defeminized rats. *Brain Res.* 867: 100- 106.
9. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
10. Bakker, J., Van Ophemert, J., Slob, A.K. 1993. Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behavioral Neuroscience.* 107: 480-457.
11. Bamji, S.X., Majdan. M., Pozniak, D., Belliveau, DJ., Aloyz, R., Khon, J., Causing, C.G. & Miller, F.D. 1998. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J. Cell Biol.* 140: 911-923.
12. Barr, G. A., Gibbons, J. y Moyer, K. E. 1976. Male-female differences and the influence of neonatal and adult testosterone on intraspecies aggressions in rats. *J. Comp. Physiol.* 90:1169-1183.
13. Barr, M. y Kierman, J. 1986. Hypothalamus. En: *The human nervous system.* Barr, M. y Kierman, J.N.Y. Harper & Row'. 190-219.
14. Barraclough C. A. 1967. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In *Neuroendocrinology.* L. Martini and W. F. Ganong (Eds) Vol. II Academic Press New York and London. 61-99.

15. Beach, F. A. 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in the female mammals. *Horm. Behav.* 7:105-138.
16. Beatty, W. 1979. Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and activational influences. *Hormon. Behav.* 12:112-118.
17. Behl, C., Manthey, D. 2000. Neuroprotective activities of estrogen: An update. *J. Neurocytol.* 29:351-359.
18. Bernstein, P., Peltz, S., Ross, J. 1989. The poli A- binding protein complex is a mayor determination of mRNA stability "*in vitro*". *Molec. Cel. Biol.* 9:659-670.
19. Brilliant, M. H., Sueoka, N. and Chikaraishi, D. M. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 4:2187-2197.
20. Brinton, R., Tran, J., Proffitt, P., Montoya, M. 1997. 17 β -Estradiol enhances the outgrowth and survival of neocortical neurons in culture. *Neurochem. Res.* 22:1339-1351.
21. Brown, T. J., Hochberg, R. B., Zielinski, J. E. y MacLuscky, N. J. 1988. Regional Sex Differences in Cell Nuclear Estrogen-Binding Capacity in the Rat Hypothalamus and Preoptic Area. *Endocrinology.* 123:1761-1770.
22. Carrer, H. F. and Aoki, A. 1982. Ultraestructural changes in the hypothalamic MVN of ovariectomized rats after estrogen treatment. *Brain. Res.* 240:221-233.
23. Casciola-Rosen, L., Nicholson, D W., Chong, T., Rowan, K.R., Thornberry. N.A., Miller, D.K. & Rosen, A. 1996. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are esencial for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp.Med.* 183:1957-1964.
24. Chaudhari, N. and Hahn, E. W. 1983. Changes in the brain, of ovariectomized rats. *Science.* 220:924-928.
25. Chen, L., Smith, M., O' Connor. P. y Fornace, A. 1995. Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21^{waf1/cip1} with PCNA. *Oncogene.* 11:1931-1937.
26. Chia, Y., Roth, A., Flavell. A. y Rakic, P. 2000. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends in Neurosciences.* 23:291-297.
27. Chikaraishi, D. M. 1979. Complexity of cytoplasmic poliadenilated and Non-Poliadenilated rat brain ribonucleic acids. *Biochem.* 18:3249-3256.
28. Christensen, L. W. and Gorski, R. A. 1978. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. *Brain Res.* 146:325-340.
29. Claro, F., Segovia, S.; Guilamón, A. y Del Abril, A. 1995. Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. *Brain Research Bulletin,* 36:1-10.
30. Cohen, R. y Pfaff, D. 1992. Ventromedial hypothalamic neurons in the mediation of long-lasting effects of estrogen on lordosis behavior. *Progress in Neurobiology.* 38:423-453.
31. Cryns, V. & Yuan, J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev.* 12:1551-1570.
32. Datta, S.R., H. Dudek. X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M.E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

33. Davis, P., McEwen, B. y Pfaff, D. 1979. Localized behavioral effects of triated estradiol implants in the ventromedial hypothalamus of female rats. *Endocrinology*. 104:898-903.
34. Davis, E.C., Popper, P., Gorski, R. A. 1996. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res*. 734:10-18.
35. Dawson, J. L., Cheung, Y. M. and Lau, R.T.S. 1975. Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol. Psychol*. 3:213-229.
36. Deckwerth, T.L., Elliot, J.L., Knudson, C.M., Johnson, E.M., Snider, W. D. & Korsmeyer, S.J. 1996. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17:401-411.
37. De Grott y Critchlow. 1960. Effects of limbic system on reproductive functions of female rats. *Physiologist*. 3:49-55.
38. Dietrich, E. y Haines, D. 1989. Interconnections between hypothalamus and cerebellum. *Anat. Embriol*. 179:179-207.
39. Disshon, K. A., Boja, J.W., Dluzen, D.E. 1998. Inhibition of striatal dopamine transporter activity by 17 β -Estradiol. *Eur. J. Pharmacol*. 345:207-211.
40. Dluzen, D.E. 2000. Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J. Neurocytol.*, in press.
41. Döhler, K.D.A., Hines M., Coquelin A., Davis, F., Shryne J. E. and Gorski. R. A. 1984a. Pre-and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res*. 302:291-295.
42. Döhler, KD., Srivastava, S. S., Shryne, J. E., Jarzab, B., Sipos, A., Gorski, R. A. 1984b. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology* 38:297-301.
43. Döhler, K.D., Hancke, J. L., Srivastava, S. S., Hofmann, C. C., Shryne, J. E., Gorski, R. A. 1984c. Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain: neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidences. *Progr. Brain. Res*.
44. Döhler, K., Hines. M., Coquelin, A., Davis, F., Shryne, J., Sickmöler. P., Jarzab, B., Gorski, R. 1986. Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology*. 42:443-448.
45. Dokas, L. A. 1983. Analyses of brain and pituitary RNA metabolism: A review. *Brain Res. Rev*. 5:177-218.
46. Don Carlos, L. y Handa, R. J. 1994. Developmental profile of estrogen receptor mRNA in the preoptic area of male and female neonatal rats. *Dev. Brain. Res* 79:283-289.
47. Don Carlos, L., McAbee, M., Ramer-Quinn, D.S., Stancik, D.M. 1995. Estrogen receptor mRNA levels in the preoptic area of neonatal rats are responsive to hormone manipulation. *Dev. Brain Res*. 84:253-260.
48. Dörner, G. y Staudt. J. 1968. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology*. 3:136-140.

49. Dörner, G y Hinz, G. 1975. Androgen-dependent brain differentiation and life span. *Endocrinology*. 65:378-380.
50. Dörner, G. 1981. Sexual differentiation of the brain. *Vitam. Horm.* 38:325-381.
51. Ehrhardt, A. y Baker, S. W. 1978. Sex Differences in Behavior, R. C. Friedman. R. M. Richard. R. L. Vanderwiele, Eds. (Wiley, des York, 1974).
52. Ehrhardt, A. and Meyer-Bahlburg. F. L. 1981. Affects of prenatal sex hormones on Gender-related behavior. *Science*. 211:1312-1318.
53. Farlie, P., Dringen, R., Rees. S. y Bernard O. 1995. bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:4397-4401.
54. Frade, J. M., Rodriguez-Tébar, A. & Barde, Y. A. 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166- 168.
55. Franke. T.F., Kaplan, D.R. & Cantley, L.C. 1997. PI3K downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88:435-437.
56. Frick, K.M., Burlingame, L.A., Arters, J. A., Berger-Sweeney, J. 2000. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience* 95:293-307.
57. Funabashi, T., Kimura, F. 1994. Effect of the estrogen receptor messenger RNA levels in young and middle-aged female rats: comparison of medial preoptic area and mediobasal hypothalamus. *Acta Biol. Hung.* 45:223-231.
58. García-Segura, L. M., Azcoita, I., Lidia, L., DonCarlos, L. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*. 63:29-60.
59. García-Segura, L.M., Chowen, J.A., Parducz, A., Naftolin, F. 1994. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog, Neurobiol.* 44:279-307.
60. Goldstein, L.A., Kurz, E.M. and Sengelaub, D.R. 1990. Androgen regulation of dendritic growth and retraction in the development of a sexually dimorphic spinal nucleus. *J. Neurosci.* 10:935-946.
61. Gollapudi, L. y Oblinger, M. 1999. Stable transfection of PC 12 cells with estrogen receptor (ER α): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J. Neurosci. Res.* 56:99-108.
62. González-García, M. García, I., Ding, L., O'Shea, S., Boise, L. H., Thompson, C. B. & Núñez, G. 1995. bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4304-4308.
63. Gorski, R., Warner., J. 1965. Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinology*. 76:226-239.
64. Gorski R. 1978. Evidence for morphological sex differences within the medial preoptic area for the rat brain. *Brain Res.* 148.333-346.
65. Gorski, R. A. 1979. The neuroendocrinology of reproduction: An Overview. *Biol. Reprod.* 20:111-127.
66. Gorski. R. A., Harlan, R. E. Jacobson. C. D., J. E. Southam. A. M. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J. Comp. Neurol.* 193:529-539.

67. Gorski, R. A., Jacobson, C. D. 1981. Sexual Differentiation of the brain. In Clinics In Andrology: pediatric andrology. Vol. III. Edited by Kogan, S. J. Hafez, E.S.E. pp 109-134.
68. Gorski, R. A. 1985a. Sexual differentiation of the brain, possible mechanisms and implications. Can. J. Physiol. Pharmacol. 63:577-594.
69. Gorski, R. A. 1985b. Sexual dimorphism of the brain. J. Anim. Sci. 61:1001-1004.
70. Goy R. y McEwen B. 1980. Sexual differentiation of the brain. MIT press. Cambridge, Mass. 256-310.
71. Green, D.R. and J.C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science 281:1309-1312.
72. Green, P., Simpkins, J. 2000. Neuroprotective effects of estrogens. Potential mechanisms of action. Int. J. Dev. Neurosci. 18:347-358.
73. Greenough, W. T., Carter, C. S., Steerman, C. y DeVoogd. T. J. 1977. Sex differences in dendritic patterns in hamster preoptic area. Brain Res. 126:63-72.
74. Griffiths E. C. y Hooper, K. C. 1976. Effect of neonatal androgen on the activity of peptidases in the rat brain inactivating luteinizing hormone-releasing hormone. Horm. Res. 7:218-226.
75. Gross, A. Jockel, J. Wei, M. y Korsmeyer, S. 1998. Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. J. EMBO. 17:3878-3885.
76. Gutiérrez, L., Eliza M., Niven-Fairchild, T., Naftolin, F., Mor, G. 1999. The Fas-Fas-Ligand system: a mechanism for immune evasion in human breast carcinomas. Breast Cancer Res. Treat. 54:245-253.
77. Hakem, R., A. Hakem, G.S. Duncan, J.T. Henderson, M. Woo, M.S. Soengas, A. Elia, J.L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S. A. Kaufman, S.W. Lowe, J.M. Penninger, and T.W. Mak. 1998. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways "in vivo". Cell 94:339-352.
78. Hall, P., Levison, D., Woods, A., Yu, C., Kellock, D., Watkins, J., Barnes. D., Gillett, C., Camplejohn, R., Dover, R., Waseem, N. y Lane, D. 1990. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasm. J. Pathol. 162:285-294.
79. Hammer, Jr. R. P. y Jacobson, C. D. 1984. Sex difference in dendritic development of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. Int. J. Devl. Neurosci. 2:77-85.
80. Hanke, J. L. y Döhler, K. D. 1981. Comparison of estrogenic versus antiestrogenic influences on postnatal defeminization and masculinization of the rat brain. Exp. Brain. Res. Suppl. 3:352-353.
81. Harburgen, V. y Openheim, R. 1982. Naturally-occurring neuronal death in vertebrates. Neurosci. 1:39-55.
82. Heller, H.; Crawshaw, L. y Hammel, H. 1978. The thermostat of vertebrate animals. Sci. Am. 239:102.
83. Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. 1994. *C. elegans* cell survival .ene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. Cell 76:665- 676.

84. Henkar P. 1996. ICE family proteasa mediators of all apoptotic cell death. *Immunit.* 4:195-201.
85. Hines M. 1982. Prenatal gonadal hormones and sex differences in human behavior. *Psychol. Bull.* 92:56-80.
86. Hines, M., Allen, L.S. y Gorski. R.A. 1992. Sex difference in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Research* 579:321-326.
87. Houtsmuller, E.J., De Jong, F.H., Rowland, D.L. and Slob. A.K. 1995. Plasma testosterone in fetal rats and their mothers on day 19 of gestation. *Physiol Behav.* 57:495-499.
88. Hsueh, A. J., Billig, H. y Tsafiriri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev.* 15:707-724.
89. Hsueh J. A., Eisenhauer K., Chun Y. S., Hsu S.Y. y Billig H. 1996. Gonadal cell apoptosis. *Rec. Prog. Horm. Res.* 51:433-491.
90. Hutchison, J. B. 1991. Hormonal control of behavior: Steroid action in the brain. *Curr. Opinion Neurobiol.* 1:562-570.
91. Hutchison, J., Wozniak, A., Beyer, C., Hutchison, R. 1996. Regulation of sex-specific formation of estrogen in brain development endogenous inhibitors of aromatasa. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 56:201-207.
92. Hutchison. J.B., Wozniak. A., Beyer, C., Karolczak, M., Hutchison. R.E. 1999. Steroid metabolizing enzymes in the determination of brain gender. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:55-96.
93. Iñigo Azcoitia, Sierra A., Veiga S., Sjhionm Ichiro H., Harada, N., Garcia- Segura L. 2001. Brain Aromatase is neuroprotective. *J. Neurobiol.* 318-329.
94. Ino H. Chiba T. 2000. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system. *Brain Res. Mol.* 31:163-174.
95. Jacobson, C.D., Shryre, J. E., Shapiro. F. and Gorski, R. A. 1980. Ontogeny of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 193:541-548.
96. Jacobson, C. y Gorski, R. 1981. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 196:519-529.
97. Jacobson, C., Davis, F. y Gorski, R. 1985. Formation of sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: Neuronal-growth migration and changes in cell number. *Dev. Brain Res.* 21:7-18.
98. Jensen E, Jacobson H. 1962. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog. Horm. Res.* 18:387-408.
99. Jüptner, M. y Hiemke C. 1990. Sex differences in GABA receptor binding in rat brain measured by an improved binding assay. *Exp. Brain Res.* 81:297-307.
100. Karolczak M. Bever C. 1998. Developmental sex differences in estrogen receptor B-mRNA expression in the mouse hypothalamus/preoptic region. *Reproductiva Neuroendocrinology.* 68:229-234.
101. Kaufmann, Y, Milcarek, C. Berissi, H. and Penman, S. 1977. Sexual differentiation in differentes areas of the brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74:4801-4805.
102. Kerr, J.F.R., Wyllie, A. H. & Currie. A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:239-257.

103. Kimura, D. 1992. Sex differences in brain. *Scientific American*. 267:119-125.
104. Kondo, Y., Sachs, B.D. y Sakuma, Y. 1997. Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. *Behavioral Brain Research*. 88:153-160.
105. Korach K. S. 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*. 266:1524-1527.
106. Korsmeyer, S. 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. 59:S1693-S1700.
107. Kruijver, F., De Jonge. F., Van den Broek, W., Van der Woude, T., Endert, E. y Swaab, D. 1993. Lesions of the suprachiasmatic nucleus do not disturb sexual orientation of the adult male rat. *Brain Research*. 624: 342-346. LeVay, S. (1991). A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science*. 253:1034-1037.
108. Kuhnemann, S., Brown, T.J., Hochberg, R. B., MacLusky, N. J. 1994. Sex differences in the development of estrogen receptors in the rat brain. *Home. Behav.* 28:453-491.
109. Kuiper, G. G., Enmark, E., Peito-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5925-5930.
110. Kulik, G. & Weber, M.J. 1998. Akt-dependent and —independent survival signalling pathways utilised by insulin-like growth factor I. *Mol. Cell. Biol.* 18:6711-6718.
111. Kurki. P. y Ogata, E. 1988. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 109:49-59.
112. Lauber M., Lichiensteiger, W. 1994. Pre and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expresión in the male rat brain studied by *in situ* hybridization. *Endocrinology*. 135:1661-1668.
113. Lauber, M.E. 1996. Ontogeny of 5 alpha-reductase (type 1) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: early presence in terminal zones. *Endocrinology*. 137:2718-2730.
114. Law, S., Apostolakis. E., Samora, P., O' mAlley, B., Clark, J. 1994. Hormonal regulation of hypothalamic gene expression. Identification of multiple novel estrogen induced genes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 51:131-136.
115. Lawrance, J., Raisman, G. 1980. Ontogeny of synapses in a sexually dimorphic part of the preoptic area in the rat. *Brain Res*. 183:466-471.
116. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf- 1/caspase-9 complex initiates an apoptotic proteasa cascade. *Cell* 91:479-489.
117. Liu X. et al. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 89:175-184.
118. Liu, Y., Salamone, J. y Sachs, B.D. 1997. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J. Neuroscience*. 17:5245-5253.

119. Luine, V. y McEwen, B. S. 1983. Sex differences in cholinergic enzymes of diagonal band nucleic in the rat preoptic area. *Neuroendocrinology*. 36:475-482.
120. Lustig, R. H., Ping. Hua, Wilson, M. y Federoff, H. J. 1993. Ontogeny sex dimorphism, and neonatal sex determination of synapse-associated messenger RNAs in rat brain. *Molec. Brain. Res.* 20:101-110.
121. Ma, 1994*****
122. Majdan, M., Lachance, C., Gloster, A., Aloyz, R., Zeindler, C., Bamji, S., Belliveau. D., Fawcett, J., Miller, F.D. & Barker. P. A. 1997. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 17:6988-6998.
123. Maki Y., Kazunari. Y., Zenro K., Tadashi S. y Mitsuhiro K. 2000. The distributions of apoptotic cells in the medial preoptic areas of male and female neonatal rats. *Neurosci. Res.* 36:1-7
124. Martinou J. C., Dubois-Dauphin M., Staple J. K., Rodríguez, I., Frankowski H., Missotthen M., Albertini P., Talabot D., Catsikas S., Pietra C. y Huarte J. 1994. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron.* 13:1017-1030.
125. Masco, D. y Carrer, H. 1980. Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiology and Behavior.* 24:1073-1080.
126. Matsumoto, A., Arai, Y. 1981. Neuronal plasticity in the deafferented hypothalamic arcuate nucleus of adult female rats and its enhancement by treatment with estrogen. *J. Comp. Neurol.* 197:197-205.
127. McEwen, B. S., Davis, P. G., Parson, B. y Pfaff, D. W. 1979. The brain as a target for steroid hormone action. *Annu. Rev. Neurosci.* 2:65-112.
128. McEwen, B. S. 1981. Neural gonadal steroid action. *Science* 211:1303-1311.
129. McEwen, B.S. 1992. Steroid hormones: effect on brain development and function. *Horm. Res. Suppl.* 3:1-10.
130. McLusky, N. J. and Naftolin, F. 1981. Sexual differentiation for the central nervous system. *Science* 211:1294-1303.
131. Merry, D. y Korsemeyer, S. 1997. Bcl-2 family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:245-267.
132. Michaelidis T.M. et al.,. 1996. Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development. *Neuron.* 17:75-89.
133. Miller, L. y Aokí, A. 1991. Stereological analysis of the hypothalamic ventromedial nucleus. II. Hormone induced changes in the synaptogenic pattern. *Devl. Brain Res.* 61:189-196.
134. Miller, M., Hyder, S.M., Assayag, R., Panarella, S.R., Tousignant, P., Franklin, K.B. 1999. Estrogen modulaies spontaneous alternation and the cholinergic phenotype in the basal forebrain. *Neuroscience* 91:1143-1153.
135. Milner, R. J., Blomm, F. E. and Sutcliffe, J. G. 1987. Brain-specific genes. Strategies and Tissues. in: *Current topics in developmental biology*, Academic Press, Vol. 21 pp. 117-150.
136. Montano M.M., Welshons W. V., vom Saal F. S. 1995. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biol Reprod.* 53:1198-2007.

137. Mooney, S. y Miller, M. 2000. Expression of bcl-2, bax and caspase 3 in the brain of the developing rat. *Dev. Brain Res.* 123:103-117.
138. Moosman, B. and Behl, C. 1999. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:8867-8872.
139. Mor, G., Kohen, F., García-Velasco, J., Nilsen, J., Brown, W., Naftolin, F. 2000. Regulation of Fas Ligand expression in breast cancer cells by estrogen: Functional differences between estradiol and tamoxifen. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 73:185-194.
140. Motoyama, N., Wang, F., Roth, K., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fuji, S. y Loh, D. 1995. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-X-deficient mice. *Science* 267:1506-1510.
141. Murakami, S. y Arai, Y. 1989. Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neurosci. Lett.* 102:185-190.
142. Murphy, D. y Segal, M. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.* 16:4059-4068.
143. Nance D. y Gorski R. A. 1975. Facilitation of female sexual behavior in male rats by septal lesions: an interaction with estrogen. *Horm. Behav.* 6:289-299.
144. Nance, D. M., Phelps, C., Shryne, J., y Gorski, R. A. 1977. Alterations by estrogen and hypothyroidism in the effects of loose septal lesion on lordosis behavior of male rats. *Brain Res. Bull.* 2:49-53.
145. Nauta, H. y Haymaker, W. 1969. Hypothalamic nuclei and fiber connections. En: *The hypothalamus.* Haymaker, Anderson y Nauta. (Eds.). Springfield, 111. N.Y. 179-241.
146. Nielsen, D. A. and Shapiro, D. J. 1990. Insights into hormonal control of the stability of the mRNA. *Molec. Endocrinol.* 4:953-957,
147. Nielsen J., Mor G. y Naftolin F. 2000. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J. Neurobiology.* 43:64-78.
148. Nishizuka, M.; Sumida, H.; Kano, Y. y Arai, Y. 1993. Formation of neurons in the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area of the rat: effects of prenatal treatment with testosterone propionate. *J. Neuroendocrinol.* 5:569-573.
149. Nolten, J. 1994. *El cerebro humano.* Editorial Mosby-Doyma. España.
150. Nuñez y del Paso, 1998.*****
151. Oomura, Y., Aon, S., Koyama, Y., Fujita, I. y Yoshimatsu, H. 1988. Central control of sexual behavior. *Brain Research Bulletin.* 20:863-870.
152. Oppenheim R.W. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501.
153. Parker M. A., Scarlett J. L., Martín S. W. y Murph M. P. 1998. Induction of the mitochondrial permeability transition by peroxynitrite. *Biochemica. Society Transaction.* 25:909-914.
154. Parsadanian, A.S., Cheng, Y., Keller, Peck C.R., Holtzman, D.N. and Snider, W.D. 1998. Bcl-_{X_L} is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J. Neurosci.* 18:1009-1019.

155. Patrone. C., Pollio, G., Vegeto, E., Enmark, E., Curtis, I., Gustafsson, J. y Maggi, A. 2000. Estradiol induced differential neuronal phenotypes by activating estrogen receptor α or β . *Endocrinology*. 141:1839-1845.
156. Pelliter G., Liao N., Follea N. y Govindan M. 1988. Mapping of estrogen receptor-producing cells in the rat brain by "*in vitro*" hybridization. *Neurosci. Lett*. 9:23-38.
157. Perrot-Sinal, T., Davis, A., Gregerson, K., Kao, J. y McCarthy, M. 2001. Estradiol enhances excitatory gamma-aminobutyric acid mediated calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 142:2238-2243.
158. Pettersson. K., Grandien, K., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A. 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol*. 11:1486-1496.
159. Pfaff, D., Keiner. M. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol*. 151:121-158.
160. Pfaff. D. y Sakuma, Y. 1979. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol. London*, 288:189-202.
161. Pfaff, D. W. 1980. *Estrogens and Brain Function. Neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior.* Springer-Verlag. New York, Heidelberg, Berlin. 123-268.
162. Pfaff. D. y Schwartz-Giblin, S. 1988. Cellular mechanisms of female reproductive behaviors. En: *The physiology of reproduction*, editado por E. Knobil and J. Neil et al., Raven Press, Ltd., New York, 1487-1568.
163. Pfeiffer, C. 1936. Sexual Differences of the hypophysis and their determination by the gonad. *Am. J. Anat*. 58:195-225.
164. Pike, C.J. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-XL expression and beta- amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. 72.1552-1563.
165. Raap, D.K., DonCarlos, L., Garcia, F., Muma, N.A., Wolf, W.A., Battaglia G., van de Kar L.D. 2000. Estrogen desensitizes 5-HT1A receptors and reduces levels of Gz, Gil, and Gi3 proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacology*, in press.
166. Rainbow T., Parson, D., McEwen, B. 1982. Sex differences in rat brain oestrogen and progestin receptors. *Nature (Lon.)*. 300:648-649.
167. Raisman, G. and Field, P. M. 1973. Sexual dimorphism in the neuropil area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain. Res*. 54:1-29.
168. Reed, J. 1997. Double identity for proteins of the bcl-2 family. *Nature*. 387:773-776.
169. Reed. J.C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17:3225-3236.
170. Resiert, J, and Pilgrim Ch. 1991. Sexual differentiation of monoaminergic neuro-genetic or epigenetic? *Trends Neurosci*. 14:468-473.
171. Reuben, W., Rhjees, J. Shrine E., and Gorski, R. A. 1990. Onset. perineal period hormo-sensitiv to sexual differentiation of dimorphic nucleus of preoptic area in female rats. *J. Neurobiol*. 21:781-786.

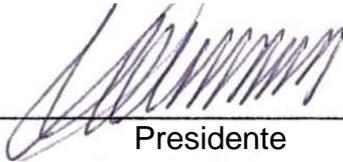
172. Rhoda, J., Corbier, P. and Roffi, J. 1984. Gonadal steroid concentration in serum and hypothalamus of the rat at birth aromatization of testosterone or 17- β Estradiol. *Edocrinol.* 114:1754-1760.
173. Rivera, J. y Henderson, L. 1998. Androgenic steroids differentially modulate GABA-mediated transmission in the VMN and the mPOA of the female rat brain. *Soc. Neurosci. Abst.*
174. Robinson, S. M. Fos, T. O., Dikkes, P., Pearlstein, R. A 1986. Sex differences on the shape of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and suprachiasmatic nucleus of the rat: 3-D computer reconstructions and morphometrics. *Brain. Res.* 371:380-384.
175. Rodriguez M., Vergara O., Chavarria M., Rosado A y Reyes A. 1998. Changes in hypothalamic calmodulin concentration induced by perinatal hormone manipulation in the rat. *Pharm. Biochem. and Behav.* 61:1-6.
176. Rodriguez Medina M. A. Alejandro Reyes, Ma. Eugenia Chavarria, Marcela Vergara-Onofre, Enrique Cachola, E. y Adolfo Rosado. 2001. Asymmetric calmodulin distribution in the hypothalamus. Role of sexual differentiation in the rat. *Pharmacol. Biochem Behav.* 72:1-7
177. Rudel, T., & Bokoch, G.M. 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-1574.
178. Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., Redeuilh, G. 1999. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a CAMP response-like element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96.11217-11222.
179. Saidapur S. K. 1978. Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 54:225-244.
180. Sherwin, B. y Tulandi, T. 1996. "Add back" estrogen reverses cognitive deficits induced by gonadotropin releasing hormone agonist in women with leiomyomata utery. *J. Comp. Endocrinol. Metab.* 81:2545-2549.
181. Shimizu S., Narita M. y Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Letters to Nature* 399:483-487.
182. Shughrue, P.J., Dorsa, D. M. 1993. Estrogen modulates the growth associated protein GAP-43 (neuromodulin) mRNA in the rat preoptic area and basal hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 57:439-447.
183. Skinner E. 1975. *Neurociencia.* Ed Trillas, Méx.
184. Smith, S., Brenan, C., Clark, A y Henderson, L. 1996. GABAA receptor mediated-responses in the ventromedial nuclei of the hypothalamus of female and male rats. *Neuroendocrinology.* 64:103-113.
185. Sördersten, P., Hansen, S. y Srebro, B. 1981. Suprachiasmatic lesions disrupt the daily rhythmicity in the sexual behavior of normal male rats and male rats treated neonatally with antiestrogen. *J. Endocrinology.* 88:125-130.
186. Sördersten, P., Ashbrook, D. y Backstrbm, T. 1997. Reduced benzodiazepine sensitivity in patients with premenstrual syndrome: a pilot study. *Psychoneuroendocrinology.* 22:25-38.

187. Squier, M., Miller, A., Malkinson, A. & Cohen, J. 1994. Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 159:229-237.
188. Sudo, S., Wen, T. C., Desaki, J., Matsuda, S., Tanaka, J., Arai, T., Maeda, N., Sakanaka, M. 1997. O-Estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neurosci. Res.* 29:345-354.
189. Swaab, D., Siob, A., Houtsmuller, E., Brand, T. y Zhou, J. 1995. Increased number of vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of 'bisexual' adult male rats following perinatal treatment with the aromatase blocker ATD. *Developmental Brain Research.* 85:273-279.
190. Swaab, D.F., Fliers, E. y Partinán, T. 1985. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and dementia. *Brain Research.* 342:37-44.
191. Swanson, L. y Sawchenko, P. 1983. Hypothalamic integration: organization of paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* 6:269.
192. Temple, J., Fugger, H., Li, X., Shetty, S., Gustafsson, J. y Rissman, E. 2001. Estrogen receptor β regulates sexually dimorphic neural responses to estradiol. *Endocrinology.* 142:510-513.
193. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: Enemies within. *Science* 281:1312-1316.
194. Toren-Allerand, C. 1984. On sexual differentiation of the central nervous system morphogenetic consequences of the steroidal exposure and possible role of alfa protein. *Progress. Brain Res.* 61:63-97.
195. Toren-Allerand, C., Singh, M., Setalo, G. 1999. Novel mechanism of estrogen action in the brain. New players in an old story. *Front. Neuroendocrinol.* 20:97-121.
196. Trent D. L., Salyer D., Fleming D. E. and Lephart E. 2000. Pre or postnatal testosterone and flutamide effects on sexually dimorphic nuclei of the rat hypothalamus. *Developmental Brain Res.* 120:261-266.
197. Tsai, M.J. y O'Malley, B. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63:451-486.
198. Van Ness, J. I., Maxwell, H. and Hahn, W. 1979. Complex population of nonpolyadenylated messenger, RNA in mouse brain. *Cell.* 18:1341-1349.
199. VanderHeiden M. G., Chandel N. S., Schumacker P. y Thompson C. B. 1999. Bcl-x_l prevent cell death following growth factor. *Mol. Cell* 3:159-167.
200. Vaux D., Aguila H. y Weissman Y. 1992. Bcl-2 prevents death of factor-deprived cell but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int. Immunol.* 4:821-824.
201. Vergara O., Rodríguez M., Chavarria E., Canchola M., Reyes A., Rosales T. y Rosado G. 2001. Asimetría funcional en la concentración de proteínas, DNA y calmodulina durante la diferenciación sexual hipotalámica y el ciclo estral de la rata. *Academia de investigación en biología de la reproducción, A. C. Acapulco Gro.* 23-26 de Mayo. Ed. UAM-I, Mex. pp. 246-253.
202. Vito, C., Fox, T. 1982. Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain. *Dev. Brain Res.* 2:97-110.
203. Wagner S., Castel M., Gainer H. y Yarom, Y. 1997. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387:598-603.

204. Walton, M.R., Dragunow, M. 2000. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci.* 23:48-53.
205. Wang, Q., Santizo, R., Baughman V. L. y Pelligrino D. A. 1999. Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusión independent mechanisms in rats. *Stroke.* 30:630-637.
206. Watanabe T., Inoue S., Ogawa S., Ishii Y., Hirió H., Ikeda K., Orimo A. y Muramatsu M. 1997. Agonistic effect of tamoxifen is depend on cell type, ERE- promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors α and β . *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 236:140-145.
207. Wickens M. 1990. In the beginning is the end: Regulation of poly (A) additition and remove during early development. *TIBS.* 15:320-324.
208. Wise P., Dubal D., Wilson M., Rau, S. y Liu, Y. 2001. Estrogens. Trophic and protective factors in the adult brain. *Frot. Neuroendocrinol.* 22:33-36.
209. Woolley C.S. 1998. Estrogen-mediated strucyural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm. Behav.* 34:140-148.
210. Yang S., Shi j., Day, A., Simpkins J. 2000. Estradiol exerts neuroprotective effects when administer after ischemic insult. *Stroke.* 31:745-750.
211. Yoshida N., Yuri K., Kizaki Z., Sawada T. y Kawata. M. 2000. The distributions of apoptotic cells in the medial preoptic areas of male and female neonatal rats. *Neurosci. Res.* 36:1-7.
212. Young L., Wang Z. e Insel, T. 1998. Neuroendocrine bases of monogamy. *Trens Neurosci.* 21:71-75.
213. Young L.J., Huot B., Nilsen R., Wang Z., Insel T. R. 1996. Species differences in central oxytocin receptor gene expression: comparative analysis of promoter sequences. *J. Neuroendocrinol.* 8:777-783.
214. Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. & Korsmeyer S. J. 1996. Serine pboosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X_L. *Cell.* 87:619-628.
215. Zhang L., Chang Y., Barker J., Hu Q., Zhang L., Maric, D., Li B. y Rubinow D. 2000. Testosterone and estrogen affect neuronal differentiation but not proliferation in early embryonic of the rat: the possible roles of androgen and estrogen receptors. *Neurosci. Lett.* 281:57-60.
216. Zhou Y., Shughrue P. J., Dorsa D.M. 1995. Estrogen receptor protein is differentially regulated in the preoptic area of the brain and in the uterus during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology.* 61:276-283.
217. Zhu W., Cowie A., Wasfy G., Penn L., Leber B. y Andrews, D. 1996. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *J. EMBO.* 15:4130-4114.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa decidió aprobar la presente tesis el día 27 de junio de 2002.

Dr. Javier Velásquez Moctezuma



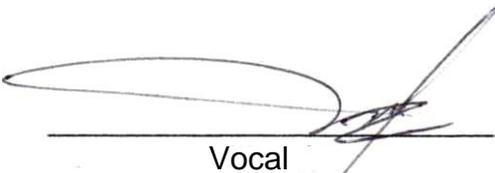
Presidente

M. en C. Marcela Vergara Onofre



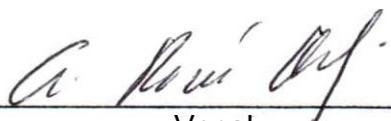
Secretario

Dra. Ana María Rosales Torres



Vocal

Dra. Rocío Ortiz Muñiz



Vocal

Dr. Enrique Cánchola Martínez



Vocal



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS

ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE REGULAN LA APOPTOSIS Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR DURANTE LA DIFERENCIACION SEXUAL HIPOTALAMICA DE LA RATA

En México, D.F. se presentaron a las 10:00 horas del día 27 del mes de JUNIO del año 2002 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

- DR. JAVIER VELAZQUEZ MOCTEZUMA;
- DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES;
- DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ;
- DR. ENRIQUE CANCHOLA MARTINEZ Y
- M. EN C. MARCELA VERGARA ONOFRE

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de Resultados para la obtención del Grado de




Presentó en: BIOLOGIA EXPERIMENTAL

HECTOR ARMANDO HERRERA GUTIERREZ

quien presentó una comunicación de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

Herrera H.A.

HECTOR ARMANDO HERRERA GUTIERREZ
FIRMA DEL INTERESADO

Presentó en: BIOLOGIA EXPERIMENTAL

HECTOR ARMANDO HERRERA GUTIERREZ

quien presentó una comunicación de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

Aprobarlo

REVISO

Carmen Llorens Fabregat

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

VISTO BUENO

Gerardo Saucedo

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
DIRECTOR DE DIVISION

PRESIDENTE

Javier Velazquez Moctezuma

DR. JAVIER VELAZQUEZ MOCTEZUMA

VOCAL

Ana Maria Rosales Torres

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

VOCAL

Alda Rocio Ortiz Muñoz

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

VOCAL

Enrique Canchola Martinez

DR. ENRIQUE CANCHOLA MARTINEZ

SECRETARIA

Marcela Vergara Onofre

M. EN C. MARCELA VERGARA ONOFRE