



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Casa abierta al tiempo

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**BIOLOGIA MOLECULAR DE LA  
DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA  
DE LA RATA. ESTUDIO DEL PADRON DE  
RNAm POLI A Y EXPRESIÓN DE GENES  
HOMEBOX Y RET.**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P r e s e n t a**

**M en B. R. MARCELA VERGARA ONOFRE**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA**

**MAYO DEL 2004**

**BIOLOGIA MOLECULAR DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA  
DE LA RATA. ESTUDIO DEL PADRON DE UNAM POLI A Y EXPRESIÓN DE  
GENES HOMEBOX Y RET.**

## INTRODUCCIÓN

A través del reino animal, la conducta reproductiva es sexualmente dimórfica. Los machos y las hembras se desarrollan típicamente, y además son modelos altamente complejos y estereotipados, de conducta durante una orientación sexual, de cortejo y copula. Otro bien conocido ejemplo de dimorfismo sexual de las funciones cerebrales son las concernientes a los feedbacks que controlan otra serie de sistemas muy importantes en la regulación del proceso reproductivo.

La diferenciación sexual de varios de los componentes del sistema reproductivo es un proceso crítico importante en los procesos de reproducción bisexual. El resultado clásico de los estudios ha demostrado la diferenciación gonadal que es determinada en forma genómica en parte de la mediación de la organización testicular del sistema antigénico de H-Y, que es un factor importante en la diferenciación sexual de la actividad hormonal del testículo. En el caso de los órganos reproductivos internos, cada individuo mamífero, tiene en un momento determinado un sistema primordial de tipo dual en el tracto reproductivo tanto para machos (Wolffian) y femenino (Mullerian). Es bien conocido que los testículos producen una hormona inhibitoria que suprime el desarrollo de los órganos reproductivos internos de tipo femeninos. Sin embargo, los esteroides testiculares estimulan el desarrollo de los conductos Woffianos (Wilson 1981).

En el caso de la diferenciación sexual de los genitales, se involucra un mecanismo diferente; en un punto del desarrollo, tanto los genitales del macho y de la hembra son idénticos y son las hormonas testiculares las que convierten a un primordio genital indiferenciado en aquellos que son típicos del macho, mientras que la ausencia a la exposición a tales niveles hormonales se desarrollará a genitales femeninos, independientemente del sexo genético. Por lo tanto, en los órganos reproductivos internos, son las hormonas testiculares las que determinan la muerte o la sobrevivencia de estructuras anatómicas diferentes, mientras que la exposición de hormonas testiculares masculinizan al primordio genital que inicialmente es común para ambos sexos.

Es claro, que el cerebro es críticamente importante en la regulación de los procesos reproductivos. El proceso de diferenciación sexual podría ser comparado al de los órganos reproductivos internos (por ejemplo, el de la sobrevivencia o muerte de dos diferentes primordios) o al de los genitales (por ejemplo en la modificación del primordio común) o quizás un proceso único que se lleve a cabo para la diferenciación del cerebro.

En conjunto, existen evidencias de la dependencia de las hormonas gonadales sobre los procesos de diferenciación sexual del cerebro y los probables mecanismos por el que las hormonas gonadales influyen en este proceso. Varios de los resultados obtenidos de los estudios de diferenciación sexual en forma estructural en el cerebro y en la espina cordal, ha sugerido que el proceso de diferenciación sexual involucra, en gran parte, la modulación de varios procesos fundamentales del desarrollo de la neurobiología. Para el estudio del fenómeno de diferenciación sexual del cerebro, se ha extendido a diferentes disciplinas científicas y solo puede entenderse en forma multidisciplinaria.

Una división fundamental de los niveles en que está involucrado el cerebro en la reproducción, se pueden dividir en dos procesos regulatorios:

### **a).- Intrínsecos.-**

Los mecanismos de control que puedan ser independiente de cualquier individuo, que involucra al cerebro, pituitaria y gónada, como por ejemplo, la diferenciación cerebral, pubertad, gametogénesis, ovulación, conducta sexual, embarazo y parto.

**b).- Extrínsecos.-**

Aquellos mecanismos en que están involucrados dos individuos, y que pueden ser subdivididos en aquellas interacciones que están involucradas estímulos aferentes o sensoriales primarios o especiales, como el olfato, fotoperíodo, desarrollo visual, vocalización o bien factores sensoriales generales como la estimulación genital y estímulo de succión.

## **DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL CEREBRO**

Con respecto a los mecanismos regulatorios intrínsecos, que al parecer pueden ser utilizados para dividir los procesos reproductivos en varias fases distintas.

Durante la etapa temprana del desarrollo en donde esta involucrada la diferenciación de dos individuos que eventualmente puedan ser capaces de reproducirse cuando alcancen la madurez. Ya que el concepto de diferenciación sexual del sistema reproductivo es bien conocido por los órganos de reproducción tanto internos como externos .

### **DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE LAS FUNCIONES CEREBRALES. DIFERENCIAS : DIMORFISMO SEXUAL.**

Numerosas revisiones han presentado evidencia de la existencia del dimorfismo sexual(Gorski, 1983;Goy, 1980) en la funcionalidad del cerebro y su diferenciación sexual.

El cerebro de los machos ejerce un control tónico sobre la secreción de hormona luteinizante mientras que las hembras presenta un modelo cíclico. Tanto las conductas reproductivas como la secreción de gonadotrofinas son controladas por estructuras específicas del hipotálamo . Centros hipotálamicos están involucrados en la indicación de la conducta reproductiva del macho como de la hembra y son las regiones preóptica medial y el núcleo ventro-medial (Pfaff, 1980). Las interacciones sinápticas entre las neuronas encargadas de la liberación de hormonas gonadotrofinas en el área preóptica y neuronas dopaminérgicas en el núcleo arcuato. Grandes investigaciones con respecto a cambios morfológicos, farmacológicos y fisiológicos en relación a la existencia de circuitos neuronales sexualmente dimórficos que van a formar parte de las bases somáticas que podrían explicar la función cerebral sexo-específica.

El dimorfismo sexual del hipotálamo incluye:

- a).- Tamaño de llamado núcleo dimórfico sexual de la región preóptica (SDN-POA) (Gorski y col. 1980).
- b).- Tamaño nucleolar. Diferencias dimórficas en el núcleo supraquiasmático (Dorner,1968; 1973;Robinson, 1986)
- c).- Número celular y tamaño individual de las neuronas (Gleier y col, 1982: Hammer y col. 1984)
- d).- Conectividad sináptica (Raisman y col. 1973; y col. 1990)

e).- Modelos de encendido funcional en las neuronas (Sakima, 1984)

Además que se le ha dado importancia a los temas concernientes a los neurotransmisores y sistemas de transmisión específica. Estos incluyen:

f).- Diferencias en el modelo dentrítico del área preóptica (Greenough, 1977).

g).- La distribución de neuronas, fibras nerviosas, receptores y sus niveles de turnovers de los neurotransmisores sobre los sistemas monoaminérgicos. (Resiert, 1991).

h).- Diferencias significativas en el número de sinápsis en los núcleos dimórficos (Raisman, 1973).

I).- Actividad enzimática del hipotálamo (Griffiths y col. 1976).

j).- Enzimas marcadores colinérgicas (Luine, 1983),

j).- Así como el papel de las neuronas peptidérgicas y los receptores neuropeptídicos en los procesos de diferenciación (Hausler, 1990; Alexander, 1991).

k).- La presencia de núcleos neuronales dimórficos (Rainbow y col. 1982)

l).- La cromatina unida pueden ser dimórficas sexualmente (Olsen y Whalen 1980).

## REGULACIÓN DE GTH

Aunque la diferenciación sexual en las funciones cerebrales específica se han establecido en diferentes especies, tales como: ratón, cuyo, hámster, oveja, mono rhesus, ferret gerbil y rata (Gorski, 1983), se debe guardar y tener mucho cuidado en la sobre generalización, por lo que nos enfocaremos de una manera más profunda en la rata. Sin embargo, es de esperarse que un entendimiento de la diferenciación sexual del cerebro de la rata, sea aplicable a otras especies.

La regulación del modelo de secreción de gonadotrofinas (GTH) y de la conducta reproductiva en una sola especie, la rata de laboratorio. Estos dos procesos fisiológicos en la rata han sido estudiados de una manera muy amplia. y es en la rata la que ofrece tres sistemas importantes de modelos anatómicos para el estudio de los mecanismos fundamentales de la dependencia a esteroides en la diferenciación sexual y estos son:.

1).- El período de diferenciación sexual en mamíferos varia de especie a especie y puede ser:

a).- Prenatalmente

b).- Perinatalmente

c).- Postnatalmente temprano.

y esto que radicara principalmente sobre el nivel de maduración del sistema nervioso central (CNS) al momento del nacimiento). En la rata, el período de diferenciación ocurre postnatalmente, por lo que uno puede hacer cambios en los ambientes hormonales, sin afectar gónadas (Gorski, 1983, Arnold, 1984).

En la rata, el período crítico coincide con el pico de secreción de testosterona de los testículos fetales al día 18 de vida embrionaria (Weiz y War, 1980).

2).- Al igual que en algunas especies, la diferenciación sexual puede diferir temporalmente, en términos de sensibilidad hormonal y de la identidad de los esteroides gonadales específicos responsables para la diferenciación(Christensen y col. 1978; Gorski y col. 1981), la sensibilidad en la rata, varía en la hembra hasta los 7-10 días, en el macho hasta el 5° día.

3). Aquí, puede ser evidente que la diferenciación sexual de una función determinada en una especie puede ser expresada en diferente magnitud dependiendo de la especie a tratar. Es decir, una especie no agresiva no mostrará diferenciación sexual en la conducta agresiva. Sin embargo, funciones similares pueden ser diferentes entre especies en términos de diferenciación sexual. Quizás el mejor ejemplo es la facilitación del feedback de esteroides ováricos sobre la regulación de GTH. Como se indicará posteriormente, el facilitar el feedback es una característica exclusivamente femenina en la rata pero puede ser expresada tanto en hembras como en machos por ejemplo en el mono rhesus), en la edad adulta en la rata, se pueden hacer inferencias en parámetros, que están perfectamente establecidos, tanto a nivel hormonal, como conductual, y que permiten hacer interpretaciones en la vida perinatal hasta la edad adulta en la rata (Vale y col. 1972; Steiner y col. 1976).

Aunque la diferenciación sexual en las funciones cerebrales específicas se han establecido en diferentes especies, tales como: ratón, cerdo, oveja, mono rhesus, ferret, gerbil y rata se debe guardar y tener mucho cuidado en la sobregeneralización, por lo que nos enfocaremos de una manera más profunda en la rata. Sin embargo, es de esperarse que un entendimiento de la diferenciación sexual del cerebro de la rata, sea aplicable a otras especies (Gorski, 1983).

Es importante enfatizar que la influencia de esteroides perinatales sobre la regulación de la secreción de GTH y conductas reproductivas son ejemplo de un proceso de gran influencia sobre la función cerebral. Y como respuesta a estas diferencias en susceptibilidad hormonal, y que se reflejan como parte de las diferencias sexuales de tipo no reproductiva, tales como:

- a).- La regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal (Nance y col. 1976).
- b).- Conducta agresiva (Barr y col. 1976)
- c).- Marcaje de territorio (Lumia y col. 1977).
- d).- Postura de Micción (Beach y col. 1974)
- e).- Conducta social y de juego (Goy y Resko, 1974)
- f).- Conducta de aprendizaje y/o ejecución (Dawson y col. 1975)
- g).- Postura de la micción (Beach, 1974)
- h).- Lateralización de las funciones del cerebro (especialmente del humanos) (Hines 1982).
- i).- Conducta social y de juego (Goy, 1974).
- j).- Actividad espontánea, reacción a varios estímulos sensoriales,(Beatty, 1979).
- k).-El papel durante la copula ((Ehrhardt, 1978)

1).-La influencia de las hormonas gonadales sobre la alimentación, así como la regulación del peso corporal(Nace, 1975).

Hay numerosas observaciones que indican que la diferenciación sexual del cerebro puede depender sobre todo de la presencia o ausencia de testosterona y esto puede influir sobre:

- 1.- Esteroides adrenales (Rohde, 1989; Grasman, 1991).
- 2.- Factores de crecimiento (Toran-Alleran, 1988).
- 3.- Neurotransmisores(Dorner, 1977; Jarzab, 1990).

Estos pueden interactuar con esteroides gonadales para general o producir cambios permanentes en la organización neuronal..

A fin de discriminar entre los efectos del desarrollo de hormonas gonadales, y el posiblemente otros factores unidos al sexo, se ha sugerido lo siguiente, según investigaciones realizadas por Arnold y Breedlove (1985)

Usando cultivos de tejido neuronal sexo-específico de varias regiones cerebrales los días 14 de vida embrionaria, se han observado que las neuronas catecolaminérgicas de ratón desarrollan funcional y morfológicamente diferencia en sexos en ausencia de testosterona y andrógenos, Debido a que las células fueron llevadas a cultivo antes de que surgiera el pico de testosterona en el feto humano, se ha concluido que la diferenciación ligada al sexo de ciertos fenotipos neuronales puede ser inicialmente independiente de la presencia o ausencia de hormonas gonadales.

## **MODELOS NEURONALES DIMÓRFICOS**

Existen tres sistemas neuronales en que hay unas grandes diferencias en el número y tamaño de las células .y que al parecer presentan dimorfismo sexual durante un período crítico de su desarrollo.

- I.- Regiones del control vocal en el cerebro de pájaro.
- II.- El Núcleo dimórfico sexual del área preóptica en la rata.
- III.- El núcleo espinal del bulbocavernosos en ratas.

Nos enfocaremos al segundo modelo que se encuentra en el área preóptica medial (MPOA) del hipotálamo de la rata. Esta región se ha considerado el sitio probable de la diferenciación por su importancia en la regulación de varias funciones dimórficas sexuales, incluyendo el control de la conducta masculina y la liberación cíclica de gonadotrofinas necesarias para la ovulación. Los resultados como consecuencias de lesiones, también como la acción directa de implantes de esteroides, en la área preóptica de neonatos femeninos, como consecuencia la masculinización de funciones, En el área preóptica es una área altamente poblada y que resulta ser 3-6 veces más grande en machos que en hembras. La densidad neuronal en esta región es más varias veces más grande que en otras regiones incluso cercanas. En base a esto, Gorski y col. en 1980, definieron esta área como un núcleo, el núcleo dimórfico sexual del área preóptica (SN-POA).

La castración de ratas macho recién nacidas produce una reducción significativa (cerca del 50%) en el volumen del SDN-POA en la edad adulta, y que puede ser completamente prevenida por la administración exógena de andrógenos un día de nacida. La sola administración subcutánea de propionato de testosterona exógeno en hembras recién nacidas, significativamente incrementa el volumen del SDN-POA en el adulto. En ambos casos tanto en machos como en hembras, la manipulación del ambiente hormonal, a través de los cambios de volumen, no deja estructuras reversas sexuales. esto podría ser debido a: a).- Posibles factores no

hormonales que puede influir en la diferenciación del SDN-POA. b).- Un requerimiento más grande, más temprano o más prolongado a la exposición de andrógenos en la hembra. C).- para una castración temprana (prenatal) en el caso de las hembras.

El volumen del SDN-POA, no aparece ser sensitivo a los esteroides gonadales en el adulto, aunque sus neuronas acumulen esteroides más rápidamente, que las neuronas alrededor. Así, el tratamiento de adultos gonadectomizados tanto hembras como machos con régimen hormonales, restauran la conducta copulatoria tanto masculina como femenina, y no influye en el volumen en el volumen SDN-POA. Sin embargo, los esteroides modulan la morfológica neuronal en los pájaros adultos y en la espina cordal.

El SDN-POA es un modelo potencial importante en la diferenciación sexual general porque las diferencias sexuales en el volumen del SDN-POA se establecen en la primera semana de vida postdata, casi paralela al periodo funcional de la diferenciación sexual del cerebro. Aunque el núcleo es reconocido como a los 20 días de post-fertilización, no hay diferencias sexuales significativas en el volumen hasta el día de nacimiento (3 días más tarde). Durante los próximos 10 días hay un incremento gradual del 5 veces en el volumen del SDN-POA en los machos. Aunque el volumen del núcleo SDN-POA es casi el doble en la hembra, no hay cambios estadísticamente significativos en la hembra de un día y 10 días después de nacidas. (Jacobson y col. 1980). Este crecimiento es debido a las hormonas de origen testicular

El SDN-POA parece alcanzar su volumen adulto en los 10 días de vida postnatal, pero la maduración de neuronas en el área preóptica en términos de conectividad dentritica, se extiende hasta la 3ª semana de desarrollo postnatal. Se cree que las conexiones neuronales del SDN-POA continúan para formar después las terminación del periodo crítico de la organización inducida por esteroides en este núcleo. Esto no es necesariamente incompatible con el hecho de que los esteroides actúan durante el período crítico para promover el desarrollo de conexiones neuronas necesarias para la sobrevivencia neuronal (Lawrence y col. 1980).

Aunque hay una necesidad para identificar la(s) función (es) de las neuronas en el SDN-POA, y para identificar sus conexiones y especificidad neuroquímica, este núcleo puede ser un valioso modelo para estudiar la diferenciación sexual hipotálamica..

El tercer modelo dimórfico es el núcleo espinal bulbo cavernoso (SNB) y sus conexiones, el núcleo en la espina lumbar cord de la rata, esta compuesta por motoneuronas que inervan a los musculos perineales, el bulbocaversoso y el levator del ano. El complejo levato ani/bulbocavernoso esta conectado exclusivamente al pene del macho, sirve para las funciones sexuales, y esta ausente en las ratas hembras. ,

Se cree que el control "epigenético" del ambiente hormonal no puede ser solo el mecanismo responsable de la diferenciación del cerebro.

Otros factores que los esteroides gonadales, tales como la realización de células autónomas del programa genético sexo-específico debe estar involucrado para explicar la generación de diferencias sexuales. Se ha propuesto que la cascada de eventos celulares tanto intrínsecos como extrínsecos son necesarios para establecer el desarrollo de cerebros femeninos o masculinos (Reisert y Pilgrim, 1991).

## **REGULACIÓN HORMONAL**

Con respecto a la regulación de la secreción GTH en la rata, las diferencias para ambos sexos es clara y dramática.

En la hembra, los niveles de GTH permanecen relativamente bajos hasta la tarde del proestro vaginal cuando hay una descarga masiva de LH (Campbell y Schwartz 1977). en donde se refleja un pequeño incremento significativo en la liberación de hormonas liberadoras de hormona luteinizante (LHRH). el aumento de LH surge como respuesta a un incremento de LHRH y que en gran parte es debido a un incremento en la sensibilidad de la pituitaria a esta hormona de tipo hipotalámico (Castro-Vazquez, 1975). La hormona estimulante de los folículos que se también muestra un modelo de liberación cíclica. Este modelo de ciclicidad de la LH cada 4 o 5 días no se observa en machos intactos. Más importante es la liberación preovulatoria de LH, porque pueden estar disminuida por la administración en forma secuencial de estradiol y progesterona en las hembras ovariectomizadas, pero no en los machos . (Harlan y Gorski, 1977).

Como resultado de investigaciones sobre la ovulación, se estableció la importancia del control neural sobre este fenómeno y su control de la liberación de GTH en las hembras y su importancia en la área preóptica media (MPOA) en el inicio de LH ( Gorski, 1968 a).

El MPOA se considero funcionalmente diferente en los machos genéticos. Estos estudios se basaron en el hecho de que las ratas hembras expuestas a una sola administración de Propionato de Testosterona (TP) a la primera semana de vida, extrauterina, bloqueaba de una manera permanente la ovulación y alteraba la sensibilidad del hipotálamo a posibles estimulaciones eléctricas MPOA (Barracough y Gorski, 1961), y fue Gorski, (1963), quién postuló que los andrógenos tenían un efecto sobre el control cíclico de las gonadotropinas y se sugería que a nivel del MPOA.

Y es hasta los últimos 30 años en donde se han incrementado la importancia del la desarrollo de los conceptos de diferenciación sexual del cerebro. Pfeifer ( 1936) fue de los primeros en demostrar que si a una rata macho genética se gonadectomizaba poco después del nacimiento, y si se trasplantaba tejido ovárico a estos machos, estos podían presentar cuerpo lúteo. Aunque en su interpretación le atribuyo el mecanismo de diferenciación sexual a la pituitaria, habría que recordar que aun no se conocía aún el papel regulatorio del hipotálamo. Actualmente se establece que en el período perinatal, tanto la rata hembra como macho tienen la capacidad potencial para presentar incrementos de LH como respuesta a la acción facilitatoria del feedback de los esteroides ováricos.

Dörner y colaboradores (1968) en un modelo experimental, en donde se inducía la homosexualidad a base de una terapia androgénica de propionato de testosterona a 1.2mg subcutáneamente al tercer día de nacidas en ratas machos castrados inmediatamente después del nacimiento, estos machos desarrollaban una conducta predominantemente femenina, por lo que la deficiencia androgénica esta en el período de diferenciación crítica del hipotálamo

La exposición de hormonas testiculares en el macho, o esteroides gonadales exógenos en la hembra, va a producir cambios permanentes en la capacidad funcional del cerebro de la rata. Las hormonas testiculares en forma endógena deben ser eliminadas ( ya sea por castración ) en los primeros 1-3 días de vida postnatal, mientras que los cerebros de las hembras permanecen sensibles a los esteroides exógenos por 7-10 días postnatalmente, dependiendo de la dosis administrada (Gorski, 1968 b; 1983; Lobl, 1974). Los machos castrados después del 14 día de vida (después de la terminación de la fase de diferenciación sexual) no mostraban alteraciones. en el área preóptica anterior. (Dörner, 1968).

## NIVELES HORMONALES

Esta noción se soportada por el hecho de que la producción de testosterona el feto macho empieza las 8 semanas después de la concepción y el pico es alrededor de la semana 20 (Reinisch y Sanders, 1984). Otros han sugerido que la pubertad como otro periodo de desarrollo sensitivo (Feder, 1984,. Sin embargo, las

diferencias sexuales en la morfología del cerebro y su función se presenta antes de ese tiempo (Seab, 1988; Witelson 1976; Siler-Khoder 1978).

Sin embargo, la posibilidad de que podría ser considerada que hay más que una "ventana abierta" a la sensibilidad y que de acuerdo al grado de sensibilidad y el tiempo exacto de la presentación del período crítico puede ser sexo-específico y podría variar dependiendo de los circuitos neuronales examinados (Lanthier y Padwardhan, 1986).

## PERIODO CRITICO

Existen muchas estructuras cerebrales y funciones que se han mostrado ser dimórficas sexuales. Si la testosterona está presente en el período crítico del desarrollo temprano, ocurre una masculinización y desfeminización de la conducta sexual, cambios en la fisiología reproductiva así como cambios morfológicos en el sistema nervioso central. Si la testosterona está ausente, estas estructuras y funciones son feminizadas. El llamado período crítico de la diferenciación sexual en el cerebro de roedores se ha visto que ocurre en los últimos días de la gestación y los primeros 7 a 10 días postparto. El tiempo exacto del período de diferenciación de las estructuras del SNC se puede dar de acuerdo a

1.- Las diferencias en la temporalidad en términos de sensibilidad (Gorsky, 1985 a, b, 1988)

2.- Puede ser dosis dependiente (Swanson, 1965).

Presumiblemente hay un proceso de comienzo finito y uno de término de diferenciación sexual de cada estructura cerebral o función. Hay una diferencia sexual morfológica en el volumen de un componente del área preóptica del cerebro de rata que se tiñe intensamente. El volumen de este componente, que es llamado núcleo dimórfico sexual del área preóptica (SDN-POA), es varias veces más grande en machos que en hembras.

Los esteroides gonadales afectan el número y especificidad de las conexiones sinápticas en varias áreas del sistema nervioso central de vertebrados y en tales efectos están involucrados en la generación de diferencias sexuales en la conducta y en funciones neuroendocrinas.

En primer lugar, como el resultado de la diferenciación sexual en relación con la conectividad sináptica en el hipotálamo de la rata macho es su modelo tónico de liberación de gonadotropinas, mientras que las hembras tienen modelos de liberación de gonadotropinas de tipo cíclico.

Desde las investigaciones pioneras de los trabajos de Raisman y Field, se conoce que las hembras adultas tienen más conexiones (input) no-estriales en las espinas dendríticas en el área preóptica del hipotálamo que los machos. Estas diferencias son reversibles mediante la manipulación de cantidades de esteroides gonadales disponibles durante los primeros días después del nacimiento.

Semejantes resultados se han reportado en otras áreas hipotalámicas como

- \* Núcleo supraquiasmático. (Gulder, F.H.1982).
- \* Núcleo Ventromedial del hipotálamo. (Matsumoto, 1986).
- \* Núcleo Arcuato. (Matsumoto, 1980).

Las diferencias sexuales en el hipotálamo de rata se cree que se organizan por un aumento perinatal de andrógenos testiculares. La Testosterona pasa al cerebro, alcanzando niveles altos de manera significativa en el hipotálamo de ratas macho comparadas con las hembras recién nacidas.

La diferenciación sexual de la conectividad sináptica puede proporcionar un modelo natural para el estudio de mecanismos celulares de sinaptogénesis. Además se aprovecha de esta posibilidad para estudiar el núcleo arcuato, (un área del hipotálamo, que esta involucrada en el control de gonadotrofina de la pituitaria (Bawer, 1974;Naftolin, 1988),

Contiene neuronas que se unen y acumulan estradiol, y muestran efectos celulares de los esteroides gonadales, así como la el dimorfismo sexual dependiente de hormonas esteroides sexuales, sobre el número de sinápsis..

Sus estudios han revelado, que la organización de la membrana plasmática de la neurona de rata del núcleo arcuato -perikarya- es dimorfica sexualmente. Las membranas de las hembras tienen mayor densidad numérica de pequeñas vesículas intramembranales ( 10 nm) estructuras para representar proteínas membranales) y sitios de unión a Concanavalina A. Diferencias sexuales en la organización de membrana plasmática neuronal son disminuidas por administración perinatal de androgenos a hembras., un efecto que posiblemente resultado de la conversión de andrógenos a estrógenos en el hipotálamo y también por administración de estrógenos a hembras adultas. Según sus resultados, sugieren que las diferencias sexuales en la organización sináptica podría ser un efecto de estrógenos sobre la membrana postsinápticos (García S, 1987, 1989).

De acuerdo a sus análisis cuantitativos, indican que existe dimorfismo sexual en el numero de sinápsis axo-somáticas en el núcleo arcuato, que se mide después de 10 días de vida.. Las hembras en proestro muestran una incremento en la frecuencia de sinápsis axo-somáticas cuando se compara con macho. Estas diferencias se pierden por la androgenización de las hembras a los cinco días. Estos resultados se extienden previas observaciones de las diferencias sexuales en contactos sinápticos en el núcleo arcuato realizado en ratas wistar por Matsumoto y Arai; sin embargo hay una importante diferencia entre sus resultados obtenidos en ratas Wistar y los datos en Sprague-Dawley realizada por nosotros.

Esta discrepancia podrían reflejar diferencias en la capacidad de respuesta de las Sprague-Dawley y las Wistar.o quizás, puede ser crítico el número de conexiones axo-sinápticas sobre las neuronas del núcleo arcuato de acuerdo a los diferentes estadios del ciclo estral (Olmos, 1989)..

Varios mecanismos alternos se han propuesto para explicar la génesis de diferencias sexuales en conectividad sináptica. Los esteroides sexuales pueden afectar la formación y/o eliminación de contactos sinápticos por modulación de estructuras pre y / o postsinápticas, además de que los esteroides gonadales pueden regular el número de neuronas pre y post sinápticas (Nordeen, 1985), y el crecimiento y maduración de dendritas y axones (De Voogd, 1981; Torand-Allerand, 1976, 1983;.

El mecanismo actual que podría ser una combinación de varios efectos pre y post sinápticos. se ha sugerido que una sinaptogénesis activa de contactos axo-somáticos ocurre en las neuronas del núcleo arcuato entre los 10 y 20 días. , de acuerdo a los reportes previos, existe un incremento en el numero de sinápsis axo-dendriticas en el núcleo arcuato de ratas hembras durante el período de desarrollo postnatal temprano, y segun descripciones citologicas, el núcleo arcuato muestra una etapa de franco desarrollo durante los primeros días postnatales (Walsh, 1982, 1989).

El número de terminaciones (inputs)presinápticas en soma de las ratas de diez días de edad, fue similar a todos los grupos experimentales estudiados, indicando que hay una diferenciación sexual en el número de

contactos axo-somáticos no se establece todavía a los 10 días. La diferenciación sexual en el número de sinápsis lleva lugar de una manera consecutiva en el momento en que los niveles de testosterona en plasma y en hipotálamo alcanzan valores bajos (Rhoda, 1983).

Se establece cual o cuales son los mecanismos involucrados en este efecto retrasado o demorado que ejercen los esteroides gonadales sobre la inducción de las diferencias sexuales en el número de sinápsis. El marcada apariencia con respecto a las diferencias de sexos sobre el contenido de partículas intramembranales en el pericarión del núcleo arcuato sugiriendo que la especificidad de la membrana plasmática posináptica podría estar involucrada en la génesis de diferentes sinápsis. Debido a que la androgenización de hembras al día 5 revierte el dimorfismo sexual membranal, las diferencias sexuales en la membrana plasmática neuronal, parece ser dependiente de los niveles de esteroides gonadales perinatales. Sin embargo, estudios en cultivos de monocapa y tejidos sugieren fuertemente que los efectos directos y rápidos de los esteroides sexuales sobre la membrana neuronal, sugiere que las diferencias sexuales en el contenido de partículas están probablemente mediadas, en última parte, por la internacionalización de los componentes membranales (García-Segura 1989).

Se ha demostrado que las diferencias sexuales en la organización de la membrana plasmática del pericarión se establecen al día de nacidas, y estos resultados muestran que la organización de la membrana plasmática fue sexualmente dimórfica a los 10 días de edad. por lo tanto::

La diferenciación sexual de la membrana plasmática en las neuronas arcuatas, precede del periodo de sinaptogénesis durante el cual la diferenciación sexual en el número de sinápsis llegan al soma y se establecern. De acuerdo a la hipótesis de especificación de la membrana postsináptica, el efecto de los esteroides gonadales sobre la membrana plasmática podría ser la señal que induce la diferenciación sexual de las sinápsis.

Varios estudios han demostrado que la modulación de las conexiones aferentes, modulan la concentración de receptores de estrógenos y progestinas en el hipotálamo de los roedores. Las diferencias sexuales en la concentración de receptores a esteroides puede ser por lo tanto, una etapa secundaria de todas las diferencias anatómicas en la conectividad sináptica en las células blanco, una hipótesis consistente en las diferencias sexuales en el número y organización de contactos sinápticos en el hipotálamo y POA (Blautein, 1989)

Por estudios electrofisiológicos de Matsumoto (1980), se indicado que la conectividad neuroal entre la amígdala y el hipotálamo basal medio (MBH) en la rata hembra difiere al del macho, Estos hallazgos sugieren la posible existencia de diferencias sexuales en circuitos neuronales que regulan las funciones gonadotróficas relacionadas con la pituitaria. Se han reportado dimorfismo en la localización de terminales sinápticas que también se encuentran en el núcleo arcuato del hipotálamo, que es uno de los principales componentes del MBH.

Estos resultados, indican que la incidencia de sinápsis axodendríticas son mucho más grandes que las sinápsis axosomáticas en el ARCN,. Dos tipos de contactos axodendríticos se indentificaron: a).- aquellos que se realizan sobre las arborescencias(eje) dendríticas, y b).- aquellas sobre las espinas dendríticas .Y se ha observado que las sinápsis por espinas están con mayor frecuencia en la hembra, aproximadamente dos veces más, que con respecto a los machos. En relación con las sinapsis axosomáticas, ocurre en forma inversa, es significativamente menor en hembras que en machos.

En general, los comentarios anteriores también pueden aplicarse a la conducta reproductiva. En la hembra normal adulta, la acción de hormonas gonadales en el cerebro que inducen receptividad sexual, y que comúnmente es medida por los reflejos de lordosis para estimular a su vez la monta del macho. La lordosis (que sería receptividad sexual al macho por parte de la hembra) puede ser inducida en ratas hembras

ovariectomizadas por exposición a estrógenos exógenos, y aparentemente se potencializa su acción con la exposición secuencial de estrógenos seguida de progesterona ( Gorski, 1974).

Cuando el macho genético es castrado en la edad adulta, y es tratado con hormonas ováricas , rara vez exhibirá la postura de lordosis. Sin embargo, la castración de ratas macho en los primeros días postnacimiento da como resultado en la edad adulta un macho genético con la capacidad de desarrollar conducta lordótica con la misma frecuencia de la hembra genética normal y la exposición de la hembra al propionato de testosterona perinatal reduce su capacidad hasta los niveles masculinos de la conducta lordótica (Barraclough y Gorski, 1962; Feder y Whalen, 1964; Gerall y col. 1977).

Las diferencia entre los sexos con respecto a la conducta masculina es menos marcada en la rata. Muchas hembras normales pueden exhibir conducta de monta (Whalen, 1968). Sin embargo, la exposición a TP exógena presentara varios componentes de la conducta masculina como son: intromisión y conducta eyaculatoria (Christensen y Gorski, 1978). Sin embargo, es posible que mínimo algunas características de la conducta masculina que exhibe la rata hembra adulta normal, puede ser vestigio de su vida intrauterina y su posible exposición a hormonas endógenas de los embriones machos cercanos (Clemens, 1978; Meisel, 1981; Vom Saal, 1983)

Aunque hay más detalles que podrían estar presente, basta con determinar la regulación de LH y la conducta lordótica, la rata hembra como macho, nacen con la potencial capacidad de desarrollar características neuroendocrinas femeninas en la edad adulta. Por lo tanto, en ambos sexos, el cerebro puede presentar cambios permanentes por la exposición de hormonas gonadales en la primera semana de vida postnatal. En contraposición, el animal adulta la acción de esteroides gonadales son transitorios.

## **MECANISMOS DE ACCIÓN HORMONAL**

- a).- Temporal
- b).- Celular.

La importancia de las hormonas dirigiendo y organizando el dimorfismo sexual se ha ilustrado convencionalmente por dos tipos de experimentos:

- a).- Castración de machos genéticos (XY) durante la vida perinatal desmasculiniza y feminiza el substrado para la conducta sexual y feminiza el eje-pituitaria destinada para mediar el modelo de secreción de gonadotrofinas.
- b).- Inyección de andrógenos en hembras genéticas masculinizando y desfeminizando los procesos reproducidos.

Estudios usando implantes cerebral de testosterona (T) en ratas postnatal indican que las esteroides sexuales organizan a hembra y las capacidades de conducta reproductiva del macho por actuar principalmente en dos sitios: el hipotálamo medio basal (MBH) y el area preóptica medial (MPOA).

Varias observaciones indican que varios aspectos del dimorfismo sexual tienen diferentes periodos durante los cuales ellos tienen un periodo de susceptibilidad máxima a los efectos de organización de esteroides perinatales. Por ejemplo, en ratas, los esteroides actúan prenatalmente para virilizar substratos neuronales destinados a la regulación de la conducta sexual, pero no están acompañados por efectos desfeminizantes. En contraste, el potencial de la conducta sexual masculina y los modelos de secreción de gonadotrofinas, parece estar influenciado por la presencia o ausencia de esteroides durante el periodo postnatal temprano.

Los efectos de los esteroides perinatal sobre el SNC pueden ser analizados en términos de acción y tiempo. El sitio primario de acción de las hormonas esteroides incluyen las neuronas que reciben directamente información de moléculas a esteroides. Estas neuronas poseen sitios especiales de reconocimiento a moléculas de codificación de tal información, por ejemplo ellos poseen esteroides intracelulares clásicos. El primer sitio de acción de las hormonas esteroides tanto en hembras como en machos son algunas regiones del hipotálamo; mPOA, amígdala, septum. Sin embargo, los esteroides pueden afectar a grandes dominios si uno considera que los esteroides también actúan brevemente en sitios de reconocimiento sobre las membranas plasmáticas de las neuronas.

La actividad es igual en cuanto a propiedades de desarrollo de un segundo grupo de neuronas, que directamente están influenciadas por esteroides a través de cambios transinápticos o procesos secretorios de neuronas activadas por los esteroides en el sitio primario de acción. Este grupo de sitios secundarios de acción incluyen un número de neuronas que pueden responder directamente a los esteroides.

El análisis de el dominio temporal de esteroides sexuales perinatales revelan tres tipos distintos de respuesta (Beyer, 1987):

- a).- **Respuesta de latencia corta y duración.**
- b).- **Respuestas de latencia media y duración.**
- c). **Respuesta transitoria, seguida por una alteración prolongada de la capacidad de respuesta a esteroides.**

**a).- Respuesta de latencia corta y duración.**

Los esteroide sexuales ( estrógenos, andrógenos, y progestinas) pueden inducir cambios de latencias breves ( milisegundos) en la excitación de las neuronas. Las características temporales de estas respuestas excluyen la participación de síntesis de proteínas. Así, estas respuestas deben involucran la acción directa de niveles membranales que alteran la conductancia iónica o modular el efecto inhibitorio de neurotransmisores

Aunque estos efectos rápidos son entre las más consistentes y de clara acción de los esteroides sobre la función del cerebro, ellos se han considerado para determinar posibles modelos de acción de esteroides sexuales sobre la diferenciación del cerebro.

**b).- Respuestas de latencia media y duración.**

Los esteroides sexuales también pueden inducir efectos neuronales que aparentemente duran horas hasta días. Estos efectos involucran la internalización de los esteroides que se unen a receptores intracelulares en el núcleo. La activación de estos receptores facilita la interacción del complejo receptor-hormona con el genoma, incrementando la transcripción del mRNA y dando como resultando la síntesis de proteínas.

**c).- Respuesta transitoria, seguida por una alteración prolongada de la capacidad de respuesta a esteroides.**

El análisis del dominio temporal de acción de los esteroides sexuales revelan una respuesta característica que puede ser crucial para entender que los efectos de las hormonas esteroides sobre la organización del cerebro. Una respuesta transitoria inicial, puede ser seguida algunas veces por alteraciones prolongadas del tejido blanco, como revelando un cambio en la capacidad del tejido para responder al mismo o a otros estímulos. Tales "efectos de memoria" se han registrado por varios tejidos. Estos efectos consisten de un corte en la

latencia y un aumento de la respuesta a una segunda administración de la hormona. A nivel celular, este cambio en la respuesta esta aparentemente relacionada a un cambio en la estructura de la cromatina que sigue al complejo receptor-hormona para interactuar más eficientemente con sitios específicos del DNA. Este tipo de efecto, es relevante en la diferenciación del cerebro.

Los esteroides gonadales perinatales producen cambios observables en la conducta y en la fisiología que no estan de acuerdo con la primera administración, pero se manifiesta por si mismo por varias semanas o meses después de una segunda aplicación del estímulo hormonal

Phoenix en 1959, presento el importante concepto de la acción de los esteroides gonadales sobre el cerebro, y que es aceptado ahora, él llamo a este proceso de dos manera; un proceso activacional ( que es en forma transitoria) o un proceso organizacional ( que es un proceso permanente). En base ha esto se han dilucidado los efectos activacionales de los esteroides, argumentando que la interacción de los esteroides con receptores específicos y la acción en el genoma neuronal pueden alterar la actividad del RNAm , estimulando o inhibiendo la producción de algunos productos, y a su vez , modificando la funcional neuronal en forma aun desconocida.

## **CONTROL HORMONAL**

### **ESTRADIOL**

La actividad testicular o la administración de TP exógeno masculiniza el desarrollo del cerebro, por lo que es lógico presumir que la testosterona es la especie hormonal de mayor significancia fisiológica. Sin embargo, aunque no parece ser el caso, la Testosterona puede ser reducida a dihidrotestosterona (DTH) o aromatizada a estradiol.

Sin embargo, el mecanismo de acción organizacional de los esteroides gonadales permanece aún desconodida, la mayoría cree que en esta acción permanente estan involucrados receptores a esteroides. Es importante notar, que la hormona gonadal que promueve la diferenciación masculina del cerebro es el estradiol (Gorski and Jacobson, 1981).

Ahora se ve claro que es el metabolito de la testosterona , ( la aromatización de la testosterona a estradiol) el que juega un papel importante para la diferenciación sexual, .

La evidencia para esta propuesta ha sido convincente:

1.- El Benzoato de estradiol es más potente que el propionato de testosterona para inducir cambios en la conducta en la edad adulta, una vez que se ha administrado en la etapa neonatal, al parecer, la aromatización de testosterona a estradiol, es un paso intermedio necesario (Gorski, 1971).

2.- Los metabolitos reducidos tales como la Dihidrotestosterona que tienen la incapacidad de ser aromatizada, parecen ser incapaces o menos efectivos.(Whalen, 1974).

3.- La presencia de una enzima, la aromataasa que esta presente en el cerebro y sería la responsable para pasar de testosterona a estradiol (Naftolin. 1975, Selmanoff . 1977)

4.- El uso de antiestrógenos bloquean la diferenciación sexual masculina cuando se administra al macho perinatalmente(Booth , 1977; Doughty ,1974).

5.- La administración de inhibidores de la aromatasa parece ser que inhiben la masculinización en ratas macho administradas neonatalmente. (Booth, 1977; McEwen, 1977;)

6.- Los antiandrógenos como el acetato de ciproterona también inhibe la diferenciación masculina (Naeumann y col. 1967).

La interpretación de estos resultados podría indicar que la testosterona testicular puede verdaderamente actuar como un andrógeno, pero ha sido reportado que el acetato de ciproterona también inhibe la aromatización, en el hipotálamo de conejo (Naftolin, y col. 1975).

El metabolismo de andrógenos, en particular la vía de aromatización, parece ser jugar un papel importante en la modulación de la acción hormonal. El complejo de aromatasa, muestran una distribución neuroanatómica limitada en la mayoría de los vertebrados superiores, el principal sitio de actividad se localiza en el hipotálamo basal-área preóptica y el sistema Límbico (Roselli, 1985).

La actividad de la aromatasa, es sexualmente dimórfica, en áreas blanco a esteroides como en el área preóptica en roedores en donde la actividad enzimática es 2-3 veces más grande en machos que en hembras en la edad adulta.

Se ha demostrado que la aromatasa se induce por andrógenos cuando se castran machos y son tratados con propionato de testosterona usando dosis fisiológicas, por lo que se sugiere que la diferencia sexual de la actividad de aromatasa preóptica puede ser debido a la diferencia sexual en la circulación de andrógenos en el adulto, además de que se indica que la gonadectomía neonatal tiene el mismo efecto que la castración, aunque se ha visto, que las hembras parecen ser menos sensitivas a la inducción de andrógenos para la actividad enzimática.

Sin embargo, se ha sugerido que hay otras diferencias sexuales en la aromatasa cerebral particularmente en el control hormonal de la actividad enzimática. y finalmente, la interrogante se mantiene, de cual sería la función del papel de la aromatasa.POA en la hembra que tienen niveles relativamente altos en circulación, además se ha demostrado que la aromatasa se incrementa como consecuencia de un tratamiento de andrógenos en hembras intactas adultas (Michael, 1986; Steimer, 1990).

Toran-Allerand (1980a,b) ha demostrado que el estradiol es necesario para el crecimiento de procesos neuronales in vitro y que la AFPes llevada por neuronas

Es por eso, que bajos niveles de estrógenos pueden ser necesarios para el desarrollo y/o diferenciación del cerebro de la rata., mientras que la exposición adicional a estrógenos derivados de la conversión intraneuronal de la testosterona testicular masculiniza al cerebro.

Dohler y col. (1984) demostraron que la administración postnatal de un antiestrógeno como el tamoxifen reduce el volumen del SDN-POA alcanzado por los machos adultos. aunque tratamientos similares con tamoxifen también reducen el volumen del SDN-POA alcanzado por las hembras.

Aunque el posible papel del estradiol en el desarrollo del cerebro de la rata puede parecer un punto menor, es conceptualmente significativo. En la revisión clásica de la diferenciación sexual se asume que el cerebro es inherentemente femenino o en menor grado bipotencial e igual sin en un ambiente hormonal se desarrolla en dirección femenina. En contraste, el cerebro de la rata puede ser neutro y depender de la acción de estradiol para el desarrollo de hembras normales. en cualquier caso, la exposición a altos niveles de estradiol son necesarios para la diferenciación masculina del cerebro.

El área medial preóptica del hipotálamo de la rata macho es varias veces más grande en volumen que la región correspondiente en la hembra. Esta región ha sido determinada en el núcleo dimórfico sexual del área preóptica (SDN-POA). El volumen del SDN-POA puede estar influido por un microambiente hormonal en la vida postnatal temprana. Un macho gonadectomizado en el primer día de vida postnatal reduce de manera significativa su tamaño de SDN-POA en la edad adulta, lo que se denomina un macho feminizado por que exhiba varias características neuroendocrinas de la hembra. y si se le administra propionato de Testosterona (TP) al día 2, de vida postnatal, restaura el volumen a los macho normal. Este proceso de restauración del volumen, presenta un modelo usual para identificar cuando termina el período crítico del desarrollo del SDN-POA en machos. El volumen del SDN-POA en machos normales es de  $24.32 \text{ mm}^3 \times 10^3$  y el de la hembra es de  $6.51 \text{ mm}^3 \times 10^3$ , lo que significa 3.5 veces más grande el del macho con respecto a la hembra. El hecho de que el cerebro sufre un proceso de diferenciación morfológico-hormonal dependiente, así como desde el punto de vista funcional, se habla como un “período de máxima susceptibilidad” o “un tiempo de gran vulnerabilidad hormonal”, marcado como el tiempo de sensibilidad para el desarrollo del SDN-POA es de 5 días en pseudo-hembras y hembras, y luego cae abruptamente la sensibilidad a andrógenos esto se ha visto de manera experimental usando dosis de 500 ug de TP. a machos gonadectomizados y hembras tratadas hormonalmente. Los cambios absolutos en el volumen del SDN-POA seguida por tratamiento androgénico postnatal fue más grande en pseudo-hembra que en hembras, aunque las hembras tratadas con TP al día 4 mostraron un incremento relativo en el volumen similar al observado en pseudo-hembras.

Se ha visto que el termino del período crítico de diferenciación del núcleo espinal del bulbo cavernoso puede ser similar al SDN-POA. El número de células del SNB se puede incrementar significativamente (masculinización) por tratamiento de TP en hembras ratas hembras durante el período postnatal temprano (días 1-5) y tardío (7-11). La terminación del período hormono-sensitivo para la diferenciaicón sexual de varias estructuras dimórficas funcionales, puede diferir con respecto al tiempo. Se ha demostrado que la combinación de tratamiento TP pre y postnatal en hembras es necesario para aumentar el volumen del SDN-POA a un tamaño comparable al macho control. Además se ha visto que la exposición de TP a los 5 días postnatal incrementa de una manera significativa SDN-POA tanto de la hembra como de la pseudohembra, y que hay un incremento considerable en el volumen del pseudohembra que en la hembra, Esta respuesta a más grande a la inyección de TP postnatal puede ser debido a que en el pseudohembra esta expuesta a testosterona endógena prentalmente., estas observaciones son consistentes en el concepto de que pueden ser distintos los períodos críticos prentatal y postanal. , se ha sugerido que la presencia de hormonas durante el período prenatal ( liberación de testosterona plasmática los días 18 y 19 de gestación ) puede para altear la sensibilidad de substratos neurales a la acción hormonal durante el pserído postnatal o puede darse el caso de que las hormonas gonadales funcionen diferente durante el período prenatal que el postnatal . Por ejemplo, las hormonas prenatalmente podrían ser mitogénicas mientras que postnatalmente, ellas podrían actuar actuando para alterar la sobrevivencia y/o crecimiento de procesos neuronales. (Rhees, 1990).

Si se espera que las especie moleculare es el estradiol o la testosterona, y si el cerebro es inherentemente femenino o neutro, es evidente que los esteroides gonadales incluyen, en el número de neuronas que componen al SDN-POA de la rata adulta. Seis posibles mecanismos pueden ser sugeridos:

- 1.- Los esteroides pueden estimular la neurogénesis o prolongar el período en que ocurre la neurogénesis.
- 2.- Los esteroides pueden modular la migración de neuronas recientemente formadas a la región del SDN-POA.
- 3.- Los esteroides pueden promover la sobrevivencia durante el proceso de migración y prevenir la muerte celular mofogenica.

- 4.- Los esteroides pueden modular el reconocimiento sobre el reconocimiento de la superficie celular en los procesos o cualquiera que sea la causa de agregación de neuronas en el SDN-POA.
- 5.- Los esteroides pueden prevenir la muerte celular histogénica.
- 6.- Los esteroides pueden influir en la especificación de neuronas en terminos de funcionalidad y /o identificación neuroquímica.

Datos publicados sobre la neurogénesis del MPOA, indican que es postmitótica en las neuronas de esta región cerca del día 16 de la postconcepción ( Altaman y col. 1978, Anderson, 1978). Se ha visto que la administración de Timidina (H3 ( a hembras embarazadas en diferentes días de gestación, se sacrificaron su crías 30 días después del nacimiento y se analizaron los cerebros autoradiográficamente, (Jacobson y Gorski, 1981) confirman que la neurogénesis en el MPOA en general cesa a los 16 días postconcepción, la neurogénesis de aquellas neuronas que forman el SDN-POA fue específicamente prolongado. y se observa que continua la neurogénesis hasta el día 20 de la gestación.(Jacobson y col. 1982) encontro dos diferencias sexuales significativas en la aparente neurogénesis, en el SDN-POA, cuando la inyección de Timidina H3 ( se inyecta en los días 14 de gestación, el índice de la marca del SDN-POA es mayor en las hembras que en los machos, y esta diferencia sexual se revierte a los 17º días de gestación (Jacobson y Gorski, 1981). Prenatalmente el día 17 de gestación esta cercano al momento de marcaje de la diferencia de secreción de testosterona como ha observado Weisz y Ward (1980), y esto se podría contribuir a lo observado en las diferencias en la aparente neurogénesis en el día 17.. Sin embargo, estos resultados pueden ser prematuros, ya que en el trabajo w Weiz, las ratas no fueron sacrificadas sino hasta el día 30 de vida, los resultados pueden ser confundidos con factores como la migración y la sobrevivencia, además que el papel altamente complejo de la acción de las hormonas gonadales es promover o prolongar la formación mitotica de las neuronas en el SDN-POA.

El hecho de que la actividad mitótica es dirigida por la formación de neuronas en el SDN-POA se prolonge significa que la exposición de timidina radioactiva sobre el día 18 de gestación marca permanentemente la fracción significativa ( 25-30%) de las neuronas del SDN-POA. Este acontecimiento permite identificar las vías de migración probables de las neuronas del SDN-POA (Jacobson, 1985).

Para identificar las vías de migración, se inyecta timidina radiactiva a una serie de ratas embarazadas el día 18 de gestación y se sacrificaron sus crías a diferentes edades, dos horas después de la inyección, las células marcadas se encontraban en el límite del tercer ventrículo y durante el curso de las dos semanas próximas, las células marcadas aparecen del cerebro medio a la base del tercer ventrículo, alrededor del tejido neuronal,afuera se lateralizan y se colocan en forma dorsal para alcanzar al SDN-POA. El destino de estas neuronas es desconocida. ellas pueden migrar más alla de los bordes laterales del MPOA,

Aunque los mecanismos de sobrevivencia durante los períodos de muerte neuronal no son entendidos completamente, sin embargo, es útil el concepto de neuronas como una sustancia neurotrófica que existe en cantidades limitadas en áreas blancas, (Hamburgén y Oppenheim, 1982).

La muerte celular fisiológica ocurre durante el desarrollo, por lo que determina una disminución muy significativa en la citoarquitectura del tejido y organos en el organismo adulto.El sistema nerviosos de vertebrados, sufre de muerte celular, lo que balancea la mitosis y soluciona la ontogenia del cerebro. Existen zonas que son sobrepobladas por neuronas, y luego son reducidas al número apropiado para sus funciones (Williams, 1988)

Es donde ha tomado importancia la apoptosis, lo que se describe como una forma de muerte celular, que tiene características morfológicas y bioquímicas definidas. Las células que sufren apopstosis pasan a través

de etapas de reconocimiento celular que incluye encogimiento celular, formación de heterocromatina acompañada de trozos de membrana nuclear. Finalmente, el núcleo fragmentado en pequeñas partes, condensado, forma cuerpos apoptóticos que se unen a la membrana y son eliminados por apoptosis. Las características bioquímicas de estos son menos definidas, pero se han caracterizado por fragmentación de DNA que esta asociada con morfología apoptótica. El DNA nuclear es fragmentado en pequeñas nucleosomas de aproximadamente 200 bp y múltiplos de eso, generando grupos 3'OH en la hebra fragmentada. La fragmentación del DNA puede ser extraído y analizado por electroforesis de gel de agarosa y revelar las características del modelo patrón del DNA. El proceso de apoptosis es usualmente asincrónico en poblaciones celulares. In vivo, las células apoptóticas son eliminadas rápidamente por fagocitosis y están presentes por un período limitado de tiempo. El análisis de muerte celular en el sistema nervioso, se han limitado a cuantificar la muerte celular y por medio de análisis ultraestructurales (Appley, 1977; Wood, 1993).

El desarrollo del cerebelo de ratón ha sido bien caracterizado en términos de porcentaje y disminución de mitosis neuroblásticas, hay pérdida celular bien documentada con la maduración de la capa de células granulares durante las primeras semanas de vida postnatal. La mayor reducción reconocida es en la tercera y la quinta semana, disminuyendo las poblaciones celulares entre 20-30% de las poblaciones iniciales y corresponden al bajo pero consistente número de células granulares picnóticas que se observan durante todo este tiempo. El detectar la fragmentación de DNA internucleosoma es una señal de apoptosis, sin embargo, la correlación entre apoptosis morfológica y fragmentación de DNA permanecen inciertos. El rasgo morfológico distintivo de la apoptosis puede preceder de la fragmentación nucleosomal; se ha observado en algunos casos de muerte celular programada, que la fragmentación del DNA puede no ser detectada. Dentro de la apoptosis morfológica, se ha asociado otros daños al DNA, como rompimiento de una cadena de DNA y rara vez a las dos cadenas (Wood, 1993).

Hay tres tipos de muerte celular distinta de la necrosis que se han descrito en el sistema nervioso central. **Muerte celular apoptótica**, que se encuentra en la retina (Cunningham, 1982) y en el colliculus superior de la rata postnatal (Giordano y col. 1982). **Muerte celular autofágica**, que es caracterizada por la presencia de vesículas autofágicas y aparece en el núcleo istmo-optico del pollo seguida por un aumento en colchicina, este tipo de muerte celular esta asociada con picnosis nuclear y un agrupamiento de cromatina como es la apoptosis. (Hornung, 1989), y la **Muerte celular citoplasmática**, que ocurre en el embrión de pollo, en las células ganglionares, y esta caracterizada por dilatación en el complejo nuclear y en el Aparato de Golgi, dilatación del retículo endoplásmico, incremento del volumen de la mitocondria y aumento de los granulos en el núcleo, y estos se ven incrementado de acuerdo a su etapa de avance de la muerte celular (Hornung, 1989).

### ALFA-FETO PROTEINAS

Las observaciones de los niveles de estradiol son altos tanto en machos como en hembras neonatales y existe un mecanismo de protección para las hembras, que están en un ambiente con altos niveles de estrógeno. Se ha observado que en las ratas la presencia de una alfa feto proteína (AFP) que se une específicamente a estradiol y esta presente en altas concentraciones durante las primeras semanas de vida postnatal (Nuñez, 1971; Ojeda, 1975; Plapinger, 1973).

Se ha considerado que muchas de las AFP funcionales secuestran al estradiol en el plasma y la testosterona producida por los testículos como no tienen afinidad por la AFP puede entrar a las neuronas y por lo que es aromatizada localmente a estradiol, por lo que se ha dado un papel importante a la AFP en el proceso de diferenciación sexual.

### MECANISMOS DE ACCION ORGANIZACIONAL DE LOS ESTEROIDES GONADALES

Aunque el concepto de diferenciación sexual a nivel funcional en el cerebro se estableció desde hace bastante tiempo, los estudios de los posibles mecanismos de acción hormonal aun no han sido del todo satisfactorios.

Gorski, en 1971, investigó el tiempo de exposición de TP exógeno necesario para masculinizar al cerebro, además de que demostró que varios agentes podían atenuar la acción del TP, y entre estos agentes están los barbicituratos, resepina, clorpromazina y el antiandrogénico el acetato de ciproterona.

Aunque parecía que en estos estudios se requería la exposición de TP por 6 a 12 horas era necesario, Hayashi y Gorski (1974) implantaron en forma directa TP cristalizada en el hipotálamo de ratas a manera de que permitiera remover el tiempo del implante, y permitió determinar el tiempo necesario para la exposición y se vio que era de 3 días necesarios para masculinizar al cerebro.

La administración de antibióticos tales como la actinomicina D o la cicloheximida también atenuan el efecto del TP, por lo que se ha sugerido que la síntesis de proteínas podría estar involucrada (Gorski, 1971).

Además, Ladoski en (1970) administró clorpromazina en ratas macho de 1 a 10 días de vida extrauterina, y reportaron que podía revertirse el efecto de masculinización, por lo que se podía sugerir que el concepto de exposición hormonal podría ser una muestra de eventos coordinados tempranamente que conducen a la diferenciación masculina. Incluso otros investigadores han realizado esfuerzos para determinar si la diferenciación sexual dirige alteraciones en la forma en que las neuronas procesan la información de los esteroides en la edad adulta.

## RNA

No mucho después de que Meischer descubriera aquella sustancia que luego resultó ser el DNA, Felix Hoppe-Seuler, un científico del mismo laboratorio descubrió otra sustancia muy similar al DNA. Esta última sustancia, ahora conocida como RNA, fue aislada en primer lugar a partir de levadura y más tarde de bacterias y plantas. Durante mucho tiempo se pensó que el RNA estaba ausente de los animales, cuando se descubrió su presencia en animales se creyó debida al alimento vegetal. Este punto de vista prevaleció hasta 1914, cuando Robert Feulgen descubrió un colorante que teñía el DNA pero no al RNA, y otro que teñía solo en RNA; al teñir células con ambos colorantes descubrió la presencia conjunta de DNA y RNA en todas las células.

El esqueleto covalente del RNA consiste en un polímero lineal de unidades ribonucleotídicas unidas mediante enlaces fosfodiéster 5'-3'. En este aspecto el DNA y el RNA son idénticos; no obstante, el RNA se diferencia estructuralmente del DNA en tres puntos importantes:

- 1.- El grupo azúcar del RNA es la ribosa, y no la 2'-desoxirribosa
- 2.- La timina se sustituye por uracilo (U) en lo referente a las bases nitrogenadas. La timina posee un grupo metilo en el C-5 cuya sustitución por un hidrógeno resulta en el uracilo. Las bases nitrogenadas comunes del RNA son la adenina, el uracilo, la guanina y la citosina.
- 3.- Las moléculas de RNA son generalmente monocatenarias. Sin embargo, en una única cadena de RNA el apareamiento de bases de Watson-Crick puede ocurrir entre la adenina-uracilo y entre la guanina-citosina y resultar en toda clase de estructuras secundarias, entre las que cabe citar las estructuras en bucle y en horquilla que participan en el reconocimiento del RNA por proteínas.

Unas cuantas moléculas de RNA son bicatenarios y su conformación es análoga a la del A-DNA. En este sentido la doble hélice del RNA completa una vuelta cada 11 pares de bases; los pares de bases se encuentran inclinados lejos del eje central de la hélice, de forma que permite la solvatación de los grupos hidroxilos del C-2' de los azúcares. La existencia de una hélice doble de RNA similar al B-DNA no es posible debido a que los grupos 2' hidroxilo no se encontrarían solvatados.

Estructuras helicoidales bicatenarias en las que una cadena de DNA y la otra RNA existen en las células en varios momentos. Por ejemplo, en la transcripción se forma una molécula del RNA, copia de una cadena de DNA en una reacción catalizada por la RNA Polimerasa, de forma que la molécula de RNA sintetizada es complementaria a la de DNA y, por lo tanto durante el proceso de elongación se forma un híbrido pequeño gracias al apareamiento entre la dA y la U, la dT y la A, la dC y la G y la dG y la C. Durante el estudio mediante difracción de rayos X de híbridos sintéticos grandes de RNA y DNA se observó que adoptaban la conformación común al RNA y al DNA, es decir, la conformación conocida como A.

Un gene puede ser definido como una unidad de DNA sin un cromosoma, que puede ser transcrito y producir RNA que sirva para funciones particulares en una célula, el RNA ribosomal o el RNA de transferencia cuya función es directa, o el RNA mensajero que es traducido a una proteína. Uno de los más importantes observaciones de la mayoría de los genes de eucariotes fue que la secuencia de DNA codificaban a las moléculas del RNA de las células eucarióticas se sintetizan como transcritos primarios de gran tamaño que deben ser procesados a moléculas maduras de RNA. Estos productos primarios de transcripción, de gran longitud, se encuentran en el núcleo y se conoce como RNA nuclear heterogéneo (hnRNA). El procesamiento del hnRNA implica cuatro tipos generales de procesamiento:

- a).- modificación covalente de nucleótidos,
- b).- adición de nucleótidos,
- c).- escisión de nucleótidos
- d).- "splicing".

En los eucariotes, el procesamiento del hnRNA va seguido del transporte del RNA resultante a través de los poros de la membrana nuclear, ya que el hnRNA se sintetiza en el núcleo y el RNA debe ser traducido en el citoplasma. Este proceso de la transcripción y la traducción en los eucariotes es desventajosa, puesto que el transporte del RNA del núcleo al citoplasma aumenta el tiempo durante el cual dichas moléculas de RNA se encuentran expuestas a la acción de nucleasas degradativas. Sin embargo, la separación es ventajosa en tanto en cuanto permite que el procesamiento finalice en el núcleo antes de que el RNA interactúe con la maquinaria de traducción.

El hnRNA eucariótico resulta modificado mediante una serie de procesos que aumentan su estabilidad. Puesto que en gran parte de las nucleasas que degradan el RNA son exonucleasas, una manera de aumentar la estabilidad del RNA es la de modificar químicamente sus extremos, de forma que ya no sean accesibles al ataque por parte de las enzimas.

Solamente, los mRNAs maduros son transportados fuera del núcleo. Por lo tanto la maduración posttranscripcional del mRNA de hnRNA involucra:

- a).- Splicing
- b).- Estructura cap
- c).- Metilación interna
- d).- 3' poliadenilación

y todas estas modificaciones parecen ser esenciales para el transporte del mRNA.

### **a).- Splicing**

Aunque los transcritos primarios de un gen contienen secuencias tanto de exones como de intrones, los mRNA maduros contienen secuencias exónicas y residuos en el citoplasma donde ocurre la translación. La maduración del transcrito primario ocurre en el núcleo, dejando la producción de un RNA maduro, que es luego transportado al citoplasma. Uno de los aspectos claves de la maduración del RNA es la eliminación de las secuencias intrónicas por un proceso conocido como "splicing". El orden en que las secuencias intrónicas son removidas, varía de una especie de RNA a otras, pero el proceso es secuencial. El mecanismo químico por el que ocurre parecen estar involucradas pequeñas moléculas de RNA que reconocen secuencias específicas y/o estructuras en las uniones intrón-exón (Shröder, y col. 1987). Comúnmente las secuencias conocidas como secuencias consenso son las que se encuentran tanto en las terminaciones 5'-(GT) y 3'-(AG) de los intrones. La fidelidad de precisión de un splicing de las uniones exon-intrón es crucial. Un splicing inapropiado podría conducir a una inserción o deleción de aminoácidos en la producción de la proteína final o alterando la secuencia de aminoácidos. La razón para la presencia de las secuencias que intervienen en los genes eucarióticos no ha sido establecido. Sin embargo, en algunos genes, sirven para separar estructuras específicas y/o dominios funcionales de la proteína resultante. Un segundo evento posttranscripcional, ocurre en el núcleo durante el curso de maduración del RNA es la metilación.

La eliminación de intrones y la unión de exones, es catalizada por pequeñas partículas nucleares ribonucleoproteicas (snRNPs) y de un número de factores de splicing no-snRNP proteicos.

Los pre-mRNA producidos por la transcripción Poli II contienen secuencias conservadas en los sitios de splicing 5' y 3' y una región conservada cerca del sitio de splicing 3' en el intrón llamado "branchpoint". Estas secuencias conservadas están reconocidas por factores snRNPs y no-snRNP y ellos ensamblan al pre-mRNA para formar un spliceosoma. El ensamblaje de snRNPs en pre-mRNA para formar un spliceosoma ocurre en un orden específico de la vía que culmina en la remoción de secuencias intrónicas y ligación de secuencias exónicas. En relación a los snRNPs, un gran número de factores proteicos se han identificado que son necesarios para ensamblar al spliceosoma y para el "splicing".

Varios estudios *in vitro* como *in vivo*, han contribuido para demostrar que los snRNAs son esenciales para el splicing y han ayudado a identificar regiones específicas de snRNAs que son importantes para esta función nuclear. El mecanismo por el que los oligonucleótidos inhiben el splicing es vía la degradación de snRNAs a través de la actividad de la ribonucleasa II (O'Keefe, 1994).

Los intrones de algunas moléculas de hnRNA, tales como los del hnRNA de las globinas, son retirados en el mismo orden en el que son transcritos. Sin embargo, éste no es el caso de los intrones de muchas otras moléculas de hnRNA. Puesto que los productos primarios de transcripción nacientes se asocian con proteínas para formar los hnRNPs, se cree que el orden en el cual los intrones son escindidos depende de la estructura secundaria y terciaria de los hnRNPs. Así, la escisión de un intrón puede alterar la estructura del RNA, haciendo un segundo intrón pase a estar disponible para ser retirado. Además, el orden de escisión puede estar determinado termodinámicamente; algunos intrones poseen una vida media de unos pocos segundos, mientras que otros pueden ser de 10 a 20 minutos. El "splicing" completo del RNA precursor del mRNA de las globinas tienen en unos cinco minutos.

Algunos genes son capaces de codificar para más de una proteína, dependiendo de cómo el producto primario de transcripción es procesado al mRNA maduro. Algunos precursores del mRNA que contienen un gran número de exones pueden sufrir un proceso de "splicing" que como resultado la producción de distintas moléculas del mRNA que codifiquen para moléculas de proteínas diferentes. Este fenómeno se

conoce como "splicing diferencial". Así por ejemplo, gen de la tropomiosina I en *Drosophila* codifica para dos proteínas musculares relacionadas, una se expresa durante el desarrollo embrionario y otra que se encuentra en el músculo torácico de las moscas adultas. Estas proteínas difieren al menos 27 aminoácidos y, el hecho de que se sintetice una u otra proteína depende de que se retire o no el tercer exón durante el proceso de "splicing". Otros productos primarios de transcripción que pueden sufrir "splicing" diferencial para generar proteínas distintas son, por ejemplo, los de los genes de la fibronectina, la troponina y la cadena ligera de la miosina en la rata. Todavía no se conoce la razón última por la cual ciertos intrones pueden perderse o no durante el procesamiento de los precursores del mRNA.

#### **b y c).- Estructura Cap, y metilación interna.**

Los extremos 5' terminales de los transcritos primarios del hnRNA eucariótico son modificados covalentemente antes incluso de que la transcripción haya finalizado completamente. El extremo 5' terminal del producto primario de transcrito contiene un residuo de nucleósido trifosfato (en general purina) que actúa como cebador para que la RNA polimerasa II lleve a cabo el proceso de transcripción. Así, la modificación del extremo 5' terminal comienza con la excisión del grupo fosfato terminal de este resto trifosfato por acción de una fosfohidrolasa. El grupo 5'-difosfato resultante reacciona entonces con el 5'-5' trifosfato. Esta reacción está catalizada por la enzima guaniltransferasa, y la estructura resultante recibe el nombre de "cap".

Dicha estructura "cap" es modificada de diversas formas. En algunas especies de eucariotes, la mayor parte de los precursores del RNAm son modificados covalentemente a nivel de la posición N-7 de la guanina recién añadida mediante la adición de un grupo metilo procedente de la S-adenosilmetiotina, el compuesto que se emplea como donador de grupos metilos. Esta estructura metilada se denomina "cap" 0, la cual puede ser a su vez modificada de una forma u otra, según la especie que se trate, para dar lugar a otras estructuras derivadas. Así la metilación del grupo hidroxilo del último nucleótido del transcrito original da lugar al "cap" 1, mientras que la metilación de los grupos 2'-hidroxilo de los dos últimos nucleótidos del transcrito original genera el "cap" 2. Únicamente los precursores del RNAm resultan modificados de esta manera.

Las estructuras "cap" intervienen en diferentes procesos. Puesto que el enlace 5'-5' trifosfato deja expuesto un único grupo 3'-hidroxilo, el "cap" protege al RNAm de las actividades 5'-exonucleolíticas al bloquear el extremo 5' terminal de la molécula. Así mismo, el "cap" convierte a los precursores del RNAm en sustrato de las siguientes etapas nucleares del procesamiento, incluyendo el "splicing". Además las moléculas de RNAm maduro conservan el "cap" ya que sirve de centro de acople a los ribosomas durante la síntesis de proteínas,

#### **d).- Poliadenilación.**

Los precursores del mRNA eucariótico resultan también modificados a nivel de sus extremos 3'-terminales. Una vez que la RNA polimerasa II ha sobrepasado el extremo 3'-terminal de la región codificadora del DNA, el RNA recién sintetizado es escindido por una endonucleasa cerca de un sitio específico cuya secuencia consenso es AAUAAA o AUUAAA. Este proceso suele tener lugar a una distancia de unos 10 a 20 nucleótidos más abajo de esta secuencia consenso y depende probablemente tanto de secuencias adicionales como de la estructura secundaria del precursor del mRNA. El extremo 3' terminal así generado en la molécula de RNA puede ser utilizado como cebador para la adición de un gran número de residuos de adenosina en reacción catalizada por la poli A polimerasa. En este proceso, que requiere ATP, se pueden añadir hasta 250 nucleótidos para formar una cola de poliadenilato conocida como cola de poli A.

La poliadenilación es un proceso que no suele estar acoplado a la terminación de la transcripción, ya que la transcripción puede continuar cientos y cientos de nucleótidos más lejos del sitio de ruptura 3'-terminal. Sin

embargo, en algunas especies de levaduras, los sitios de terminación de la transcripción suelen estar situados cerca de los sitios de poliadenilación, lo que sugiere que en dichos organismos ambos procesos se encuentran acoplados.

Sin embargo, existe la evidencia de la presencia de mRNA sin la cadena de poli A, y se le ha designado como mRNA poli A-. Con muy pocas excepciones, toda las moléculas maduras del mRNA contienen colas de poli A cuya longitud es variable.

Cambios en la translación junto con la destrucción de ciertos mRNAs, determinan que proteínas son sintetizadas en que células y cuando. Las colas de poli (A) de ciertos mRNAs maternos son prolongados, mientras que las colas de otros RNAm son eliminadas. La adición selectiva de poli (A) es regulada por una secuencia corta en la región 3' sin traducir, mientras que la eliminación de la poli (A) de mRNAs específicos es un ("estado de falla") "default state", que no requiere secuencias específicas. Estos cambios regulados en la longitud de poly(A) parece ser juegan un papel mayor en la regulación de la translación (Wickens, 1990).

La adición de colas de poli A es otra etapa de la maduración en la cual puede alterarse el destino del RNA primario. El gen de la calcitonina ( una hormona paratiroidea) en la rata codifica asimismo para una proteína que se encuentra implicada en la recepción del gusto y que se localiza en el cerebro. Esta segunda proteína se denomina proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP) y se sintetiza no sólo por "splicing" diferencial, sino también porque se emplea un sitio de poliadenilación alternativo.

Como se menciona anteriormente, la poliadenilación y el splicing pueden ocurrir independientemente, y la poliadenilación no es un requisito para el transporte, porque algunos RNAm no poliadenilados se pueden transportar eficientemente. Algunos mRNAs virales son sintetizados exclusivamente en citoplasma y ahí, son poliadenilados, lo que indica un papel extranuclear para el poli (A). Existen evidencias de una relación de unión entre el poli (A) y su traducción, especialmente en organismos inferiores, y en algunos experimentos se ha sugerido que el poli (A) afecta la vida media de los mRNAs.

El papel del complejo de proteínas PABP (proteínas unidas a poli (A) unido a el mRNA, El peso molecular del complejo PABP varía, en los mamíferos es de aproximadamente 72 000. El PABP interactúa con el poli (A) formando un complejo parecido al nucleosoma que va a presentar una periodicidad de 25 a 27 nucleótidos, y su afinidad para el poli (A) es 100 por ciento más grande que para otros polinucleótidos. El PABP puede migrar de una molécula de poli (A) a otras, este puede ser un factor importante, en términos de funcionalidad, como un determinante de la selectividad y estabilidad de ciertos mRNAs, además se ha visto, que la delección del gen que codifica para el PABP (PAB) es letal, por lo que es esencial para la síntesis de proteínas (Baer, 1983; Sachs, 1987).

Algunos tramos de poli (A) de algunos mRNAs son cortados y removidos de una manera tiempo-dependiente, implicando que el remover el poly (A) puede ser un proceso degradativo del cuerpo del mRNA, por lo que se le relaciona al poli (A) con la protección de la rápida e indiscriminada degradación. Sin embargo, existen pocas evidencias que apoyen, que el poli (A) protege de la degradación de mRNAs por las siguientes razones:

1.- Los inhibidores que interfieren con la poliadenilación pueden afectar otros procesos ATP-dependientes y por lo tanto, falta completa especificidad.

2.- Ha sido difícil de explotar las utilidades genéticas para generar obtener mRNA deadenilados y largos en células. La presencia de mutaciones en las señales genómicas de poliadenilación pueden interferir con la poliadenilación cuando los genes mutantes se transfieren a las células, pero los transcritos resultantes

usualmente llevan poco ensamble a las regiones de varios tipos de mRNA, ya que ellos presentan elongación pasando la parte final de la región 3' terminal y tienen terminaciones 3' heterogéneas (Bernstein, 1989).

En gran parte, la regulación de los mRNAs en células eucarióticas se ha enfocado en el control de la transcripción genética, sin embargo, los niveles de mRNA en las células presentan un balance entre la síntesis y su degradación. La relación de la degradación de mRNAs de células eucarióticas está determinada por la interacción de las secuencias específicas nucleotídicas del mRNA. La mayoría de los determinantes de la degradación del mRNA están localizados en la región 3' sin traducir.

El rango de degradación del mRNA puede estar regulado a través de la unión de factores proteicos a secuencias importantes que van a producir la desestabilización del mRNA o por modificación de la actividad de la síntesis degradativa del mRNA. La regulación del sistema degradativo del mRNA puede agruparse en varias clases (Nielsen, 1990):

I.- Mecanismo regulatorio. La unión de factores al mRNA previene el espacio endonucleolítico.

II.- Mecanismo regulatorio. Unión de un factor o factores sobre regiones específicas del mRNA.

III.- Mecanismo regulatorio. Cortando o removiendo la eventual cola de poli (A), regulando por lo tanto su estabilidad.

IV.- Mecanismo regulatorio. Interacción de proteínas con un componente del sistema de degradación alteran su actividad o capacidad para reconocer al mRNA como sustrato.

I.- Los mRNAs que codifican para receptores de transferrina son desestabilizados por niveles de hierro, y se estabilizan cuando escasea.

II.- La estabilización de mRNAs de receptores para transferrina en ausencia de hierro, está mediada por una proteína que se une a una serie de regiones y estructura loop, en la región 3' sin traducir del mRNA.

III.- La estabilización del mRNA de histonas, que tienen como característica, la carencia de la cola de poli (A).

IV.- Una secuencia de desestabilización diferente, se encuentra en muchos mRNAs inestables, que son importantes en el crecimiento celular. Estos mRNAs contienen en la región 3' sin traducir, regiones ricas en AU, cuando se insertan factores en la región 3' sin traducir de mRNA de glicina, esta secuencia es suficiente para desestabilizar al mRNA.

Se ha visto, que un aumento en la longitud de la cola de poli (A), se correlaciona con un incremento en la estabilidad de diversos mRNAs como la insulina y la vasopresina. Está presente un mecanismo de clase III, en donde la eliminación de residuos de la región 3' terminal, acelera el ataque nucleotídico. Cuando la longitud de la cola de poli (A) es menor de 20-30 nucleótidos, las proteínas no se unen, resultando una rápida degradación de la región 3' final del mRNA (Nielsen, 1990).

## **TRANSPORTE-TRANSCRIPCIÓN**

La transferencia de la información del DNA a las proteínas comienza con la síntesis de moléculas de RNA durante el proceso llamado de transcripción. La transcripción específica más o menos aquellos segmentos de DNA que contienen información, ya que la mejor definición operativa de un gen es la de un segmento de

DNA que es transcrito y que determina un producto simple. La transferencia de la información del DNA a las proteínas requiere la participación de varios tipos de moléculas de RNA. Uno de estas moléculas celulares del RNA es el RNAmensajero (mRNA), que contienen la información que especifica la secuencia de las proteínas. El descubrimiento del mRNA fue debido, en gran parte, al trabajo

El transporte de RNPM del núcleo al citoplasma juega un papel importante en la expresión de las células eucarióticas. En esta revisión se soporta el hecho de que hay más RNAm que lo que siempre aparece en el citoplasma. Por lo tanto, debe haber un mecanismo de control que los separe, para separar aquellas moléculas que pueden ser exportadas al citoplasma de aquellas que permanecieron en el núcleo.

En las células cancerosas, donde las moléculas de RNAm normalmente están restringidas al núcleo también emergen en el citoplasma, este mecanismo de control puede ser perjudicial.

Esta generalmente de acuerdo que el transporte nucleocitoplasmático del mRNPs ocurre a través del complejo de poros de la envoltura nuclear. El diámetro efectivo de los canales de llenos de agua formados por tales complejos son cerca de 10nm. Por lo tanto, los mRNPs (diámetro cerca de los 20nm) son demasiado grandes para dejar al núcleo por medio de difusión pasiva. El transporte de RNAm parece estar asociado con cambios en la estructura tridimensional del mRNP, y se puede observar por micrografía electrónica.

Se enfocará principalmente sobre la dependencia de energía-ATP-dependiente de mRNP. El transporte de núcleo al citoplasma del RNA ribosomal se puede inducir por ATP, pero también ocurre por variaciones de  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ . La liberación de RNPs ribosomal parece estar acompañado por una expansión del núcleo. El transporte nucleocitoplasmático de RNAm parece ser distinto de la exportación del tRNA o por el cambio de snRNPs y de las proteínas a través de la envoltura nuclear. El transporte nucleocitoplasmático de tRNA parece involucrar un mecanismo de difusión facilitada, mostrando saturabilidad y especificidad de secuencia y aparentemente no depende de ATP.

En contraste al transporte de mRNPs a través de poro nuclear, que aparece estrictamente vectorial, snRNPs puede ser lanzado entre los compartimentos nucleares y citoplasmáticos.

El núcleo toma la clase más pequeña de U-snRNAs en oocitos parece depender de su asociación con proteínas almacenadas en el citoplasma.

En contraste la exportación de mRNA, la importación de la mayoría de las proteínas dentro del núcleo parece ser independiente de energía, aunque en algunos casos, los nucleótidos promueven este proceso.

La acumulación de proteínas kariopílica en el núcleo puede estar mediada por señales específicas que reconocen sitios de unión intracelular de estas proteínas. Sin embargo, algunas proteínas (ej. SV40 grande, Antígeno T) parecen migrar al núcleo vía un mecanismo de transporte.

El transporte de RNAm del núcleo al citoplasma puede ser subdividido en las siguientes etapas:

- a).- Liberación del RNAm de la estructura de matriz nuclear interna.
- b).- Translocación de RNAm a través de la envoltura nucleolar de los complejos de poros.
- c).- Unión del RNAm transportados a los elementos citoplasmáticos celulares.

Actuales evidencias sugieren que durante estas etapas, los RNAm nunca aparecen difusibles en forma libre.

El transporte de RNAm parece estar más involucrado en los procesos de unión y separación de:

- De sitios específicos de la matriz nuclear,
- Envoltura nuclear(complejo de poros-lamina)
- Y el citoesqueleto.

En la etapa de translocación, este sitio de union puede ser

-Este sitio de unión puede ser el reconocimiento del portador del transporte en la estructura de la envoltura nuclear.

-En el sitio citoplasmico

-Microtúbulos

-Filamentos de actina

-y/o filamentos intermedios,

y estos pueden tener importancia en el transporte y función.

## 1.- SITIOS DE TRANSPORTE

Las estructuras intracelulares involucradas en el transporte del RNAm son:

a.- La matriz nuclear

b.-La envoltura nuclear ( o su complejo de subestructuras del complejo de poros-lamina)

c.-El citoesqueleto

a).- La matriz nuclear- forma una densa cadena de fibras intranucleares que incluyen el nucleolo que esta conectado en su periferia a la envoltura nuclear. Se ha asumido que la matriz nuclear provee una plataforma organizacional para la mayoría de los pasos de expresión del gen que ocurren en el núcleo.

b).- La envoltura nuclear, que forma la periferia externa del núcleo, puede ser subdividida morfológicamente en 4 distintos componentes:

1.- La membrana externa

2.- La membrana interna

3.- La lamina

4.- El complejos de poros.

Por tratamiento de la envoltura nuclear con Triton X100 se puede obtener el complejo de poro-lamina que difiere de la envoltura en la ausencia de la membrana nuclear,

La lamina nuclear consiste de cadena de fibras asociadas intimamente con la membrana interna y el complejo de poros nuclear. En el hígado de la rata y muchos otros tejidos, esta compuesta de 3 polipéptidos de 60 a 80 Kda, llamados Laminas ( A, B. y C), La lamina B parece estar parcialmente integrada en la membrana interna.

El complejo nuclear de poros ( que tienen un diámetro exterior de 80 nm) están compuestos en forma de 8 granulos, de fibras presentes en forma concentrica y transfersal de un granulo interno. Los granulos anular internos están asociados con fibras intranucleares que aparecen estar relacionadas con el desarrollo de la matriz nuclear. En algunas micrografias electrónicas, en aparente continuidad entre la matriz nuclear y los filamentos del citoplasma (pobablemente de filamentos intermedios).

c).- El citoesqueleto, consiste de tres sistemas de filamentos: como son

- Los microtubulos
- Microfilamentos
- Y filamentos inermedios

Las cadenas de proteínas que están formadas por estos filamentos parecen estar concetados a finos filamentos adicionales, aun no definidos, llamados microtrabeculos.

## **RECEPTORES ESTROGENICOS.**

### **RECEPTORES DE ESTEROIDES**

#### **ESTROGENOS**

La concentración de RE disminuye por acción antagónica de la progesterona en hámster y en útero de rata. Y se ha sugerido que los estrógenos afectan su propia concentración de receptores por disminución de la vida media de sus receptores, y están asociados con procesos nucleares., sin embargo, todos estos receptores están relacionados con forma de esteroides unidas a los receptores y no se ha mencionado el papel de la forma no unida a los receptores ,

Recientemente, se ha demostrado que existen receptores para factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores, y que estos son fosfoproteínas, y esto resulta ser una atractiva posibilidad que la función de los receptores pueden ser mecanismos de fosforilación y desfosforilación (Nooshne, 1990).

#### **ESTROGENOS**

De acuerdo a resultados presentados por Brown (1988) demostró que las diferencias celulares de la unión de estrógenos nucleares en la célula en discretas regiones del cerebro de la rata. La administración de E<sub>2</sub> , se observan mayor capacidad de unión de estrógenos en el núcleo del area preóptica periventricular (PVPOA), area preóptica medial (POAm) y en núcleo ventromedial del hipotálamo, estos núcleos, han estado relacionando con la regulación hormonal de la secreción de gonadotrofinas y conducta reproductiva, .Aunque en la rata hembra, la exposición a E<sub>2</sub> es capaz de inducir el surgimiento preovulatorio de la secreción de LH, E<sub>2</sub> es incapaz de producir similares efectos en el macho.La activación de el modelo femenino de la conducta reproductora en el macho requiere de dosis más altas de E<sub>2</sub> que en la hembra. Otras conductas sexualmente diferentes pueden ser, la maternal, conductas copulatorias,etc.

La reducida capacidad de unión de estrógenos en estas regiones en el macho, están asociadas con la reducida capacidad para responder a estrógenos y esto se sugiere por estudios sobre la distribución de receptores estrógenicos inducibles por progestinas en el hipotálamo de el roedor. Trabajos de Rainbow y col.

demostrarón, que el tratamiento a ratas gonadectomizadas a altas dosis de benzoato de estradio (10.15 (g/día durante tres días) induce bajos niveles de receptores a progestinas en el PVPOA y VMN, comparado con la hembra.

Se ha confirmado recientemente estos hallazgos y muestran que esta diferencia sexuales observa también después de la administración de benzoato de estradiol a bajas dosis. Estos resultados están asociados con la hipótesis de que uno de los mecanismos fundamentales en la diferenciación sexual del cerebro está asociada con la reducción en la sensibilidad a estrógenos por neuronas de las áreas PVPOA, mPOA, y VMN.

La exposición de andrógenos en una etapa temprana puede causar pérdida de poblaciones específicas de células que concentran estrógenos involucradas en la regulación femenina de modelos neuroendocrinos y conductuales. En forma alternativa, la diferenciación de estas células podría ser alterada, en cuanto a la síntesis de receptores estrogénicos por célula blanco. Esto es posible, debido a que la diferenciación regional en la concentración de receptores podría reflejar diferencias sexuales en las inervaciones aferentes en las neuronas blanco.

La unión de estrógenos a receptores nucleares que son factores transcripcionales, inician cambios en la expresión genética y estabilidad de transcritos del RNAm. Los estrógenos parecen regular la síntesis de algunas proteínas que están involucradas directamente con la transmisión neural y puede constituir parte de los sustratos para cambios inducidos hormonalmente en la comunicación neural. Los mecanismos por los cuales los estrógenos alteran la función cerebral, es a nivel de la disponibilidad de Receptores-estrogenos libres para unirse a las hormonas. Se han realizado numerosos estudios para conocer este receptor, pero poco se sabe en lo referente a su regulación.

#### **COMPLEJO R-E**

Existen agentes neurotransmisores que se sabe que alteran la concentración de los niveles de ER y por lo tanto la regulación de los estrógenos para determinar los niveles de ER en un momento determinado. Además de que se sabe que los ER funcionales parecen estar regulados o controlado por cambios alostéricos que son inducidos por la fosforilación de proteínas., La contribución a la concentración de ER son los niveles de RNAm de ER disponibles para la translación. Por técnicas de hibridización In Situ, se ha demostrado que los RNAm para ER es regulado por el estradiol en la zona ventrolateral del Núcleo Ventromedial y el Núcleo Arcuato del Hipotálamo. Ambas regiones tienen altas concentraciones de ER., la significancia funcional es que el núcleo ventro medial está involucrado directamente en el control neural de la conducta lordótica, y el núcleo arcuato está implicado en regular la secreción de H. Gonadales. Además se ha visto que los RNAm para ER es específico en forma regional, ya que los niveles de RNAm en la amígdala no se observan cambios como respuesta al tratamiento hormonal.

Se ha investigado si las diferencias sexuales del sistema PRL-hipotálamo, también son determinadas antes de empezar el período crítico de diferenciación sexual del cerebro o depende de la liberación prenatal de la testosterona que ocurre a los 18 días de vida embrionaria.

Existen evidencias de la existencia de un sistema hipotalámico-prolactina. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado prolactina inmunoreactiva en el hipotálamo y otras áreas del cerebro de rata adulta. La detección de RNAmPRL en las células hipotalámicas y la presencia de proteínas PRL en el hipotálamo de animales hipofisectomizados sugiere que la prolactina es de origen local y no de origen pituitario. La prolactina puede ser innecesariamente un neuropeptido que modula la conducta reproductiva. La prolactina se ha demostrado que inhibe la lordosis y promueve la conducta maternal. Estos efectos conductuales pueden ser mediados por sitios de unión específicas en el tejido neuronal y por un sistema de segundo mensajero acoplado a receptores de PRL. Parece, que el papel controlador de la conducta generadora específica. Parece sugerir la existencia de un sistema controlador de la generación de conductas específicas y que son

debidas a la diferenciación sexual del sistema hipotálamo-PRL. De Vito (1991), reporto diferencias en la inmunoreactividad de PRL entre los hipotálamos de hembras y machos. Siendo los niveles cuantificados por radioinmunoensayo de PRL más altos en hembras que en machos. La hipofisectomía disminuye el contenido de PRL en la hembra pero no en el hipotálamo de machos, y el tratamiento de estradiol selectivamente restaura los niveles de PRL en la hembra hipofisectomizada. En relación, el tejido hipotálamico de la hembra se caracteriza por tener una mayor densidad de sitios de unión de PRL en comparación con el hipotálamo de macho.

Generalmente se cree, que la diferenciación sexual del cerebro de rata, es realizada por una exposición perinatal de testosterona que es aromatizada a 17-beta-estradiol en forma local durante un periodo crítico(15). El Onset de los periodos críticos coincide con el aumento de testosterona sistémica en el feto de rata macho día 18 de vida embrionaria. Sin embargo, este concepto recientemente ha sido contestado, porque investigaciones sobre la diferenciación sexual de neuronas dopaminérgicas in vitro han mostrado que el desarrollo de dimorfismo sexual puede ser iniciado antes de tiempo y que puede proceder aun en ausencia de hormonas gonadales (Hutchison, 1991).

Según el estudio de Beyer C. (1992) demostro que las diferencias sexuales en el número de células hipotálamicas inmunoreactivas PRL, y las cantidades desarrolladas de PRL en cultivo de células disociadas de cultivo de dicéfalo de embriones de ratas. El contenido de neuronas machos y hembras tienen la misma cantidad de PRL por célula, es el tamaño de estas subpoblaciones de neuronas específicas y no la expresión de PRL en las neuronas individuales. Las diferencias en el número de neuronas son una característica de varios núcleos dimórficos sexuales. Las diferencias sexuales en el número de células PRL-hipotálamo, se debe a la proliferación de células precursoras que se lleva a lugar en la hembra antes de remover el tejido, a una diferenciación más rápida de células PRL de la hembra, y/o un porcentaje mayor de supervivencia de los cultivos de neuronas de las hembras. El resultado confirma de acuerdo a observaciones previas, que de dimorfismo sexual del sistema hipotálamico-PRL en la edad adulta, donde se sugiere que es debido a la a un proceso de diferenciación sexual que ocurre prenatalmente en ciertas subpoblaciones de neuronas hipotálamicas.

El punto sobresaliente de estos resultados es el desarrollo de dimorfismo sexual en células de cultivo de embriones en la etapa de 14 o 17 días de vida embrionaria, y crecían en ausencia de esteroides sexuales endógenos. Y puede por lo tanto excluirse que la diferenciación de estas células es dependiente de la diferenciación sexual en los niveles de testosterona sistémica, que no se presentan antes de los 18 días de vida embrionaria. Esta es una contradicción a la teoría generalmente aceptada sobre de que la diferenciación sexual del cerebro es causada por efectos organizacionales de las hormonas esteroides presentes durante un periodo crítico de desarrollo cerebral.

Similitudes con respecto a este trabajo, las diferencias morfológicas y funcionales de neuronas catecolaminérgicas se desarrollan en cultivos de tejidos cerebral de embriones de ratas a los 14 días, y aumento en ausencia de cantidades detectables de esteroides sexuales. Tales dimorfismos sexuales igual se desarrollaron cuando las madres fueron tratadas con antiesteroides los días 12 y 13 a fin de eliminar definitivamente los eventos organizacionales dependientes de esteroides y que pueden ocurrir en el útero antes que el tejido llegue hacia el cultivo. (Beyer, C 1992)

Se concluye que el control epigenético por el ambiente hormonal no pueden ser el único mecanismo responsable para la diferenciación sexual de neuronas Hipotálamo-PRL. Otros factores aparte de los esteroides gonadales, tales como la realización de células autónomas que están reguladas en un programa genético sexo-específico, podría estar involucrada para explicar la generación de diferencias sexuales. Además se propone una cascada de eventos celulares epigenéticos intrínsecos y extrínsecos son necesarios para establecer completamente el desarrollo del cerebro masculino y femenino.

## **EXPRESION ONCOGENES**

Estudios experimentales, en el desarrollo y dependencia hormonal de la expresión Raf-1 se inicia un importante señal de transducción que puede ser crítico en la diferenciación sexual. Worf (1992) ha presentado la hipótesis de que los mecanismos hormonales en cascada durante la diferenciación sexual toma como ventaja la presencia de moléculas de traducción de señales como los proto-oncogenes raf-1. Los análisis bioquímicos indican que Raf-1 son más altos en el hipotálamo de hembras prenatal que en el hipotálamo de machos. Además los tratamientos con testosterona exógeno reducen de una manera significativa los niveles de RAF-1 en hembras que en machos, cuando se les da prenatamente y no se han encontrado evidencias en diferencias sexuales o efectos hormonales en animales viejos. El dato es consistente de que las hormonas inhiben la expresión selectiva de la proteína Raf-1 en el cerebro de la rata prenatal en el Hipotálamo, donde la acción hormonal produce cambios significativos con consecuencias a largo tiempo (Dohler y col. 1984, Rhees, Shryne y Gorski, 1990).

Otras vías bioquímicas pueden estar involucradas en la fosforilación de proteínas, puede ser dependiente sexualmente y bajo la influencia de señales hormonales. Por ejemplo, la actividad de la adenilato ciclasa en el hipotálamo de ratas neonatales es más grande en hembras que en machos, y es inhibida por estradiol o testosterona y se incrementa en machos después de la castración neonatal.

Un incremento en el número de productos de proto-oncogen se han estudiado con respecto a su papel en el desarrollo del cerebro normal. El proto-oncogene c SRC tienen una forma específica, c-src(+), y su expresión del RNAm se ha seguido en diferentes regiones con los niveles observados al día 20 en el desarrollo del striatum de la rata. Otras regiones tales como el cerebelo y el hipocampo, exigen niveles de expresión de c-src sigue en diferentes desarrollo.

Hemos sugerido que la diferenciación sexual sigue a dos fases de un proceso secuencial de estrógenos, seguida por una fase de andrógenos. Tales procesos secuenciales requieren mecanismo (s) para delimitar las dos fases. Los resultados de el presente experimento sugieren un mecanismo de fase terminal estrogénica sin influir en la continuidad de la fase androgénica. Los andrógenos prenales en machos pueden disminuir la Raf-1 dependiente de fosforilación por down-regulation de los niveles de Raf-1. Si Raf-1 dependiente de fosforilación resulta en la activación de receptores a estrógenos, luego que la acción androgénica podría tener una subsecuente "down-regulation" en la actividad de receptores estrogénicos. Las sucesivas fases estrogénica y androgénica podría estar organizada luego, por un mecanismo en que la acción de andrógenos tempranos, deja una disminución en la respuesta a estrógenos en un período posterior. Un mecanismo complementario esta sugerido la evidencia de que la estimulación estrogénica incrementa el número de receptores a andrógenos.

## **NEUROTRANSMISORES.**

Las diferencias sexuales en la actividad de neurotransmisores como una explicación aparte para aclarar la funcionalidad de la diferenciación sexual

Según los resultados anteriores de Jarzab y col. (1990), confirman la hipótesis, de que cambios en la actividad neurotransmisora postnatal pueden influir directamente en el desarrollo de estructuras dimórficas sexuales en el cerebro de la rata. Por lo tanto se convence, las influencias adrenérgicas y serotoninérgicas sobre la diferenciación del SDN-POA.

La administración perinatal de pCPA, un inhibidor de la síntesis de serotonina, incrementa el volumen del SDN.POA en ratas hembras con un día de nacidas, sin cambios neonatales en los niveles de testosterona o estradiol (Handa, 1986).

La existencia de neuropéptidos como la colecistoquinina, que se distribuye a través del sistema nervioso central y su distribución sexual es dimórfica en el continuo límbico-hipotalámico. Las diferencias sexuales en el número de CCK-células inmunoreactivas que han sido descritas en la estria terminal, núcleo preoptico medial, núcleo preoptico periventricular, subdivisión posterior magnocelular del núcleo paraventricular y el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN). La distribución de este neuropéptido está particularmente en áreas del cerebro que concentran estradiol, y median la conducta reproductiva.

En las ratas hembras los niveles de receptores de CCK en el VMN varían de acuerdo al ciclo estral, son más grandes los niveles en la mañana del diestro del día 2 y proestro y baja en la mañana del estro, y están moderados en la mañana del diestro del día 1. Al parecer estos cambios parecen estar controlados por el estradiol.

Las diferencias sexuales perinatalmente bajo la influencia de un ambiente hormonal gonada. La respuesta adulta al CCK exógeno en el VMN durante el período crítico postnatal por defeminización. Así, la respuesta a CCK está correlacionada a los niveles disponibles de receptores en el VMN. La diferenciación de circuitos del CCK en el VMN están controlados por el ambiente androgénico del desarrollo del animal. Estos estudios se extienden en nuestras observaciones sobre como el sistema de CCK modula la conducta lordótica.

Dentro del dimorfismo sexual del cerebro involucra dimorfismo sináptico, y esta diferenciación es inducida por la acción de estradiol en la infancia, la diferenciación depende de módulos coordinados de biosíntesis de proteínas y recientemente se ha demostrado que el estradiol induce biosíntesis de proteínas específicas en el cerebro neonatal. Esta inducción está relacionada a la diferenciación sexual.

Aún no está bien claro, como los estrógenos inducen proteínas y puedan modular el desarrollo sináptico, pero si la proteína directa o indirectamente afecta la neurotransmisión, además de que se sabe que ciertas sinapsis pueden ser establecidas en forma selectiva, mientras que otras degeneran de acuerdo a si los circuitos se están usando o no. Desde que el adenilato ciclasa está íntimamente ligado a receptores a neurotransmisores y 3',5-AMP (cAMP) puede tener un efecto trófico en el cerebro (por ejemplo, puede afectar las estructuras de neurotubulos, en cultivo de tejidos de neuronas en crecimiento y en ultraestructura del núcleo del sistema nervioso), es posible que las proteínas cerebrales inducidas por estrógenos modulan la actividad e la adenilato ciclasa, ocasionando cambios permanentes en la estructura de algunas neuronas.

Hay drogas que afectan la interacción receptor-catecolaminas, modifican la conducta sexual y liberación de gonadotropinas, además se ha visto, que las ratas macho recién nacidas, tienen más bajos niveles de actividad de la adenilato ciclasa que las hembras. Se ha pensado que esta diferencia entre los sexos en la actividad de adenilato ciclasa y en sensibilidad a neurotransmisores puede ser debido a la presencia de estrógenos en el hipotálamo del macho pero no de la hembra. El cerebro de la ratita recién nacida está protegido contra sus propios estrógenos por la alfahetoproteína, y en la edad adulta, esta presenta diferencias en la actividad dependiendo al ciclo estral. En los machos, sin embargo, la testosterona secretada por los testículos no es secuestrada y se convierte a estrógenos por la aromataza.

Los efectos de los estrógenos en el hipotálamo adulto son trascendentales. Aparte de su efecto inhibitorio sobre el sistema de adenilato ciclasa, existen algunos otros efectos inhibitorios que se han mostrado. Se ha reportado que los estrógenos inhiben la actividad neuronal en el hipotálamo de la ratita y que bloquea la liberación de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GT-RH) inducidas por dopamina. El efecto inhibitorio de los estrógenos parece ser no solo en la AC hipotalámica, sino también en la pineal durante el ciclo estral.

de la rata, los estrógenos también se han reportado que reducen los niveles de cAMP en el útero de la rata. Se ha sugerido que el cAMP afecta la excitabilidad celular, y esto podría modificar la actividad neuronal y por lo tanto, la neurosecreción y liberación de GnRH.

## **DIFERENCIAS NEURONAL( CELULAR )ETC.**

Aunque diferencias sexuales en el núcleo neuronal o tamaño nucleolar se reportaron por Dorner ( 1968; 1973) ya que diferencias en el tamaño nuclear o nucleolar, podrían ser el reflejo de una actividad metabólica. Raisman y Field (1973), demostraron, que hay una significancia estadística en las diferencias sexuales en el número de sinápsis sobre las espinas dendríticas en el MPOA en un área determinada de la estria terminal. Estos autores demostraron que la manipulación hormonal altera la diferencia sexual funcionalidad del cerebro, demostraron que también se producen cambios predictivos en el orden morfológico.

Cabe notar que estas diferencias estructurales son muy sutiles, esencialmente con diferencias sexuales, estadísticamente significativas se pueden detectar a nivel ultraestructural. Las observaciones que habían demostrado efectos dramáticos sobre el campo fueron los estudios realizados por Nottebohm y Arnold (1976). Ellos identificaron diferencias sexuales relativamente gruesas en la organización nucleolar del cerebro de parajes. Una serie de núcleos que formaban parte del sistema de canto presentaban características dimórficas sexuales además de susceptibilidad para manipulaciones hormonales.

## **DIMORFISMO SEXUAL DE LOS NUCLEOS DEL AREA PREÓPTICA. VOLUMEN**

Gorski ( 1978) plantea el uso de un método para cuantificar el volumen nuclear y encontró que el área preóptica era cinco veces más grande en volumen en los machos adultos, que en las hembras.

La densidad neuronal fue significativamente más grande en esta estructura que en sus alrededores ( Gorski y col. 1980; Jacobson y Gorski, 1981). El marcado volumen diferente en esta área en la densidad neuronal indican que el SDN-POA del macho está compuesto de más neuronas que en la hembra.

Jacobson y Gorski (1981) determinaron si el volumen del SDN-POA podría ser alterado por un ambiente hormonal postnatalmente, y demostraron que la castración de ratas macho de un día de nacido presentaban una reducción del volumen del SDN-POA significativamente en la edad adulta. Sin embargo, la administración de TP exógeno administrada a hembras genéticas o machos castrados el día uno de vida, se observa un incremento en el volumen nuclear en la edad adulta. El SDN-POA presentaba su volumen en la edad adulta, y se ve que es claramente influenciado por un ambiente hormonal postnatal temprano, sin embargo, el volumen del SDN-POA no es "sexo-reversible" Cuando después se analiza el desarrollo temporal de las diferencias sexuales del SDN-POA en volumen y se encuentra que el desarrollo durante la primera semana de postnatal y se lleva a lugar el mismo periodo en que ocurre la diferenciación sexual del cerebro. El SDN-POA parece ser una estructura de diferenciación sexual hormono-dependiente, por lo que es una estructura morfológica que presenta un efecto de acción organización de hormonas testiculares.

Las observaciones de que la orquidectomía neonatal o la exposición a esteroides gonadales postnatalmente no es un proceso "sexual-reverso" del volumen del SDN-POA en machos y hembras respectivamente, por lo que se sugiere la posibilidad de factores genómicos neuronales podrían estar involucrados en el desarrollo de esta estructura como parte de la diferenciación sexual. Sin embargo, las dichas manipulaciones de los ambientes hormonales postnatal pueden ser insuficientes o producirse a destiempo. En las ratas macho se ha observado el surgimiento de testosterona en el momento del parto (Corbier y col. 1978) y este aumento se ha reportado que contribuye a la diferenciación masculina (Corbier y col. 1981). Sin embargo, en estudios posteriores de Handa y col. (1985) se demostró que la castración de ratas macho justo antes del nacimiento natural, o 6, 12, 24 horas después del nacimiento produce el mismo efecto en el volumen del SDN-POA, así, se sugiere entonces que la testosterona no influye en SDN-POA.

El hecho de que el SDN-POA no es dimórfico sexualmente sino hasta después del nacimiento, es parecido a aquella acción hormonal que empieza antes del nacimiento. Es por eso, que la acción de la testosterona antes del nacimiento no es expresada o no es reconocida sino hasta después del nacimiento, esto podría explicar el porque la orquidectomía al día 1º, no da completamente la conversión del SDN-POA como en la hembra en relación a términos femeninos del volumen, a través de la regulación de la facilitación de la respuesta del feedback y la conducta lordótica (Clemens y col. 1978; Meisel y Ward, 1981, vom Saal 1982a).

Podría decirse que es virtualmente imposible reproducir en hembra, por la sola administración de TP, el modelo de masculinización prenatal normal de la actividad testicular, así, se han expuesto a ratas embarazadas con 2 mg de TP diario, empezando en el día 16 de la post concepción y seguida al nacimiento, e inyectaron cada cría con 100 µg de TP diariamente durante 10 días postnatal. Fue necesario inyectar todas las crías por la incapacidad para determinar su sexo por la apariencia del sexo gonadal.

La exposición prologada a TP el volumen del SDN-POA es completamente sexo-reversible en las hembras pero no se muestra este efecto en los machos (Dohler, y col. 1984). Es por eso, que las influencias genómicas posibles, pueden ocurrir normalmente en el desarrollo, estos resultados pueden establecer que el ambiente hormonal solo puede determinar el volumen de SDN-POA masculino y un incremento en el número de neuronas que componen este núcleo. Además de que la exposición perinatal a estrógenos no-esteroidales como el Diestilstilbestrol (DES), que tiene la capacidad de que no se une a las alfa-feto proteínas, también presenta un cambio del volumen del SDN-POA sexo-reversible (Dohler y col. 1984).

Estas observaciones requieren sin embargo, consideraciones del papel del estradiol en los procesos de diferenciación sexual masculina. Badin (1970) evaluó el volumen del SDN-POA en machos con mutación de testículo feminizante que exhibían marcada reducción de receptores androgénicos (Naess 1976), sin presentar ningún decremento aparente en los niveles de receptores estrógenicos como ocurre en el ratón. En estos machos el SDN-POA, el volumen es equivalente en volumen al macho normal, que es consistente con estrógenos como el mediador de la diferenciación sexual de esta estructura (Gorski, 1981)

El dimorfismo sexual del SDN-POA, no solo es en términos de su volumen, sino también de cuerpos celulares que abarcan este núcleo y de las fibras que inervan y su vecindad. Estas diferencias se establecen durante el período crítico pre-postnatal. Así parece, que durante el período perinatal de esteroides gonadales actúan no solo como señales de diferenciación de parámetros morfológicos y funcionales a nivel cerebral, pero también influyen en la actividad neurotransmisora en el cerebro de la rata. El mecanismo de interacción de esteroides-neurotransmisor en el desarrollo cerebral, no está muy claro aún. La testosterona influye sobre el contenido de neurotransmisores y neuropeptidos en el cerebro. Así como se ha reportado que compuestos que cambian la actividad neurotransmisora influyen en la diferenciación sexual del cerebro e interfieren con el efecto de los esteroides durante este proceso. Recientemente, Handa y col. (1986) describieron que el volumen del SDN-POA se incrementa de volumen en ratas hembras de 1 día, después de la inhibición prenatal de síntesis de serotonina con para-clorofenilalanina. El sistema adrenérgico, también influye en el

proceso de diferenciación sexual, se ha mostrado que los efectos desfeminizantes de testosterona postnatal están conectados con cambios permanentes en la regulación noradrenergica de la ciclicida de la secreción de la hormona luteinizante. En relación al SDN-POA, las ratas adultas están inervadas por fibras adrenergicas a este núcleo Y también se ha demostrado previamente, que las drogas neuropépticas pueden influir sobre la replicación celular en el cerebro en desarrollo, así como también se han descrito influencias neurotróficas de las aminas biogénicas.

En contraste, las diferencias sexuales estructurales del núcleo espinal del bulbocavernoso ( en la espina cordal) de las mismas ratas está ausente, que es una característica de las ratas hembras. Aunque el desarrollo de los núcleos espinales puede depender de la sobrevivencia de musculatura perineal androgeno-dependiente, es posible que la influencia de la testosterona sobre la espina cordal. actúa como un andrógeno (Breedlove y col. 1981)...

Las discusiones están enfocadas sobre el SDN-POA, pero se deben enfatizar, que los mecanismos de su diferenciación, aunque ilustrativos en los principios generales, pueden no ser aplicables a todas las estructuras capaces de desarrollar dimorfismo sexual, justo como sistema funcional diferente exhibe características diferentes temporales a la acción de las hormonas sexuales, los mecanismos responsables para las diferencias sexuales estructurales no necesariamente son idénticos.

El estudio de el desarrollo del SDN-POA a llevado a una controversia sobre el papel de la alfa-fetoproteína (AFP) en la diferenciación sexual. Aunque es generalmente aceptado que la AFP protege al cerebro de la rata hembra por medio del secuestro de estrógenos (Dohler, 1978), se ha sugerido que al AFP puede servir para prolongar el ambiente hormonal prenatal en la vida postnatal.

## **PAPEL DEL ESTRADIOL**

Toran-Allerand (1980a,b) ha demostrado que el estradiol es necesario para el crecimiento de procesos neuronales in vitro y que la AFP es llevada por neuronas

Es por eso, que bajos niveles de estrógenos pueden ser necesariamente para el desarrollo y/o diferenciación del cerebro de la rata., mientras que la exposición adicional a estrógenos derivados de la conversión intraneuronal de la testosterona testicular masculiniza al cerebro.

Dohler y col. (1984) demostraron que la administración postnatal de un antiestrógeno como el tamoxifen reduce el volumen del SDN-POA alcanzado por los machos adultos. aunque tratamientos similares con tamoxifen también reducen el volumen del SDN-POA alcanzado por las hembras.

Aunque el posible papel del estradiol en el desarrollo del cerebro de la rata puede parecer un punto menor, es conceptualmente significativo. En la revisión clásica de la diferenciación sexual se asume que el cerebro es inherentemente femenino o en menor grado bipotencial e igual sin en un ambiente hormonal se desarrolla en dirección femenina. En contraste, el cerebro de la rata puede actualmente ser neutro y depender de la acción de estradiol para el desarrollo de hembras normales. en cualquier caso, la exposición a altos niveles de estradiol son necesarios para la diferenciación masculina del cerebro.

Si se espera que la especie molecular es el estradiol o la testosterona, y si el cerebro es inherentemente femenino o neutro, es evidente que los esteroides gonadales en alguna forma incluyen, si no determinadamente, en el número de neuronas que componen al SDN-POA de la rata adulta. Seis posibles mecanismos pueden ser sugeridos:

- 1.- Los esteroides pueden estimular la neurogénesis o prolongar el período en que ocurre la neurogénesis.
- 2.- Los esteroides pueden modular la migración de neuronas recientemente formadas a la región del SDN-POA.
- 3.- Los esteroides pueden promover la sobrevivencia durante el proceso de migración y prevenir la muerte celular morfológica.
- 4.- Los esteroides pueden modular el reconocimiento de la superficie celular en los procesos o cualquiera que sea la causa de agregación de neuronas en el SDN-POA.
- 5.- Los esteroides pueden prevenir la muerte celular histogénica.
- 6.- Los esteroides pueden influir en la especificación de neuronas en términos de funcionalidad y/o identificación neuroquímica.

Datos publicados sobre la neurogénesis del MPOA, indican que es postmitótica en las neuronas de esta región cerca del día 16 postconcepción (Altman y col. 1978, Anderson, 1978). Se ha visto que la administración de Timidina (H3) a hembras embarazadas en diferentes días de gestación, se sacrificaron sus crías 30 días después del nacimiento y se analizaron los cerebros autoradiográficamente, (Jacobson y Gorski, 1981) confirman que la neurogénesis en el MPOA en general cesa a los 16 días postconcepción, la neurogénesis de aquellas neuronas que forman el SDN-POA fue específicamente prolongado. y se observa que continúa la neurogénesis hasta el día 20 de la gestación. (Jacobson y col. 1982) encontró dos diferencias sexuales significativas en la aparente neurogénesis, en el SDN-POA, cuando la inyección de Timidina (H3) se inyecta en los días 14 de gestación, el índice de la marca del SDN-POA es mayor en las hembras que en los machos, y esta diferencia sexual se revierte a los 17° días de gestación (Jacobson y Gorski, 1981). Prenatalmente el día 17 de gestación está cercano al momento de marcaje de la diferencia de secreción de testosterona como ha observado Weisz y Ward (1980), y esto se podría contribuir a lo observado en las diferencias en la aparente neurogénesis en el día 17. Sin embargo, estos resultados pueden ser prematuros, ya que en el trabajo de Weisz, las ratas no fueron sacrificadas sino hasta el día 30 de vida, los resultados pueden ser confundidos con factores como la migración y la sobrevivencia, además que el papel altamente complejo de la acción de las hormonas gonadales es promover o prolongar la formación mitótica de las neuronas en el SDN-POA.

El hecho de que la actividad meiótica es dirigida por la formación de neuronas en el SDN-POA se prolonga significa que la exposición de timidina radiactiva sobre el día 18 de gestación marca permanentemente la fracción significativa (25-30%) de las neuronas del SDN-POA. Este acontecimiento permite identificar las vías de migración probables de las neuronas del SDN-POA (Jacobson, 1985).

Para identificar las vías de migración, se inyectó timidina radiactiva a una serie de ratas embarazadas el día 18 de gestación y se sacrificaron sus crías a diferentes edades, dos horas después de la inyección, las células marcadas se encontraban en el límite del tercer ventrículo y durante el curso de las dos semanas siguientes, las células marcadas aparecen del cerebro medio a la base del tercer ventrículo, alrededor del tejido neuronal, afuera se lateralizan y se colocan en forma dorsal para alcanzar al SDN-POA. El destino de estas neuronas es desconocido. ellas pueden migrar más allá de los bordes laterales del MPOA,

Aunque los mecanismos de sobrevivencia durante los períodos de muerte neuronal no son entendidos completamente, sin embargo, es útil el concepto de neuronas como una sustancia neurotrófica que existe en cantidades limitadas en áreas blancas, (Hamburger y Oppenheim, 1982).

## **ESTUDIOS DE LA FUNCION DEL SDN-POA**

Aunque se ha tratado al SDN-POA como una estructura morfológica de la acción de organización de los esteroides gonadales, y así, como evaluar el sistema para el estudio de los mecanismos posibles de la acción de los esteroides sobre el desarrollo del cerebro. No se sabe a ciencia cierta cual podría ser el papel de las neuronas del SDN-POA, si excitatorio o inhibitorio..

El volumen del SDN-POA por sin, no se correlaciona con la habilidad de los machos o hembras geneticos para la presencia de la conducta lordotica ni con con la respuesta facilitatoria del feedback a esteroides gonadales (Gosrki y col. 1978).

## **EFFECTOS CON ANTAGONISTAS ESTROGÉNICOS.**

El núcleo dimórfico del Area Preóptica (SDN-POA) su desarrollo empieza durante la vida fetal tardía, y depende enormemente de un ambiente hormonal durante el periodo de diferenciación sexual. El tratamiento de ratas hembras con androgenos aromatizables, o con estrogenos perinatales incrementa el volumen del SDN-POA, mientras que la castración de las ratas macho reduce el volumen de este núcleo. El ambiente hormonal durante la edad adulta, parece no alterar el volumen de dicho núcleo. Se ha observado que 10 o 100 ug de tamoxifen reduce el volumen del SDN-POA de un 26 a 40% en la rata macho . Así, el efecto del tamoxifen sobre el núcleo de las ratas macho tratadas postnatalmente , es similar al efecto de la orquidectomía, que reduce el volumen a la mitad aproximadamente. Ni una sola administración de tamoxifen, ni multiples administraciones influyen significativamente sobre los niveles de testosterona en suero el las ratas machos. Así, el mecanismo de acción de este antagonista estrogénico no parece estar dirigido via al daño sobre los testículos (Döhler, 1984 b).

El tamoxifen, puede tener influencia de desarrollo y diferenciación del SDN-POA, via una acción directa sobre el sistema nerviosos central. Un efecto toxico del tamoxifen, sobre el CNS es desconocido, ya que en estudios de Döhler (1984) toman como control al núcleos supraquiasmatico como control, y no se veia afectada por el tratamiento. Así, la influencia inhibitoria de este antagonista sobre el SDN-POA en areas cerebrales en donde se conoce la sensibilidad a estrogenos, parece tener una interferencia local con la actividad estrogénica (Döhler, 1984 b).

Los receptores a estrógenos, estan presentes en el hipotálamo de la rata antes de nacimiento, y se incrementean durante el periodo perinatal, además que hay otras areas cerebrales, que tienen la capacidad de aromatizar andrógenos a estrogenos, , como un proceso que pareciera jugar un papel clave en la diferenciación sexual del cerebro de la rata macho. ya que se observo que despues de la administraci'pon de 3H-testosterona a ratas neonatales, la radiactividad se presento en forma de 3H-estradiol en la Amigdala, area preóptica y en el núcleo hipotalámico (Vito y col. 1982).

El tamoxifen en el organismo adulto, se sabe que se une a receptores estrogénicos intracelulares, previniendo que estos sean ocupados por el estradiol. El tamoxifen actua en forma similar en el organismo en desarrollo, despues de la aromatización de androgenos testiculares a estrogenos, el tamoxifen impide que se forme el complejo receptor estrogenos de esta manera, los estrogenos, no interactuan en el núcleo celular del SDN-POA, por ocupar los reeptores estrogenicos intracelulares. El efecto inhibitorio del tamoxifen en la vida postnatal sobre el desarrollo y diferenciación del SDN-POA en ratas macho, no es solo actuando para impedir la aromatización de los andrógenos testiculares a estrogenos, sino también a la subseguente interacción de estos estrógenos con el material nuclear (Döhler, 1984).

El tratamiento postnatal con tamoxifen interfiere con el crecimiento y diferenciación del SDN-POA, no solo se ve afectado el del macho, sino también de la hembra. 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. El efecto desfeminizante de la acción de los antagonistas estrogénicos sobre la diferenciación de las funciones sexuales cerebrales, podría atribuirse a una posible actividad estrogénica de este compuesto. Sin embargo, se ha indicado que el tamoxifen no actúa como estrogénico sobre la diferenciación del SDN-POA, ya que se ha visto, que los estrógenos perinatales estimulan la diferenciación del SDN-POA en ratas hembras, mientras que el tamoxifen inhibe su diferenciación. El tratamiento postnatal en ratas hembras con tamoxifen, muestran que inhibe la diferenciación de los modelos de conducta sexual sin la diferenciación de los modelos conductuales sexuales del macho (Döhler, 1984b, Döhler, 1984c, Hanke, 1981);..

Se ha observado, que no solo la diferenciación sexual del macho, sino también de la hembra y/o con respecto al desarrollo del cerebro, puede estar influido por hormonas estrogénicas, lo que se podría sugerir, que durante el período perinatal los estrógenos de la circulación sanguínea pueden estimular la diferenciación y/o desarrollo de la sexualidad en ambos sexos. Los requerimientos para las influencias estrogénicas sobre la diferenciación cerebral, funcional y estructural, podría ser más cuantitativa, que cualitativa., como lo demuestra que Vonm Saal (1983) en ratones hembras y machos, que fueron localizados en el útero entre otras dos hembras, tenían más altos niveles de estradiol en su fluido amniótico, y mostraban en la edad adulta, mejor desarrollo de conducta sexual femenina o masculina que las hembras o machos que fueron localizados en el útero entre dos machos.

Según estudios realizados por Döhler (1986) A ratas hembras embarazadas a partir del día 16 de gestación: dosis de tamoxifen, de 200 ug diarios, y de ciproterona 10 mg. por cesarea, se obtienen las crías al día 22 de embarazo las trataron con Tamoxifen 10 ug y ciproterona 0.5 mg. durante 10 días.

El tratamiento pre y postnatal de el peso de los organos, presentan una permanente reducción del cuerpo del ovario, y presentan esterilidad anovulatoria persistente., se presentaban algunos ovarios completamente atroficos, y no contenian foliculos ni cuerpos luteos., aunque algunos contenian foliculos, pero no cuerpo luteo. El peso corporal fue significativamente reducido, pero el de cerebro no se afecto.

Y el tratamiento pre y postnatal de las ratas hembras con acetato de ciproterona, no influyen sobre la capacidad ovulatoria.. El peso corporal fue significativamente reducido, pero el peso cerebral no se ve afectado.

El tratamiento pre y postnatal de ratas machos con tamoxifen, reducen el peso corporal y el peso testicular, pero no influyen sobre el peso corporal., los testiculos de estos animales fueron pequeños y flacidos, pero no contenian estrógenos.

El tratamiento con ciproterona, reducen el peso corporal, pero no el cerebral. Los testiculos fueron localizados intra-abdominalmente, pero presentaban mayor peso que los controles, sin embargo, su apariencia era normal y además presentaban espermatozoides.

El tratamiento pre y postnatal de ratas macho con antagonistas estrogénicos como el tamoxifen, inhiben el desarrollo del SDN-POA, y así en la edad adulta, tienen casi el volumen de las hembras controles., mientras que el tratamiento pre y postnatal con antagonistas androgénicos no influyen sobre el volumen, lo que sugiere que el desarrollo y diferenciación del SDN-POA esta bajo un control en estrogénico en su fase inicial pero no bajo un control de andrógenos, per se. Ya que el tratamiento pre y postnatal de tamoxifen en ratas macho no influyen sobre los niveles de testosterona durante el período de tratamiento, el mecanismo de acción de este antagonista estrogénico, no parece ser la principal vía dirigida a presentar el efecto de un daño agudo a los testículos ( efecto de castración).

En forma alternativa, el tamoxifen parece influir sobre el desarrollo del SDN-POA teniendo como vía principal el sistema nervioso central (CNS). El efecto tóxico del tamoxifen sobre el CNS, aun esta desconocido, ya que presenta cierta selectividad, como se ha demostrado en cuando se toman como zonas controles, otros núcleos, como al núcleo supraquiasmático, y este no presenta ninguna alteración, por lo que se sugiere que la influencia inhibitoria sobre el crecimiento de ciertos núcleos es determinado en algunas áreas cerebrales con sensibilidad a estrógenos y parece ser más a una interferencia local con la actividad inducida por estrógenos (Döhler, 1984a)

En la edad adulta el tamoxifen actúa uniéndose a receptores estrogénicos intracelulares y previene la unión del estradiol a estos receptores. El tamoxifen puede actuar similarmente en el desarrollo del organismo. Después de la aromatización de andrógenos testiculares a estrógenos, el tamoxifen podría tener una interferencia con los estrógenos para entrar al núcleo de SDN-POA por ocupar receptores intracelulares a estrógenos. El efecto inhibitorio pre- y postnatal del tamoxifen sobre el crecimiento y diferenciación del SDN-POA en ratas macho, indica que no solo una diferenciación funcional sino también estructural del cerebro de la rata macho puede ser dependiente de la aromatización de andrógenos testiculares a estrógenos, y su subsecuente interacción de estrógenos con el material nuclear.

De acuerdo a resultados obtenidos por Döhler y coll (1984) utilizando antagonistas androgénicos como el acetato de cyproterona, no interfiere sobre el crecimiento y diferenciación del SDN-POA, lo que indica que los andrógenos no son los que estimulan de manera primaria la diferenciación del SDN-POA:

Además, la aromatización de andrógenos a estrógenos, se considera como un pre-requisito para la masculinización de la área preóptica-hipotálamica y desfeminización de las funciones cerebrales. El tratamiento pre y postnatal de con acetato de cyproterona muestra una permanente feminización de los modelos de conducta sexual femenina y el modo de liberación de gonadotropinas en machos, e inhibe la acción desfeminizante de la testosterona exógena en hembras.

La testosterona se sabe que entra a las células blanco de los andrógenos en el cerebro y ahí, se tiene dos vías, se aromatiza o se 5-alfa-reduce, el principal metabolito es el estradio y la 5(-dihidrotestosterona (DHT). ambas hormonas se encuentran con alta afinidad a receptores proteicos específicos de origen citoplasmático y luego son translocados al núcleo celular donde estimularan la respuesta biológica característica. En el caso del antagonistas androgénicos no previenen la entrada de andrógenos a las células, no influyen sobre el metabolismo androgénico. Su principal actividad antagonista, parece estar basada sobre la interferencia con andrógenos intracelulares que se unen a receptores específicos androgénicos en el citosol y previenen la translocación del complejo receptor-androgénico al interior del núcleo, así, la actividad de la ciproterona está dirigida a mediar los eventos androgénicos, pero no directamente contra los eventos mediados por estrógenos.

De acuerdo a esto, la masculinización y desfeminización de las funciones cerebrales en la rata, parecen estar mediadas no solo por estrógenos sino también parecen requerir la participación de andrógenos per se. Los componentes androgénicos y estrogénicos parece que son requeridos para una completa masculinización y desfeminización de las funciones cerebrales sexuales. La interferencia de antagonistas hormonales o de otros componentes, es el resultado de una incompleta organización del cerebro. La organización estructural del SDN-POA, sin embargo, parece depender solamente de la entrada de estrógenos.

El tamoxifen, no estimula el desarrollo y diferenciación del SDN-POA de las ratas hembras. Además que el tamoxifen no actúa como un estrogeno, y si mantiene su comportamiento como antagonista de la actividad estrogénica. Mientras que la inducción de esterilidad anovulatoria por el tratamiento perinatal con tamoxifen puede ser el resultado de antagonismo estrogénico, como se ha sugerido, o bien podría ser el

resultado biológico de la unión del tamoxifen a los sitios de unión antiestrogénicos, que ya han sido reportados ser diferentes a los receptores estrogénicos (Sudo, 1983).

## HOX

Como parte importante en el desarrollo de algunos organismos, se encuentra la participación de los genes homeóticos (HOM). Tres modelos principales de regulación génica especifican las características básicas de la función y el cuerpo del embrión de *Drosophila melanogaster* y en los sucesivos estadios del desarrollo:

- Los genes maternos que se expresan en el huevo antes de la fertilización (oocito)
- Los genes de segmentación que se transcriben a partir del genoma celular después de la fertilización
- Los genes homóticos que se expresan más tarde afectando a las características únicas de cada segmento individual del cuerpo (Lehninger y col. 1993).

Los genes homeóticos son expresados durante la embriogénesis de *D. Melanogaster* con un patrón complejo de especificidad posicional y temporal y se ha estudiado ampliamente la participación de estos en la diferenciación de diversos órganos durante el desarrollo embrionario (Lawrence y Morata, 1994). Los genes HOM forman la cascada de actividad e factores de transcripción los cuales subdividen al embrión en unidades progresivas pequeñas (parasegmentados) dando a cada uno la unidad de identidad particular. Los genes HOM son, por lo tanto, responsables de proveer la información correcta para dar las coordenadas espaciales para que las células se diferencien de acuerdo a su posición dentro del embrión. Estos genes tan agrupados dentro de los complejos Antennapedia (ANT-C) y Bithorax (BX-C) colectivamente referidos como homeóticos (HOM-C) (revisado en Duboule y Morata, 1994; Andrew y Scott, 1992; Krumlauf, 1994; Colleta y col. 1994) los cuales participan en el desarrollo de los segmentos individuales a lo largo del eje anteroposterior (AP) y de su cuerpo (Bentley y col.) 1993; Gutman y col, 1994). Cada complejo contiene diferentes genes con funciones análogas: aquellos genes en el complejo Bithorax controlan las diferencias entre los segmentos abdominales y torácico del cuerpo, mientras que los del complejo Antennapedia controlan las diferencias entre los segmentos del tórax y la cabeza.

Una característica importante que guardan los genes homeóticos de *Drosophila*, es la presencia de una secuencia de 183 nucleótidos altamente conservada durante la evolución y que se denomina homeobox la cual codifica para un dominio de 61 aminoácidos llamado homeodominio (Shen y col. 1989; Lilli y col, 1995; Care y col, 1996; Friedman y col, 1994). El homeodominio presenta un segmento del tipo hélice –giro-hélice capaz de unirse a secuencias de ADN (Gehring y col, 1994, Laughon 1991, Tiberio y col, 1994) y por lo tanto los genes que lo contienen pueden actuar como factores de transcripción (Friedman y col, 1994; Zappavigna y col., 1991), tanto en autorregulación como en transregulación (Bentley y col, 1993).

El homeobox fue identificado originalmente en los genes homeóticos de *Drosophila* y como ha sido altamente conservado en la evolución, se han podido descubrir varios homólogos de estos genes en diversas clases animales, que incluyen nemátodos, moluscos, erizo de mar, peces, ranas, aves y mamíferos. Dentro de los mamíferos, los genes homeóticos son denominados como Hox para los murinos y HOX para los humanos.

Como se muestra en la Figura 1, específicamente en mamíferos, 39 genes HOX han sido identificados y clasificados en cuatro grupos referidos como A, B, C y D (Scott, 1992; Zeltser y col., 1996) los cuales se localizan en los cromosomas humanos 2, 7, 12 y 17 respectivamente (Boncinelli, y col, 1989; Chariot y Castronovo, 1996; Cilio y col, 1992; Care y col, 1994 y 1996) específicamente en las regiones 2q31, 7p15.3, 17q21.3 y 12p13.3 (Cilio y col, 1996; Apiou y col, 1996).

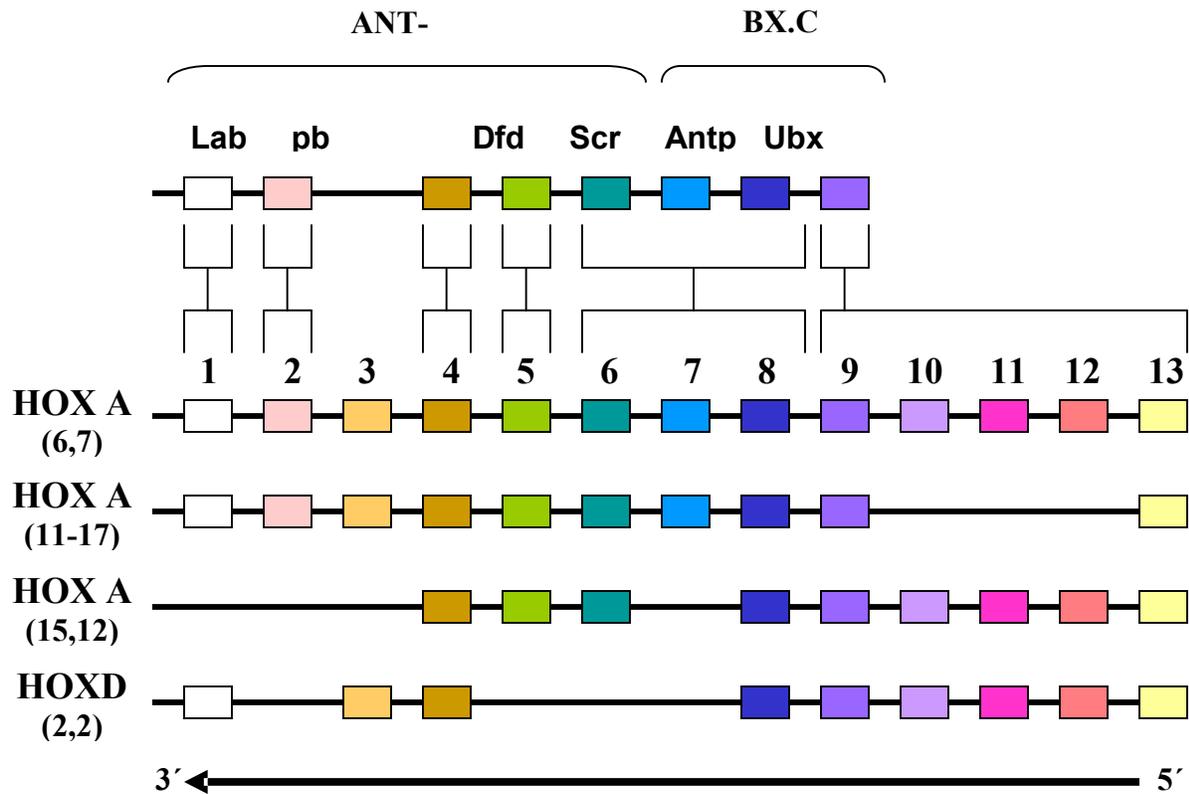
El ordenamiento de los genes dentro de cada complejo HOX es esencialmente el mismo que el complejo HOM de *Drosophila*, sugiriendo que los 4 grupos completos de los vertebrados se originaron por duplicación de un solo complejo primordial y que ha presentado su organización básica (Alberts y col, 1994).

## Antecedentes.-

Se ha implicado a los genes HOX en los siguientes procesos:

- Existe una regulación coordinada de genes HOX que juegan un papel importante en la proliferación, crecimiento y diferenciación normal de células (Magli y col. 1991)
- Genes HOXB participan en la proliferación y transformación celular (Krosi y col. 1998)
- Se ha visto la expresión alterada de genes HOX entre tejido sano y con cáncer de riñón, piel, pulmón, mama y colon (Cillio y col, 1992, Rieer y col, 1994, Flagiello y col, 1996, Chariot y Castronovo, 1996, y De Vita y col., 1991)

Se ha establecido la unión entre homeoproteínas y moléculas de adhesión como blancos de las primeras, las cuales juegan un papel central en diferentes procesos celulares tales como el crecimiento, diferenciación, señalización y organización citoesquelética entre otros (Jones y col, 1992, Edelman y Jones, 1993)



**Fig. Comparación del complejo HOM de *Drosophila* y los complejos Hox de los mamíferos.**

El rupo de genes HOM de *Drosophila melanogaster*, es mosrado en su orden cromosomal y esta distribuido en los complejos Antenapedia (ANT-C) y Ultrabithorax (BX-C), los cuales incluyen a los genes labial (lab), Proboscipedia (pb), Deformed (Dfd), Sex com reduced (Scr), Antennapedia (Antp) y Ultrabithorax (Ubx), abdominal-A (abdA). Abdominal-B (AbdB), respectivamente. Cada columna de genes, (mostrada por el mismo color), indica la correspondencia, basada sobre la homologia en la secuencia del homeobox, entre e complejo HOM y los cuatro grupos Hox de los mamíferos (ratón, y humano). Los números 1-13 indican los parálogos identificados hasta el momento (rectángulos de colores). Los números entre paréntesis indican los cromosomas sobre los cuales están localizados los diferentes grupos Hox de ratón y humano respectivamente. El parálogo 6, 7 y 8 están por determinarse si son homólogos al complejo HOM ó son duplicación independiente de algún gen tipo Antennapedia.

**Andrew y Scott, 1992**

Se ha sugerido, la participación de los genes HOX en la fertilidad femenina y masculina en ratos y humano, la mutación de Hoxa 11 y Hoxa 10 en los ratones machos provoca una malformación en los vasos deferentes que los hace parecer como epidídimo. Esta aparente transformación homeótica interrumpe el libre descenso de los testículos al escroto lo que refleja una espermatogénesis defectuosa ya que generalmente los testículos de los mamíferos requieren de la reducida temperatura escrotal para completar a espematogénesis. Las hembras con estos dos genes mutados producen óvulos viables sin embargo no se ha llevado a cabo la implantación de los embriones a causa de un ambiente uterino defectuoso resultando en infertilidad para las hembras. En ambos casos, los mecanismos moleculares de estas anomalías no se conocen claramente. (Hsieh-Li y col, 1995, Satokata y col, 1995).

En el caso del gen HOXA13 ha sido asociado al síndrome de malformaciones en extremidades y genitales (hand-Foot-Genital, HFG), este síndrome, presenta una mutación en el gen A13 que provoca que no se sintetice una parte del homeodominio impidiendo así que la proteína pierda su función de factor de transcripción provocando en las personas con HFG acortamiento de los dígitos en las extremidades, y en las hembras, típicamente esta involucran un útero parcial o totalmente dividido debido a defectos en la fusión de los tubos Mulerianos (Mortlock e Innis, 1997, y Scott, 1977).

Algunos genes de los grupos A y D se han encontrado en estructuras del tracto normal femenino y masculino durante el desarrollo embrionario así como en el organo adulto. Se tienen reportes en los que se ha demostrado la expresión de genes A9, A10, A11 y A13 (Taylos y col. 1997), así como D10, D13 (Dollé y col. 1991) en estructuras embrionarias genitales de ratones, machos y hembras y se ha visto que la expresión de éstos genes se mantiene en los animales adultos

## **Hipótesis.-**

El patrón de expresión de RNAm y la expresión de genes HOXB1, RET, será diferente en ratas controles que las tratadas durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata.

## **Objetivo General**

Establecer el patrón de expresión de RNAm poli A+ y Poli A<sup>-</sup>, así como la expresión de los genes HOXB1 durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata.

## **Objetivos Específicos.**

- 1.- Establecer el patrón diferencial de las poblaciones de mensajeros durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata.
- 2.- Establecer el patrón de producción de cDNA marcados durante el periodo de diferenciación hipotalámica
- 3.- Determinar la presencia de transcritos HOX B1 Durante la diferenciación sexual tanto controles como tratados.

## MATERIAL Y METODOS

El material biológico se obtuvo del Bioterio del Centro Medico Nacional s. XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

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

- a).- Condiciones constantes de luz-oscuridad (12 hrs de luz-12 hrs de oscuridad)
- b).- Temperatura  $21 \pm 1$  °C
- c).- Humedad controlada.
- d).- 11 a 15 cambios de aire por hora
- d).- Sanitización programada
- e).- Agua y purina “ad libitum”.

Como nuestro principal propósito biológico era estudiar las crías a tiempos muy cercanos a la hora del nacimientos, fue necesario tener un control exacto del tiempo en que ocurría este evento. Con este objeto decidimos llevar un control del tiempo de la fecundación y realizar una vigilancia constante de las madres, sobre todo al final del embarazo para anotar la hora exacta en que ocurrieron los partos.

### MADRES

- 1).- Se seleccionaron ratas hembras de 60 días de edad. Para obtener 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. Esta primera camada no fue utilizada y se permitió la gestación solo para demostrar la capacidad reproductiva de las ratas seleccionadas, así como para realizar una segunda selección de acuerdo al comportamiento maternal observado. De acuerdo a estas observaciones se seleccionaron finalmente solo aquellas ratas con apropiada ciclicidad estral, con gestación y camadas normales y que presentaron un comportamiento maternal adecuado.
- 3).- Dos semanas después de este primer parto se realizó nuevamente el seguimiento del ciclo estral y durante la fase de estro del tercer ciclo, se colocaron en una jaula, un macho por cada dos hembras, durante 6 horas.
- 4).- Cada dos horas, se verifica la presencia de espermatozoides por la aparición del tapón vaginal y/o por frotis vaginal, considerándose como inicio de la gestación el momento en que se detecta un tapón vaginal claro o la presencia de espermatozoides en la cavidad vaginal.
- 5).- Es importante mencionar que bajo estas condiciones de observación se encontró que el tiempo de gestación es de  $502 \pm 3$  horas.

## CRIAS

- a).- Durante el parto, se considera como hora cero, el nacimiento de cada una de las crías de la camada.
- b).- Una hora después del nacimiento, se realiza el tratamiento de las ratas, machos y hembras. Se agrupan en lotes de 9-10 crías y se administran los tratamientos hormonales pre-definidos, de acuerdo al siguiente esquema:

### *Hembras*

Controles: 20µl de aceite de girasol  
Tratadas: Propionato de Testosterona 30µg en 20 µl de aceite de girasol

### *Machos*

Controles: 20 µl de aceite de girasol  
Tratados: Tamoxifen 200µg en 20µl de aceite de girasol.

- c).- 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 se cubre con vaselina.
- d).- Las ratas se sacrificaron después del tratamiento a los siguientes tiempos:
- |    |        |
|----|--------|
| 1  | Hora   |
| 3  | Horas  |
| 6  | Horas  |
| 12 | Horas  |
| 24 | Horas  |
| 48 | Horas. |
- e).- Inmediatamente después del sacrificio se realiza la obtención del tejido hipotalámico.

## OBTENCION DE LOS HIPOTALAMOS

El aislamiento de los hipotálamos se efectúa a 4°C, realizando cortes a los siguientes niveles (Vangala, 1979):

<i>Corte Anterior</i>	Límite anterior del quiasma Óptico
<i>Corte Posterior</i>	Cuerpos Mamilares
<i>Corte Lateral</i>	Surcos Hipotalámicos Laterales
<i>Corte Superior</i>	Comisura Anterior.

Una vez extraídos los hipotálamos se pesan, se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan a -70 °C en el mismo medio, hasta el momento de usarse.

**ESQUEMA DEL PROCESO METODOLOGICO PARA LA SECUENCIACION DE GENES QUE SE EXPRESAN DURANTE LA DIFERENCIACION SEXUAL DEL HIPOTALAMO**

SELECCION DE LAS RATAS MADRES



SELECCION DE LAS DE CRIAS



OBTENCION DEL HIPOTÁLAMO



EXTRACCION DE RNA



**RNA**  
Cuantificaciòn E. F a 260  
Espectro de Absorciòn 200 a 300 nm

**RNA Electroforesis**

**mRNA Poli A+ y Poli A-**

**RT-PCR**  
Marcaje con  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{dCTP}$ , NEG-013H -3000 Ci/mmol)

**RT-PCR**  
HOX B1  
RET

## **EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR EL MÉTODO DE TRIAZOL (Chaomzinsky y col. 1987)**

- 1.- Se homogeneiza el tejido de la muestra en 1 ml. de reactivo de triazol, manteniendo la relación de 50-100 mg de tejido, utilizando un homogeneizado Polytron, vidrio-teflón.
- 2.- Se incuba la muestra del homogeneizado por 5 min. a temperatura ambiente, , y se adiciona 0.2 ml. de cloroformo por ml. de triazol utilizado, agitar vigorosamente por 15 seg. e incubar 3 min. a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga las muestras a 12 000 g por 15 min. a 4° y se procede a se orgánica de la fase acuosa.

### **FASE ACUOSA**

- 3.- Transferir las dos fases acuosas colectadas a un nuevo recipiente, y se adiciona 1 ml. de isopropanol, se incuba a temperatura ambiente por lo minutos, y posteriormente se centrifuga a 12.000 g por 10 min. a 4°C.
- 4.- El botón (RNA) se le adiciona 1 ml. etanol al 75% , se mezcla en el vortex y se centrifuga a 7500 g por 5 min. a 4°C.
- 5.- El botón, se seca parcialmente y se disuelve en agua. se incuba por 15 min. a 60°C. Y se procede a realizar el espectro tomando en cuenta las lecturas a 230, 260 y 280 para determinar la concentración.

### **FASE ORGÁNICA**

- 6.- Se realiza una reextracción más con 1 ml. de sol. de Triazol, más 0.2 ml. de cloroformo, y se procede a juntar las dos fases acuosas, que es con la que se trabaja.
- 7.- Eliminación de fase acuosa de la interface. Se adiciona 0.3 ml. de etanol al 100%, mezclar las muestras por inversión. y se incuban las muestras a Temperatura ambiente de 2-3 min. se centrifuga la muestra a 2000 g por 5 min. a 4°C.
- 8.- Se lava el botón tres veces con 1 ml. de solución de citrato de sodio 0.1M en etanol al 10%. .En cada lavado, se incuba la muestra por 30 min. a temperatura ambiente (con movimiento periódico) y se centrifuga a 2000 g por 5 min. a 4°C.
- 9.- Posteriormente, el botón se suspende en 2 ml. de etanol al 75% , se incuba a T.A. por 20 min. (con agitación periódica), y se centrifuga a 2000 g por 5 min. a 4°C..

9.- El botón se seca y se disuelve 50  $\mu$ l. de NaOH 8mM. Centrifugar nuevamente a 12000 g por 10 min. para remover el material insoluble. y Transferir el DNA en un recipiente nuevo. Se realiza un espectro, tomando las lecturas a 260 y 280. para determinar su concentración.

## ELECTROFORESIS DE RNA

### Preparación del Gel.

0.35 g de agarosa en 25 ml..  
1.56 ml. Agua Estéril  
(Disolver a 68°C)  
4.5 Formaldehido  
5.0 Bófer de Corrida.

### Preparación de la Muestra.

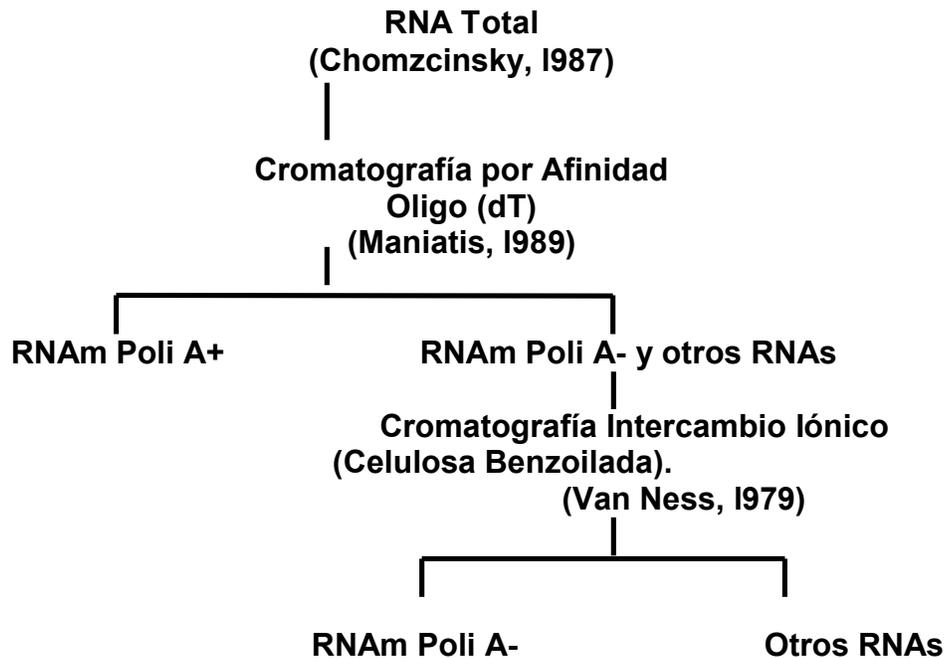
10 ul. de formamida  
4 ul. de Formaldehido  
2 ul. de B. de Corrimiento  
Muestra (Mayor de 30 ug).en 5 ul.  
0.5 ul. d Bromuto de Etidio (3 ug/ml)

### Bófer de Corrida.

0.1 M MOPS pH 7.0  
40 mM Acetato de Sodio pH 7.0  
5 mM EDTA pH 8.0

- 2.- Se Corre a 40 V por 1.5 horas.
- 3.- Se visualiza en un transiluminador de Luz U.V. Sigma T 12021.

# Esquema de aislamiento de poblaciones de mRNA Poli A+ y Poli A-



## **Preparación de la Columna:**

Se suspendieron de 0.5 a 1.0 g de oligo (dT) celulosa en NaOH 0.1N, se eliminó el aire mediante aplicación de vacío, con la suspensión así obtenida, se forma una columna en una jeringa de plástico, colocando como soporte inicial fibra de vidrio estéril. La columna así preparada nos permite adicionar hasta 10 mg de RNA total con la mejor resolución, para separar el RNA mensajero del poli A+ contenido en esta cantidad de RNA total.

La columna se lava con H<sub>2</sub>O hasta que el filtrado tenga un pH de 7.0 y se estabilizó con búfer de cargado 1X.

Inicialmente la muestra de RNA total se disolvió en 1.0 ml de agua destilada estéril, se realizó un espectro de U.V. para conocer la concentración inicial del RNA, se calentó 3 min a 65 °C, se enfrió rápidamente a temperatura ambiente y se le adicionó un volumen igual de búfer de cargado 2X. La solución así obtenida se aplicó sobre la columna de afinidad de Oligo (dT) Celulosa

Una vez adicionada la solución problema a la columna y permitida la interacción adecuada se adicionó un volumen de búfer de cargado 1X y se colectó el filtrado en un tubo estéril, se calienta nuevamente a 65°C, se enfrió a temperatura ambiente y se reaplicó a la columna.

Se colectó el filtrado y se lavó la columna con 5 volúmenes de la solución búfer de cargado 1X (hasta que la lectura a 260 nm sea de cero ó muy cercana a cero) y se colectan fracciones de 1 ml. Las fracciones que tengan absorbancia a 260 nm se reunieron con el filtrado para posteriormente pasarlos por la columna de celulosa benzoilada, para la extracción del RNAm poli (A-).

La elución del RNAm poli A+ retenido por la columna de oligo (dT) celulosa, se realizó con bófer de elución, colectando fracciones de 1.0 ml. Posteriormente se leyeron las fracciones a 260 nm., las fracciones que tuvieron absorbancia se juntas y se les adicionó acetato de Sodio hasta una concentración final de 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol y se almacenaron a -20°C, posteriormente se centrifugaron, se decantaron, el RNA se secó para disolverlo y hacer su espectro de UV para conocer su concentración.

<b>SEPARACIÓN DE RNAm POLI A- (Van Ness, 1979)</b>
--

<b>Reactivos</b>	NaCl 2M (Baker) NaCl 3M (Baker) Acetato de Sodio 3M pH 5.2 (Merck) Etanol Absoluto (Merck) Celulosa Benzoilada (Merck)
<b>Bófer de elución</b>	Etanol al 50% v/v (Merck) Tris HCl 0.05M (Sigma) EDTA 5mM pH 7.2 (Sigma)
<b>Bófer de disolución</b>	Tris 0.01 M (Sigma) EDTA 0.001M pH 7.4 (Sigma)
<b>Bófer de Lavado</b>	Tris-HCl 0.05M (Sigma) EDTA 5mM (Sigma) NaCl 0.3M (Baker)

### ***Preparación de la columna.***

La celulosa benzoilada se suspende en NaCl 2M, el aire se elimina cuidadosamente mediante la aplicación de vacío y se monta la columna de 1 cm de altura, la cual se lava profusamente con etanol al 95%.

Se lava abundantemente la columna con bófer de lavado hasta que la lectura a 260 nm sea de 0 ó muy cerca de cero.

El RNA problema se disolvió en bófer de disolución y se realizó un espectro de U.V., se calentó a 67°C durante 3 minutos y se le adiciono NaCl hasta alcanzar una concentración final de 0.3 M.

Se enfrió rápidamente a temperatura ambiente y la solución se adicionó a la columna.

Se lavó la columna con bófer de lavado colectando fracciones de 1.0 ml. hasta que la lectura de las fracciones a 260 nm sea muy baja o nula (aquí están presentes el RNAr y el RNAt).

Se eluyó el RNAm poli A- retenido por la columna con bófer de elusión, colectando fracciones de 1.0 ml., se juntaron las fracciones que tuvieron lectura a 260 nm.

El RNAm poli A- eluído, se le adiciono acetato de sodio 0.3M conc. final y se precipito con 2.5 vol. de etanol al 95%, se almaceno a -20°C, posteriormente se centrifugó, se decantó, y se secó, finalmente se disolvió para determinar su concentración espectrofotométricamente a 260 nm.

## ELECTROFORESIS DE DNA

Bófer de Corrida TAE 50X

0.004 M Tris-Acetato  
0.001 M EDTA (pH 8.0)

Bromuro de Etidio.

1000x solución stock 0.5 mg/ml.

Bófer cargador.

20% de Ficoll  
0.1 M EDTA pH 8.0

- 1.- Se utiliza el gel al 1% de agarosa.
- 2.- Se Corre a 60 V por 2 horas.
- 3.- Se visualiza en un transiluminador de Luz U.V. Sigma T 12021.

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE DNA MARCADAS RADIATIVAMENTE (Feinberg, 1984)

Reactivos:

- 1.- Búfer con iniciadores de extensión 5X
- 2.- Mezcla de Deoxinucleosidos 5X (menos dCTP)
- 3.- Fragmento Klenow . Fragmentos grande DNA Polimerasa I.
- 4.- Control de DNA pBR322 10 mg/ml.
- 5.- Agua desionizada.
- 6.- ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP, NEG-013H -3000 Ci/mmol)

### PROCEDIMIENTO

- 1.- Calentar la muestra de DNA a 90°C por 5 minutos, e inmediatamente después ponerla en hielo, , microcentrifugar el tubo a 8000 rpm 30 seg..
- 2.- Adicionar por 30 ng de DNA desnaturalizado 6ul. de Búfer de extensión 5X en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 3.- Al tubo de reacción adicionar 6 ul. de mezcla de nucleosidos
- 4.- Adicionar la cantidad necesaria de agua para un volumen final de 30 ul.
- 5.- Adicionar 10 ul. del dCTP al tubo de reacción.
- 6.- Al tubo de reacción adicionar 1 ul.de Enzima DNA Polimeraza 1., Se mezcla y se incuba por 60 min. a temperatura ambiente.
- 7.- La reacción se detiene con la adición de 5 ul. de EDTA a 250 mM.
- 8.- Se purifica la muestra pasando sobre una columna de sephadex G-50.

## TRANSCRIPCION REVERSA (Care y col, 1994) (Giampolo y col, 1994)

Un microgramo de RNA total fue sometido a una reacción de RT PCR de un solo paso mediante el kit RT-PCR 3U **Superscript II Reverse Transcriptase**, lab. Gibco/BRL con las condiciones de ciclaje, temperatura y oligonucleòtidos específicos para los genes HOX B1 (Care y col, 1994) y Ret (Giampolo y col, 1994)

### **Electroforesis en el y visualización de los productos.**

Se tomo una alícuota de lo ul. De cada uno de los productos de reacción de RT PCR y se transfirieron a un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se sometieron a electroforesis, los productos fueron visualizados en un transvisualizador de luz UV para ácidos nucleicos. Las imágenes se obtuvieron e imprimieron por computadora.

#### **Aparato**

Termocycler Perkin Elmer

**Se lleva a cabo por triplicado.**



## RESULTADOS

En la fig. I, se observa un incremento paulatino del peso corporal en las ratas controles, tanto machos como hembras. El crecimiento durante las primeras 48 horas es del 30.4% de peso a una hora. En relación con los animales tratados se observa un incremento alrededor del 35.5% en las hembras y del 34.8% en los machos.

De acuerdo a nuestros resultados, podemos indicar que la manipulación de las crías durante la administración de los fármacos no interfiere con la aceptación de ellas por parte de las madres (lo que indica que hubo una correcta selección de las ratas por su esperado comportamiento maternal) lo que manifiesta un adecuado manejo.

En cuanto al peso del hipotálamo es notable observar que, según nuestros resultados, las ratas machos controles dos h después del nacimiento, es decir una hora después de ser tratadas con aceite de girasol, poseen un hipotálamo significativamente mayor que las hembras (Fig. 1a). Sin embargo a las tres h después del nacimiento, y en todos los demás tiempos estudiados, esta diferencia ha desaparecido. También es importante observar que en las ratas hembras tratadas, una hora después de la aplicación de testosterona no es posible observar la diferencia en peso señalada en el párrafo anterior.

Las concentraciones de RNA total en hembras controles son significativamente mayores que en los machos a las dos y a las cuatro horas después del nacimiento, es decir entre 1 y 3 h después de ser inyectadas con el vehículo (Fig. 3a). Además de esta diferencia, es posible observar que los cambios de concentración de esta macromolécula en el hipotálamo de las ratas hembras controles presenta un patrón notablemente diferente al patrón de modificaciones observado en los machos controles (Fig. 3a). En las hembras se observa una disminución a partir de las 3 h, alcanzando el nivel más bajo a las 12 h momento en que se inicia un incremento que prosigue hasta las 48 h. Con respecto a los machos controles el RNA total muestra un persistente aumento en su concentración, alcanzando su nivel máximo a las 48 h, con una disminución transitoria a las 24h.

En el caso de los machos tratados con tamoxifen (pseudohembras) (Fig. 3b) se observa, en primer lugar, que la concentración de RNA total es semejante a la de la hembra control a las 2 y 4 h después del nacimiento, es decir que en los machos tratados con tamoxifen no es posible encontrar la diferencia en la concentración de RNA total descrito en el párrafo anterior. En segundo lugar, se encontró la presencia de un patrón femenino en las modificaciones de la concentración de RNA total, con una paulatina disminución de los niveles de RNA total hasta las 24 horas y un incremento a las 48 horas (Fig. 3b). En ambos casos, tanto hembras controles como machos tratados, se observan los valores mas bajos del RNA total entre las 12 y las 24 horas.

En el caso de las hembras tratadas (Fig. 3b) se observa un patrón irregular de cambios en la concentración de RNA total que no es semejante a ninguno de los señalados anteriormente, pero con una tendencia general a la disminución, encontrándose los menores valores a las 48 horas.

Con respecto al RNA mensajero total (Fig. 4), se observa que durante las primeras horas de vida su concentración hipotalámica es semejante en las ratas hembras y en los machos, mostrando un pequeño, pero significativo, descenso entre 1 y 3 horas después de la inyección del aceite de girasol. A partir de este tiempo la conducta de este importante componente celular es completamente diferente en hembras y machos controles. En efecto, en las hembras se observa un aumento notable de su concentración que alcanza un pico a las 12 horas, descendiendo después a las 24 y a las 48 h (Fig. 4a). Por el contrario en los machos el descenso inicial se continúa hasta las 6 horas, manteniéndose posteriormente dentro de los valores encontrados a las 4 horas después del nacimiento (Fig. 4a).

En la fig. I, se observa un incremento paulatino del peso corporal en las ratas controles, tanto machos como hembras. El crecimiento durante las primeras 48 horas es del 30.4% de peso a una hora. En relación con los animales tratados se observa un incremento alrededor del 35.5% en las hembras y del 34.8% en los machos.

De acuerdo a nuestros resultados, podemos indicar que la manipulación de las crías durante la administración de los fármacos no interfiere con la aceptación de ellas por parte de las madres (lo que indica que hubo una correcta selección de las ratas por su esperado comportamiento maternal) lo que manifiesta un adecuado manejo.

En cuanto al peso del hipotálamo es notable observar que, según nuestros resultados, las ratas machos controles dos h después del nacimiento, es decir una hora después de ser tratadas con aceite de girasol, poseen un hipotálamo significativamente mayor que las hembras (Fig. 1a). Sin embargo a las tres h después del nacimiento, y en todos los demás tiempos estudiados, esta diferencia ha desaparecido. También es importante observar que en las ratas hembras tratadas, una hora después de la aplicación de testosterona no es posible observar la diferencia en peso señalada en el párrafo anterior.

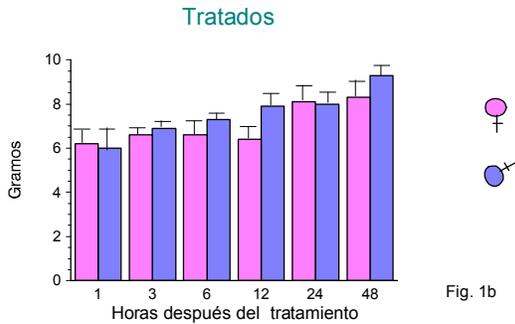
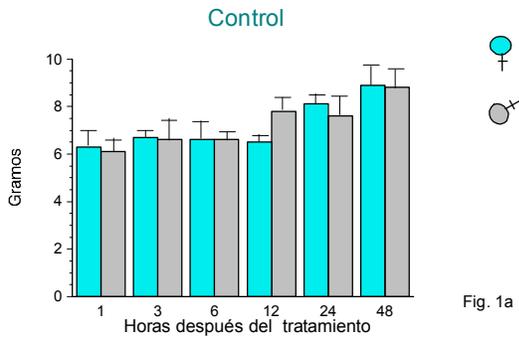
Las concentraciones de RNA total en hembras controles son significativamente mayores que en los machos a las dos y a las cuatro horas después del nacimiento, es decir entre 1 y 3 h después de ser inyectadas con el vehículo (Fig. 3a). Además de esta diferencia, es posible observar que los cambios de concentración de esta macromolécula en el hipotálamo de las ratas hembras controles presenta un patrón notablemente diferente al patrón de modificaciones observado en los machos controles (Fig. 3a). En las hembras se observa una disminución a partir de las 3 h, alcanzando el nivel más bajo a las 12 h momento en que se inicia un incremento que prosigue hasta las 48 h. Con respecto a los machos controles el RNA total muestra un persistente aumento en su concentración, alcanzando su nivel máximo a las 48 h, con una disminución transitoria a las 24h.

En el caso de los machos tratados con tamoxifen (pseudohembras) (Fig. 3b) se observa, en primer lugar, que la concentración de RNA total es semejante a la de la hembra control a las 2 y 4 h después del nacimiento, es decir que en los machos tratados con tamoxifen no es posible encontrar la diferencia en la concentración de RNA total descrito en el párrafo anterior. En segundo lugar, se encontró la presencia de un patrón feminoide en las modificaciones de la concentración de RNA total, con una paulatina disminución de los niveles de RNA total hasta las 24 horas y un incremento a las 48 horas (Fig. 3b). En ambos casos, tanto hembras controles como machos tratados, se observan los valores mas bajos del RNA total entre las 12 y las 24 horas.

En el caso de las hembras tratadas (Fig. 3b) se observa un patrón irregular de cambios en la concentración de RNA total que no es semejante a ninguno de los señalados anteriormente, pero con una tendencia general a la disminución, encontrándose los menores valores a las 48 horas.

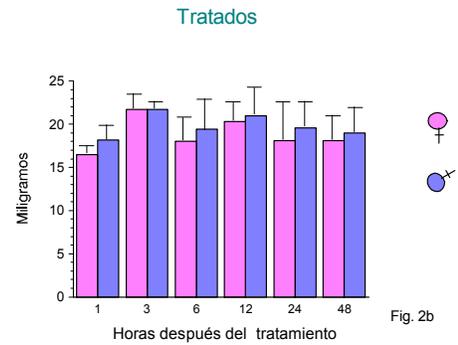
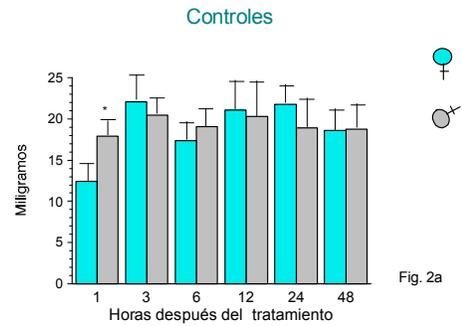
Con respecto al RNA mensajero total (Fig. 4), se observa que durante las primeras horas de vida su concentración hipotalámica es semejante en las ratas hembras y en los machos, mostrando un pequeño, pero significativo, descenso entre 1 y 3 horas después de la inyección del aceite de girasol. A partir de este tiempo la conducta de este importante componente celular es completamente diferente en hembras y machos controles.

## PESO CORPORAL



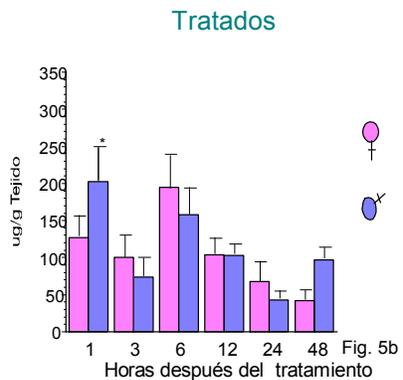
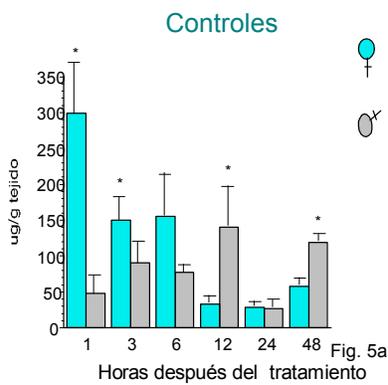
Cada barra representa el promedio de 4 determinaciones.  
Cada determinación consta de 4-10 hipotálamos en cada poza.

## PESO DE LOS HIPOTALAMOS



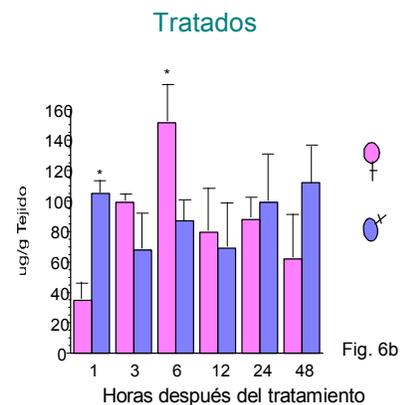
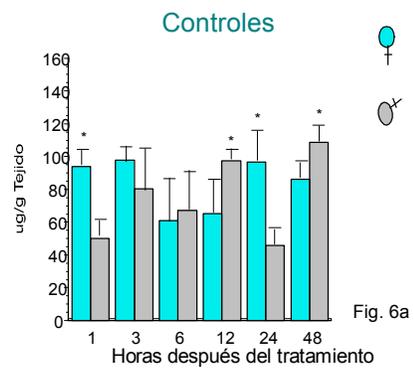
Cada barra representa el promedio de 4 determinaciones.  
Cada determinación consta de 4-10 hipotálamos en cada poza.

## Poli A+



Cada barra representa el promedio de 4 determinaciones.  
Cada determinación consta de 4-10 hipotálamos en cada poza.

## Poli A-



Cada barra representa el promedio de 4 determinaciones.  
Cada determinación consta de 4-10 hipotálamos en cada poza.

En efecto, en las hembras se observa un aumento notable de su concentración que alcanza un pico a las 12 horas, descendiendo después a las 24 y a las 48 h (Fig. 4a). Por el contrario en los machos el descenso inicial se continúa hasta las 6 horas, manteniéndose posteriormente dentro de los valores encontrados a las 4 horas después del nacimiento (Fig. 4a).

En los machos tratados con tamoxifen, o pseudohembras (Fig. 4b), los niveles de RNAm total bajan a las 3 h y se incrementan ligeramente a las 6 y 12 horas semejando el comportamiento observado en las hembras controles, En el Caso de las hembras tratadas (Fig. 4b), la concentración inicial de RNAm total (1 hora después de la aplicación de la testosterona) es menor que en los controles de ambos sexos y se mantiene baja hasta las 3h, después de este tiempo la concentración de RNAm se incrementa, alcanzando a las 12 h su máximo nivel. En general puede considerarse que mantienen el mismo patrón de las ratas hembras controles

En la figura 5 se indican las variaciones observadas en la concentración de uno de los componentes del RNAm, el RNAm poliadenilado (Poli A+). En este parámetro es posible observar una impresionante diferencia entre hembras y machos controles a las dos horas después del nacimiento, siendo la concentración en el hipotálamo de las hembras 6-7 veces mayor que en el hipotálamo de los machos (Fig.5a). A pesar de que la concentración de estas moléculas desciende drásticamente en las hembras, mientras que aumenta en los machos, la diferencia es aún notable a las 4-7 horas después del nacimiento. La persistencia en la disminución de la concentración de RNAm Poli-A+ en las hembras controles, junto con el constante aumento de estos mensajeros en el macho lleva a una inversión total en la relación de concentraciones a las 12 horas después del tratamiento de los animales con el aceite de girasol. En efecto a este tiempo la concentración de Poli-A+ en el hipotálamo del macho es 3-4 veces mayor que en el hipotálamo de la hembra (Fig. 5a). Posteriormente se encuentra en ambos sexos una importante disminución de los niveles a las 24 h y un ligero incremento a los 48 horas, mayor en los machos que en las hembras (Fig. 5a).

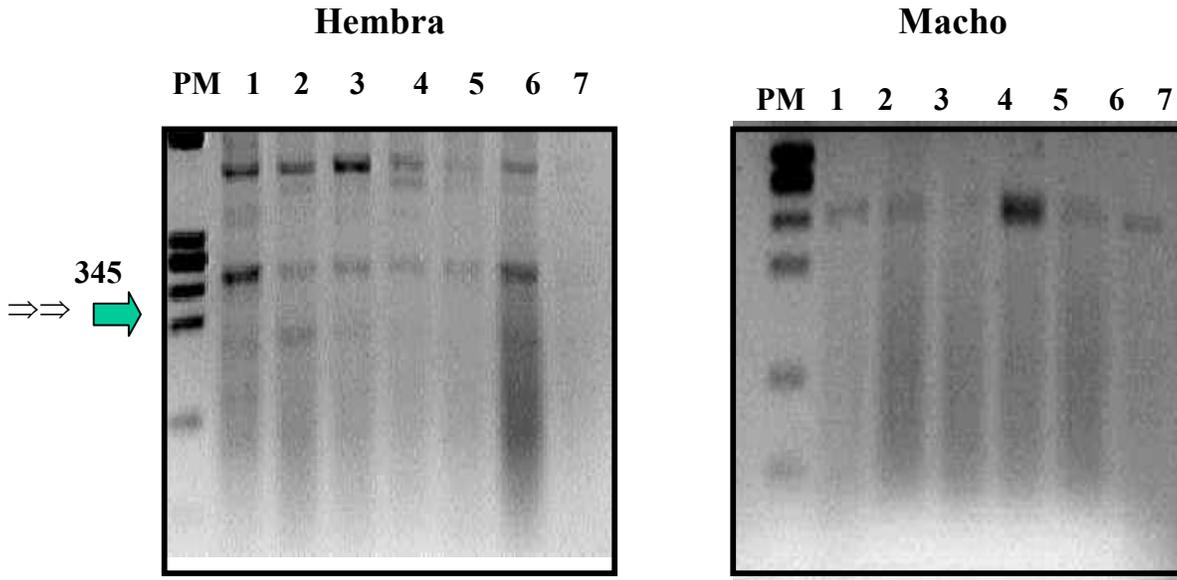
En los machos tratados con tamoxifen es importante hacer notar que la concentración de RNAm Poli-A+ dos horas después del nacimiento es semejante a la encontrada en las hembras controles ( $202.9 \pm 106.3$  contra  $299.2 \pm 169.9$  ug/g de tejido), mientras que en las hembras tratadas con testosterona la concentración de estas macromoléculas a este tiempo es mayor que en los machos controles, pero significativamente menor que en las hembras controles ( $126.8 \pm 38.8$  contra  $299.2 \pm 169.9$  ug/g de tejido). También es importante hacer notar que el descenso persistente en la concentración de RNAm Poli-A+ observado en las hembras controles, se ve interrumpido en las hembras tratadas por la presencia de un importante pico de concentración de este tipo de mensajeros a las 6 horas, lo cual puede interpretarse como una tendencia masculinizante en el patrón de modificaciones de este parámetro. Es verdaderamente notable que a partir de las primeras horas, el patrón del Poli-A+ es notablemente semejante entre hembras y machos tratados, no semejando, por el contrario, ninguno de los patrones observados en los animales controles

Con respecto a los niveles hipotalámicos de Poli A- (Fig. 6), es posible observar que el patrón de cambios es notablemente similar en las hembras y en los machos controles, con dos diferencias fundamentales: a las dos horas después del nacimiento, una hora después del tratamiento con aceite de girasol, la concentración de RNAm Poli-A- es nuevamente mayor en la hembra que en el macho (Fig. 6a), aunque en este caso solo aproximadamente el doble, ( $93.9 \pm 39.3$  contra  $50.1 \pm 27.8$  ng/ g tejido). La segunda diferencia importante se encuentra a las 24 horas, tiempo en que la

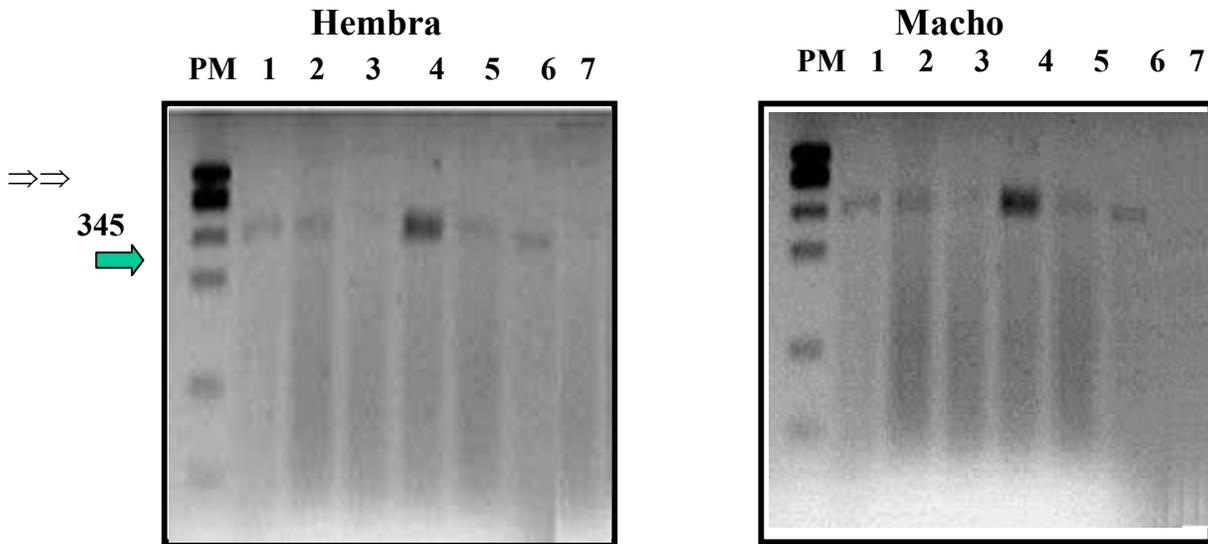
# Expresión del gen HOX

Fig. 9

## CONTRO



## TRATADO

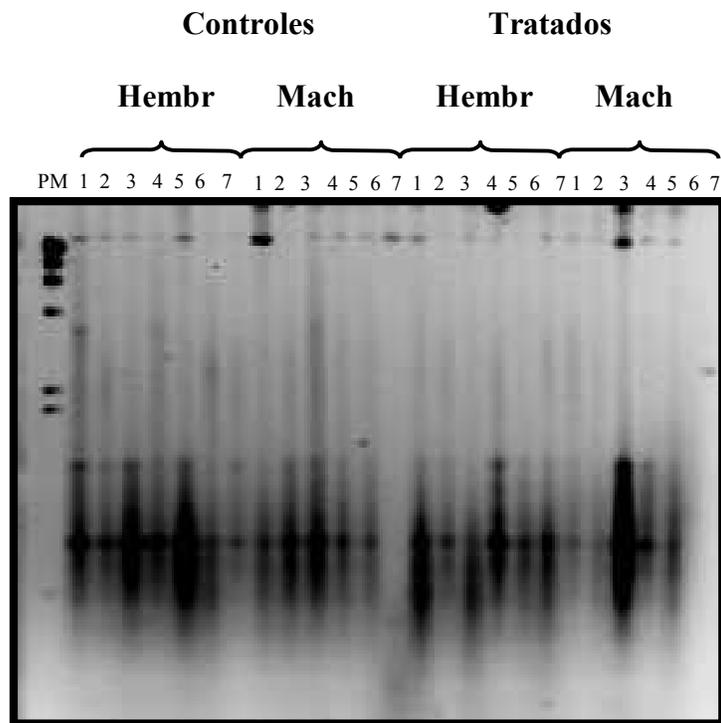


- 1.- 1 h
- 2.- 3 h
- 3.- 6 h
- 4.- 12 h
- 5.- 24 h
- 6.- 48 h
- 7.- 90 días

Gel de agarosa al 1.5%  
100 V,

Fig. 10

**PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE DNA  
MARCADAS RADIACTIVAMENTE  
(Feinberg, 1984)**



$(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{dCTP}$ . NEG-013H -3000

relación entre las concentraciones de RNAm Poli-A- entre hembras y machos controles es semejante a la observada a las dos horas después del nacimiento (Fig. 6a).

En el caso de los animales tratados, es notable observar que las dos diferencias fundamentales señaladas en el párrafo anterior entre los animales controles se encuentran revertidas. En el caso de los machos tratados (o pseudohembras), los niveles de Poli A- a la hora y a las 24 horas después del tratamiento con tamoxifen son elevados, semejantes a los encontrados en las hembras controles y significativamente diferentes de los señalados para los machos controles. Por el contrario, en las hembras tratadas (pseudomachos) las concentraciones hipotalámicas de RNAm Poli-A tienden a ser bajas y semejantes a las encontradas en los machos controles. Es también importante destacar la presencia en las hembras tratadas con testosterona de un pico de concentración de Poli-A- a las 6 horas después de la aplicación del esteroide, esta conducta no es observable en ningún otro de los grupos de animales estudiados.

En la figura 7 se indica la relación que existe entre las concentraciones de poli A+ y poli A-. Parece de la mayor importancia hacer notar que mientras que en las ratas hembras controles, con la única excepción de los resultados encontrados a las 24 horas, existe una predominancia clara de RNAm poliadenilados, llegando a ser hasta 4 veces mayor que la concentración de RNAm Poli-A- a las doce horas (Fig. 7a). En el macho, con la excepción de los resultados encontrados a las 24 horas, la concentración de RNAm con cadenas cortas o ausentes de poliadenina tiende a ser mayor que la concentración de RNAm Poli-A+ (Fig. 7a).

En los machos tratados (o pseudohembras) la relación Poli-A+ / Poli-A- tiende a invertirse mostrando una predominancia de mensajeros poliadenilados sobre los no poliadenilados, semejante a la conducta observada en las hembras controles (Fig. 7b). Por el contrario las hembras masculinizadas por tratamiento con testosterona, manifiestan una tendencia muy aparente a la masculinización de las relaciones RNAm Poli-A+ / RNAm Poli-A-, alcanzando valores cercanos al 50% durante las primeras 6 horas siguientes a la aplicación de la testosterona. Esta tendencia, tanto en los machos como en las hembras, es sobre todo clara en los resultados obtenidos durante las primeras 6-12 horas después de la aplicación del tratamiento experimental.

En la Fig. 9, se observa los patrones de expresión de HOXB1, se observan mayor expresión en las hembras controles en todos los tiempos, a excepción de los machos controles donde a las 3 y 6 horas, se observa una disminución en la expresión, no presentando continuidad en la expresión, lo mismo ocurre en la expresión de los tratados.

## DISCUSIÓN

El tamoxifen en el organismo adulto, se sabe que se une a receptores estrogénicos intracelulares, previniendo que estos sean ocupados por el estradiol. El tamoxifen actúa en forma similar en el organismo en desarrollo, después de la aromatización de andrógenos testiculares a estrógenos, el tamoxifen impide que se forme el complejo receptor estrógenos, de esta manera, los estrógenos no interactúan en el núcleo celular del SDN-POA, por ocupar los receptores estrogénicos intracelulares. El efecto inhibitorio del tamoxifen en la vida postnatal sobre el desarrollo y diferenciación del SDN-POA en ratas macho, no es solo actuando para impedir la aromatización de los andrógenos testiculares a estrógenos, sino también a la subsecuente interacción de estos estrógenos con el material nuclear (Döhler, 1984).

Se ha observado que 10 o 100 ug de tamoxifen reduce el volumen del SDN-POA de un 26 a 40% en la rata macho. El tratamiento postnatal con tamoxifen interfiere con el crecimiento y diferenciación del SDN-POA, no solo se ve afectado el del macho, sino también de la hembra. 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. El efecto desfeminizante de la acción de los antagonistas estrogénicos sobre la diferenciación de las funciones sexuales cerebrales, podría atribuirse a una posible actividad estrogénica de este compuesto. Sin embargo, se ha indicado que el tamoxifen no actúa como estrogénico sobre la diferenciación del SDN-POA, ya que se ha visto, que los estrógenos perinatales estimulan la diferenciación del SDN-POA en ratas hembras, mientras que el tamoxifen inhibe su diferenciación. El tratamiento postnatal en ratas hembras con tamoxifen, muestran que inhibe la diferenciación de los modelos de conducta sexual sin la diferenciación de los modelos conductuales sexuales del macho

Según estudios realizados por Döhler en 1986, en donde trata a ratas hembras embarazadas fueron tratados con tamoxifen a dosis de 200 ug diarios días a partir del día 16 de gestación, y el día 22 de embarazo, se obtienen las crías por cesárea, y estas son tratadas con 10 ug de tamoxifen durante 10 días. El tratamiento pre y de ratas machos con tamoxifen, reducen el peso corporal y peso testicular, pero no influyen sobre el peso del cerebro en general. Los testículos de estos animales fueron pequeños y flácidos, y en la edad adulta, no mostraban la presencia de espermatozoides, así lo demuestran nuestros resultados, con respecto al peso corporal, en donde se observa un crecimiento () tanto en machos como en hembras controles y tratados (Fig, a y b) y con respecto al peso de los hipotálamo, no se ven diferencias significativas (Döhler, 1984b, Döhler, 1984c, Hanke, 1981);..

El núcleo dimórfico del Área Preóptica (SDN-POA) empieza su desarrollo durante la vida fetal tardía, y depende enormemente de un ambiente hormonal durante el periodo de diferenciación sexual.

El tratamiento de ratas hembras con andrógenos aromatizables, o con estrógenos perinatales incrementa el volumen del SDN-POA, mientras que la castración de las ratas macho reduce el volumen de este núcleo. El ambiente hormonal durante la edad adulta, parece no alterar el volumen de dicho núcleo.

El tamoxifen, puede tener influencia de desarrollo y diferenciación del SDN-POA, via una acción directa sobre el sistema nervioso central. Un efecto tóxico del tamoxifen, sobre el CNS es desconocido, ya que en estudios de Döhler (1984) toman como control al núcleo supraquiasmático como control, y no se ve afectado por el tratamiento. Así, la influencia inhibitoria de este antagonista sobre el SDN-POA en áreas cerebrales en donde se conoce la sensibilidad a estrógenos, parece tener una interferencia local con la actividad estrogénica (Döhler, 1984 b), y hay que recordar, que nosotros no consideramos el aislamiento de núcleos específicos,

El tamoxifen sobre el núcleo de las ratas macho tratadas postnatalmente, es similar al efecto de la orquidectomía, que reduce el volumen a la mitad aproximadamente del núcleo dimórfico del área preóptica (SDN-POA). Ni una sola administración de tamoxifen, ni múltiples administraciones influyen significativamente sobre los niveles de testosterona en suero en las ratas machos. Así, el mecanismo de acción de este antagonista estrogénico no parece estar dirigido vía al daño sobre los testículos (Döhler, 1984 b). De acuerdo a nuestros resultados, no se observan diferencias significativas en el peso de los hipotálamos tanto de hembras ni machos controles o tratados, posiblemente, por que es muy poco tiempo para que se expresen diferencias que son de esperarse en animales adultos, de pesos principalmente con machos tratados o pseudohembras aún a las 48 horas.

En relación con RNA total, en donde, se observa disminución de las hembras controles a partir de las tres horas, y alcanzando el nivel más bajo a las 12 horas ( $3.8 \pm 1.1$  a  $1.34 \pm 4.4$ ), y en el caso de los machos controles, estos se incrementan desde la hora 1, alcanzando el nivel más alto a las 12 horas y disminuye a las 24 horas reanudándose nuevamente a las 48 horas, si consideramos que los niveles de testosterona en condiciones normales se incrementan postnacimiento, a partir de las 2 horas (Rhoda, 1984) se pueden evidenciar modificaciones tanto en machos como en hembras controles sobre los parámetros de producción de RNAs total, y en ambos, casos, se observan modificaciones entre las 6 y 24 horas (7 y 25 horas de nacimiento)

En el caso de los tratados, tanto hembras como machos, si se observan disminución en los parámetros de síntesis de RNAs totales, a partir de las 4 horas de vida postnatal (3 horas de tratamiento), y se observan modificaciones en la producción de RNAs. se sabe, que realmente grandes modificaciones en las primeras 4 horas de las respuestas de estradiol en otros tejidos (como el útero) ocurren unión de estrógenos en la membrana, y a extractos citosólicos, elevación de cAMP, transporte incrementado de aminoácidos, glucosa, nucleosidos, disponibilidad de enzimas lisosomales, influjo de calcio, aumento en actividad de RNA polimerasa, incremento en el metabolismo de glucosa y captura de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Szego, 1984), y sin embargo, no se ven modificaciones en los patrones, aun después de las horas subsecuentes.

a partir de las 4 horas, hasta las 22 horas, se observan las siguientes respuestas: incremento en la actividad de DNA marcado de proteínas desde aminoácidos isotópicos, incremento neto de RNA, incremento de todas las actividades enzimáticas, síntesis de histonas, y finalmente la división celular.

En el caso de los macho controles, alcanzando los niveles bajos, indicarían que la producción de transcritos disminuye a partir del DNA, esto se correlacionaría, con las evidencias que existen que los estrógenos, incrementan los receptores a andrógenos en el área preóptica hipotalámica, y como en condiciones normales, ocurre la aromatización de andrógenos aromatizables a estrógenos, estos ejercería su influencia genómica (Burgess, 1993).

Además, se sabe que los receptores a estrógenos, están presentes en el hipotálamo de la rata antes de nacimiento, y se incrementan durante el período perinatal, además que hay otras áreas cerebrales, que tienen la capacidad de aromatizar andrógenos a estrógenos, como un proceso que pareciera jugar un papel clave en la diferenciación sexual del cerebro de la rata macho. ya que se observó que después de la administración de  $^3\text{H}$ -testosterona a ratas neonatales, la radiactividad se presentó en forma de  $^3\text{H}$ -estradiol en la Amígdala, área preóptica y en el núcleo hipotalámico (Vito y col. 1982).

Se ha observado, que no solo la diferenciación sexual del macho, sino también de la hembra (con respecto al desarrollo del cerebro), puede estar influido por hormonas estrogénicas, lo que se podría sugerir, que durante el período perinatal los estrógenos de la circulación sanguínea pueden estimular la diferenciación y/o desarrollo de la sexualidad en ambos sexos. Los requerimientos para las influencias estrogénicas sobre el la diferenciación cerebral, funcional y estructural, podría ser más cuantitativa, que cualitativa., como lo demuestra que Vonm Saal (1983) en ratones hembras y machos, que fueron localizados en el útero entre

otras dos hembras, tenían más altos niveles de estradiol en su fluido amniótico, y mostraban en la edad adulta, mejor desarrollo de conducta sexual femenina o masculina que las hembras o machos que fueron localizados en el útero entre dos machos.

El tratamiento pre y postnatal de ratas macho con antagonistas estrogénicos como el tamoxifen, inhiben el desarrollo del SDN-POA, y así en la edad adulta, tienen casi el volumen de las hembras controles, mientras que el tratamiento pre y postnatal con antagonistas androgénicos no influyen sobre el volumen, lo que sugiere que el desarrollo y diferenciación del SDN-POA está bajo un control estrogénico en su fase inicial pero no bajo un control androgénico, per se. Ya que el tratamiento pre y postnatal de tamoxifen en ratas macho no influyen sobre los niveles de testosterona durante el período de tratamiento, el mecanismo de acción de este antagonista estrogénico, no parece ser la principal vía dirigida a presentar el efecto de un daño agudo a los testículos (efecto de castración).

En forma alternativa, el tamoxifen parece influir sobre el desarrollo del SDN-POA teniendo como vía principal el sistema nervioso central (CNS). El efecto tóxico del tamoxifen sobre el CNS, aun está desconocido, ya que presenta cierta selectividad, como se ha demostrado en cuando se toman como zonas controles, otros núcleos, como al núcleo supraquiasmático, y este no presenta ninguna alteración, por lo que se sugiere que la influencia inhibitoria sobre el crecimiento de ciertos núcleos es determinado en algunas áreas cerebrales con sensibilidad a estrógenos y parece ser más a una interferencia local con la actividad inducida por estrógenos (Döhler, 1984a)

En la edad adulta el tamoxifen actúa uniéndose a receptores estrogénicos intracelulares y previene la unión del estradiol a estos receptores. El tamoxifen puede actuar similarmente en el desarrollo del organismo. Después de la aromatización de andrógenos testiculares a estrógenos, el tamoxifen podría tener una interferencia con los estrógenos para entrar al núcleo de SDN-POA por ocupar receptores intracelulares a estrógenos. El efecto inhibitorio pre- y postnatal del tamoxifen sobre el crecimiento y diferenciación del SDN-POA en ratas macho, indica que no solo una diferenciación funcional sino también estructural del cerebro de la rata macho puede ser dependiente de la aromatización de andrógenos testiculares a estrógenos, y su subsecuente interacción de estrógenos con el material nuclear.

Además, la aromatización de andrógenos a estrógenos, se considera como un pre-requisito para la masculinización de la área preóptica-hipotálamica y desfeminización de las funciones cerebrales. El tratamiento pre y postnatal de con acetato de ciproterona muestra una permanente feminización de los modelos de conducta sexual femenina y el modo de liberación de gonadotropinas en machos, e inhibe la acción desfeminizante de la testosterona exógena en hembras.

La testosterona se sabe que entra a las células blanco de los andrógenos en el cerebro y ahí, se tiene dos vías, se aromatiza o se 5-alfa-reduce, el principal metabolito es el estradio y la 5(-dihidrotestosterona (DHT). ambas hormonas se encuentran con alta afinidad a receptores proteicos específicos de origen citoplasmático y luego son translocados al núcleo celular donde estimularan la respuesta biológica característica. En el caso del antagonista androgénico no previenen la entrada de andrógenos a la célula, no influyen sobre el metabolismo androgénico. Su principal actividad antagonista, parece estar basada sobre la interferencia con andrógenos intracelulares que se unen a receptores específicos androgénicos en el citosol y previenen la translocación del complejo receptor-andrógeno al interior del núcleo, así, la actividad de la ciproterona está dirigida a mediar los eventos androgénicos, pero no directamente contra los eventos mediados por estrógenos.

De acuerdo a esto, la masculinización y desfeminización de las funciones cerebrales en la rata, parecen estar mediadas no solo por estrógenos sino también parecen requerir la participación de andrógenos per se. Los componentes androgénicos y estrogénicos parece que son requeridos para una completa masculinización y

desfeminización de las funciones cerebrales sexuales. La interferencia de antagonistas hormonales o de otros componentes, es el resultado de una incompleta organización del cerebro. La organización estructural del SDN-POA, sin embargo, parece depender solamente de la entrada de estrógenos.

El tamoxifen, no estimula el desarrollo y diferenciación del SDN-POA de las ratas hembras. Además que el tamoxifen no actúa como un estrógeno, y si mantiene su comportamiento como antagonista de la actividad estrogénica. Mientras que la inducción de esterilidad anovulatoria por el tratamiento perinatal con tamoxifen puede ser el resultado de antagonismo estrogénico, como se ha sugerido, o bien podría ser el resultado biológico de la unión del tamoxifen a los sitios de unión antiestrogénicos, que ya han sido reportados ser diferentes a los receptores estrogénicos (Sudo, 1983).

La castración de ratas macho recién nacidas produce una reducción significativa (cerca del 50%) en el volumen del SDN-POA en la edad adulta, y que puede ser completamente prevenida por la administración exógena de andrógenos al día de nacida. La sola administración subcutánea de propionato de testosterona exógena en hembras recién nacidas, significativamente incrementa el volumen del SDN-POA en el adulto. En ambos casos tanto en machos como en hembras, la manipulación del ambiente hormonal, a través de los cambios de volumen, no deja estructuras reversas sexuales. esto podría ser debido a: a).- Posibles factores no hormonales que puede influir en la diferenciación del SDN-POA. b).- Un requerimiento más grande, más temprano o más prolongado a la exposición de andrógenos en la hembra. C).- para una castración temprana (prenatal) en el caso de las hembras (Jacobson, 1980).

La poliadenilación es un proceso que no suele estar acoplado a la terminación de la transcripción, ya que la transcripción puede continuar cientos y cientos de nucleótidos más lejos del sitio de ruptura 3'-terminal. sin embargo, en algunas especies de levaduras, los sitios de terminación de la transcripción suelen estar situados cerca de los sitios de poliadenilación, lo que sugiere que en dichos organismos ambos procesos se encuentran acoplados (Wickens, 1990).

Los RNAm totales, se encuentran a las 12 horas ( $140.7 \pm 79.0$ ) incrementados en condiciones normales en hembras control, y en el macho, se ven disminuidos desde las 6 horas de tratamiento, alcanzado el nivel más bajo en los machos

Dentro del dimorfismo sexual del cerebro, involucra dimorfismo sináptico, y esta diferencia es iniciada por la acción del estradiol en la infancia, la diferenciación depende de modelos coordinados de biosíntesis de proteínas y recientemente se ha demostrado que el estradiol induce biosíntesis de proteínas específicas en el cerebro neonatal. Esta inducción está relacionada a la diferenciación sexual. (Ani, 1980).

Existen cambios en la distribución de mRNA del cerebro de rata en especial en el área óptica e hipotalámica, en donde los niveles aumentan de actividad en dos ocasiones en la primera etapa ocurre preembrionaria (18-20 días), y el segundo, aumentando significativamente después del nacimiento, alcanzado el máximo nivel a los 2 días y disminuye 4 y 8 días postnacimiento en las ratas hembras (Mouri-Yamada, 1994).

Se ha visto, que los estrógenos inducen incremento en el número de receptores a andrógenos, en el área preóptica hipotalámica y como no hay esa formación de estrógenos por la acción del tamoxifen, no se incrementan los niveles. Al parecer no existen cambios de expresión génica. (Burgess, 1993).

Aún, no está bien claro, como los estrógenos inducen proteínas y puedan modular el desarrollo sináptico, pero si la proteína directa o indirectamente afecta la neurotransmisión, además de que se sabe que ciertas sinapsis pueden ser establecidas en forma selectiva, mientras que otras se degeneran de acuerdo a si los circuitos se están o no usando. Desde que el adenilato ciclasa está íntimamente ligado a receptores a

neurotransmisores, y 3', 5'-AMP, puede tener un efecto trófico en el cerebro, (por ejemplo, puede afectar las estructuras de neurotrúbulos) en donde es posible que las proteínas cerebrales inducidas por estrógenos modular la actividad de adenilato ciclasa, ocasionando cambios permanentes en la estructura de algunas neuronas.

Los efectos de los estrógenos en el hipotálamo, son trascendentales, parte de su efecto inhibitorio sobre el sistema de adenilato ciclasa, existen algunos otros efectos inhibitorios que se han mostrado. Se ha reportado que los estrógenos inhiben la actividad neuronal en el hipotálamo de la rata, y que bloquea la liberación de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GT-RH) inducidas por dopamina. El efecto inhibitorio de los estrógenos parece ser en el hipotálamo principalmente, y si se ha visto, que el cAMP podría modificar la actividad neuronal y posiblemente la neurosecreción y liberación de GT-RH. (Ani, 1980)

La adición de mRNAs se ha establecido que la importancia de la cola de poli A de los RNAs de células eucariotas, es:

- a).- Transporte del mensajero del núcleo al citoplasma
- b).- control de la estabilidad del RNA
- c).- Compartimentalización del RNA en el citoplasma y su asociación con el citoesqueleto.
- d).- Como posibles mecanismos del control de la regulación

### Transporte

El transporte al citoplasma, la cola de poli A parece sufrir una ligera cortada pero todavía muestra una pequeña distribución en tamaño. Así, la longitud, llega a ser más corta y más heterogénea, probablemente porque el porcentaje de los diferentes cortes, difiere por las especies de RNA. Se han observado algunos casos de RNA que sufren alargamiento de su cadena de poli A, en algunas células somáticas, en el citoplasma (readenilación).

Las colas de poli (A) de ciertos mRNAs son prolongadas mientras que las colas de otros mRNA son eliminadas. La adición selectiva de poli (A) es regulada por una secuencia corta en la región 3' sin traducir, mientras que la eliminación de poli (A) de mRNAs específicos es un "estado de falla" que no requiere secuencias específicas. Estos cambios regulados en la longitud del poli (A) juegan un papel mayor en la regulación de la traducción (Wickens, 1990).

Además de que se ha visto, que ciertos mRNAs codifican para proteínas histónicas, se degradan rápidamente y en forma selectiva en las células de mamíferos, y se han establecido algunos requerimientos estructurales para la regulación de la degradación de RNA de histonas, en la estructura 3'-terminal en los procesos de traducción. (Pandey, 1987).

El mecanismo de transporte de los Poli A+, es modulado por la actividad de la NTPasa, asociada al complejo nuclear, sin embargo, el RNA poli A-, no está asociado a dicho complejo, por lo que inicialmente, se sugería que los Poli A- estaban restringidos al núcleo. Sin embargo, existe la duda, de como en el cerebro, en donde las poblaciones de Poli A- corresponden alrededor de un 50%, sufren su exportación fuera del núcleo. Se ha sugerido, que el transporte de los mensajeros, sea cerebro-específico, ya que la actividad de la NTPasa, disminuye significativamente en la etapa postnatal, tan pronto como aumentan los RNA Poli A-, y que pueden estar presentes en el citoplasma por varios días (Schröder, 1987).

Se ha considerado, que existen RNAm que se encuentran presentes en dos formas, mensajeros poli A+ y poli A- pueden sintetizar 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, y se ha visto, en cultivos de células HeLa, que ambos codifican para caseína, globina, kprotaminas, histonas, actinas, por lo que se ha sugerido que puedan ser homólogos con respecto a su composición secuencial, además de que se ha visto, que las secuencias de los hnRNA poli A-, no están presentes en las secuencias de los hnRNA poli A+. (Hahn, 1979)

Lo que podría indicar que los mensajeros Poli A-, juegan un papel importante en la síntesis de proteínas específicas que son importantes que se expresen durante los procesos de diferenciación sexual, en un período determinado, y que ocasionara modificaciones permanentes, y estas modificaciones serán de vital importancia para la expresión reproductiva en ambos sexos.

## CONCLUSIONES

Dentro del dimorfismo sexual del cerebro, involucra dimorfismo sináptico, y esta diferenciación es influenciada por la acción del estradiol en la infancia, la diferenciación depende de modelos coordinados de biosíntesis de proteínas y recientemente ha demostrado que el estradiol induce biosíntesis de proteínas específicas en el cerebro neonatal. esta inducción está relacionada a la diferenciación sexual (Ani, 1980).

Aun no está claro, como los estrógenos inducen proteínas y puedan modular el desarrollo sináptico, pero si la proteína directa o indirectamente afecta la neurotransmisión, además de que se sabe que ciertas sinapsis pueden ser establecidas en forma selectiva, mientras que otras degeneran de acuerdo a si los circuitos se están usando o no. y en este caso, podría estar involucrado el adenilato ciclasa, que está íntimamente ligado a receptores a neurotransmisores y 3', 5-AMP.

Un punto clave en el desarrollo neuronal del sistema nervioso de vertebrados son los genes que codifican al citoesqueleto y las proteínas asociadas en el sistema nervioso. Los microtubulos (MTs) son los componentes principales del citoesqueleto neuronal y juegan un papel importante en el crecimiento y plasticidad neuronal en el desarrollo así como otras funciones. Son polímeros dinámicos, que están ensamblados por proteínas alfa y beta tubulina, como de proteínas asociadas a los microtubulos (MAPs)

Se han identificado en vertebrados, seis genes para alfa tubulina y 7 genes para beta-tubulina, pero ningún solo tejido parece expresar todos estos. El tejido cerebral de mamíferos se han identificado un gran número de genes de tubulina, con 5 isotipos de RNAm de alfa-tubulina y 5 diferentes de Beta-tubulina

Los mRNAs que codifican para proteínas histónicas, se degradan rápidamente y en forma selectiva en células de mamíferos se inhibe la síntesis de DNA y se han establecido algunos requerimientos estructurales para la regulación de la degradación de RNAm de histonas, en la estructura 3' terminal y en los procesos de translación.

La expresión de MAPs en el cerebro, incluyen proteínas motoras que se unen a los microtubulos como la dineína citoplasmática, kinesina y dinamina.

Muchos estudios sobre las funciones citoplasmáticas en que está involucrado la secuencia de poly (A) de mRNAs adenilados y deadenilados, se realizan en oocitos de *Xenopus laevis*. y tales evidencias sugieren que el papel de la cola de poly (A) es para:

**Prolongar la estabilidad del mRNA.** Por ejemplo, Se ha reportado un requerimiento de la secuencia de poly (A) para sostener una translación prolongada de mRNA de globina de conejo en *Xenopus laevis* y más tarde se reportó que la adenilación de mRNA de histonas de células HeLa incrementan su estabilidad funcional .

Marbaix y col. (1975) mostraron que la reducción en la traducción de mRNA de globina deadenilado se correlaciona con su acelerada degradación en el oocito, o quizás que la degradación resulta de una ineficiente traducción. En contraste, según estudios de Deshpande (1979), una parcial deadenilación de globina de rata, también como una completa deadenilación de mRNA de interferon no afectaba su estabilidad funcional en oocitos.

No, fue sino hasta 1985, con los trabajos de Drummond, quienes reportaron la que que poli (A+) y poli (A-) de mRNA SP6 sintéticos para lisosima de pollo, preproquimosina de ternera, y globina de *Xenopus* fueron igual de estables cuando se incubaron por más de 24 h. Sin embargo, sobre similares tiempos, los transcritos de poly (A+) fueron traducidos más eficientemente que los transcritos de poly (A-). Correlacionando la adenilación con un incremento de síntesis de proteínas durante el desarrollo temprano del *Dictyostellum*.

Se ha mostrado, que los mRNAs adenilados y los no adenilados se traducen con igual eficiencia en los tiempos de incubación temprano, pero la traducción disminuye progresivamente con el tiempo. Estos resultados sugieren un modelo en que los mRNAs poli (A) son más competitivos para la traducción que el mRNAs deadenilados.

Se ha investigado, que el efecto de la región 3'-no codificable y la secuencia de poly (A) sobre la traducción y estabilidad de mRNA unidos a membrana y mRNAs libres (*Xenopus* B-globina) por medio de la inyección de transcritos sintéticos de SP6 mRNAs en etapa 6 de *Xenopus*. Con mRNA, la presencia o ausencia de la secuencia 3' no codificable o la secuencia de poly a, tienen poco efecto sobre la estabilidad arriba de 24 horas, y que la secuencia 3- no codificable, no juega ningún papel en la traducción. Con períodos cortos de incubación, 1 o 2 h., la presencia o ausencia de la cola de poly A tienen poco efecto sobre la traducción de mRNA de mazi, pero después de período largo, la traducción del mRNA poli A- disminuye significativamente. Un modelo similar de traducción de mRNA poli (A+) y poli (A-) se observaron en mRNA *Xenopus* beta-globina. Estas diferencias se correlacionan con la formación máxima de polisomas (7-8 ribosomas/mRNA) para el mRNA poli (A+), sin embargo, el poli A-, no se lleva a cabo dicha formación de polisomas. Estos resultados, sugieren que la cola de poli A, facilita la reiniciación de ribosomas durante la síntesis de proteínas.

En el inicio del desarrollo existen cambios en la translación junto con la destrucción de ciertos mRNAs, determinan que proteínas son sintetizadas en que células y cuando.

Las colas de poli (A) de ciertos mRNAs maternos son prolongados, mientras que las colas de otros RNAs son eliminadas. La adición selectiva de poli (A) es regulada por una secuencia corta en la región 3' sin traducir, mientras que la eliminación de la poli (A) de mRNAs específicos es un ("estado de falla") "default state", que no requiere secuencias específicas. Estos cambios regulados en la longitud de poly(A) parece ser juegan un papel mayor en la regulación de la translación.

El corte de la cola de poli (A) parece preceder a la degradación del mRNA, además que muchos mRNAs permanecen intactos hasta que su fracción de poly (A) se remueve. Se ha mostrado que la estabilidad del mRNA de hormona de crecimiento en células, se incrementa cuando su tracto de poli (A) es estirado (Bernstein, 1989).

Experimentos con microinyección a oocitos, revelan que no existe correlación entre estabilidad y longitud de poli (A) para mRNAs de globina- $\alpha_{2\mu}$  y el corte de la cola de poli (A) para mRNAs de actina y tubulina, y no se correlacionaba con su porcentaje de degradación., más sin embargo, se ha mostrado que las moléculas de mRNA puede protegerse (estabilizarse) por más tiempo, si su tracto de poli (A) permanece con un tamaño de 25 a 32 bases, que son lo mínimo necesario para la unión a una sola molécula de PABP.

Existen probablemente muchos determinantes que influyen en la estabilidad del mRNA y varias vías de degradación, dependiendo del mRNA . El corte del tracto de poli (A) puede ser importante para algunos, pero no para todos los mRNAs. por lo que la estabilidad, de algunos mRNAs puede ser determinado por varios factores:

- a).-Por la eficiencia con que ellos son traducidos,
- b).-Por la estructura
- c).-Por su localización intracelular a los polisomas a los que ellos están asociados,
- d).- Por la cantidad de productos finales libres que ellos producen.

En algunos experimentos con células, se ha evidenciado que el metabolismo de poli (A) está unido con la estabilidad del mRNA. Por ejemplo, el tracto de poli (A) de algunos mRNAs son cortados y removidos de una manera dependiente del tiempo, implicando que la eliminación de la cola de poli (A) precede a la degradación del cuerpo del mRNA., Estas observaciones, refuerzan el criterio de que el tracto de poli (A) protege a los mRNA de una degradación indiscriminada. Sin embargo, evidencias directas soportan que la función protectora del poli (A) tiene varias dudas:

- a).- Inhibidores que interfieren con la poliadenilación pueden afectar otros procesos ATP-dependientes y por lo tanto, alterar la especificidad completa.
- b).- Mutaciones en señales de poliadenilación genómica pueden interferir con la poliadenilación cuando los genes mutantes se transfieren a otras células, pero los transcritos resultantes generalmente tienen fragmentos de poli A cortos.

Existen algunas observaciones que indican que :

(I) Se pueden estudiar el rango de decaimiento en células, y se refleja in vitro. Por ejemplo, los mRNA de histonas son degradados rápidamente en células in vitro, mientras que los mRNA de beta y alfa globina son estables tanto in vitro como in vivo.

(II) Los mRNAs de histonas son degradados en dirección 3' a 5' por una o más exonucleasas tanto in vivo como in vitro.

(III) El efecto del poli (A) sobre el turnover de los mRNA in vitro, son similares que en células intactas. Por ejemplo, los mRNA de histonas poliadenilados son 10 veces más estables que su contraparte deadenilada in vitro como in vivo.

(IV) Recientes estudios in vitro, sostienen la idea de que las observaciones de la cola de poli (A) puede preceder a la degradación del cuerpo del mRNA, por lo que el primer paso es la eliminación del tracto de poli (A), y el segundo paso es la degradación del cuerpo, y este paso no empieza, sino hasta que la mayoría o todos los tratos de poli A son eliminados..

Esto establece tres preguntas en relación a la estabilidad del mRNA y el tracto de poli (A):

- a).- La estabilidad de las moléculas de mRNA es proporcional a el tracto de poli (A)?
- b).- El tracto de poli (A) protege al mRNA en la región 3' del ataque de nucleasa, y por lo tanto contribuye significativamente en determinar la vida media de los mRNAs individuales.?
- c).- Que factores pueden intervenir para diferenciar el corte del tracto de poli (A) entre diferentes mRNAs

Parece, que el tracto de poli (A) juega más que un papel en el metabolismo del mRNA, afectando no solo la estabilidad, pero también la eficiencia en la traducción. sin embargo, algunos mRNAs parecen ser estables sin su tracto de poli (A). Así, , puede haber múltiples determinantes en la estabilidad del mRNA y varias vías de degradación, dependiendo del mRNA. El eliminación el tracto de poli (A), puede ser importante para algunos, pero quizás no para todos los mRNAs. La estabilidad de algunos mRNAs podría ser determinado por la eficiencia con que ellos son traducidos, por la estructura o localización intracelular de el polisoma al que esta asociado, o por la cantidad de productos terminados libres que ellos producen.

Además en cuanto al mecanismo de transporte de los poli A+, este es modulado por la actividad de la NTPasa, asociada al complejo nuclear, sin embargo, el RNA poly A-, no esta asociado a dicho complejo, por lo que inicialmente, se sugeria que los mRNAs deadenilados estaban restringidos al núcleo. sin embargo, queda la duda de como son transportados los RNA poli A- si en el cerebro existen en grandes concentraciones.

Cabe mencionar, que existen dos formas de mRNAs para histonas así como b-actina, tanto en su presentación adenilada, como la no adenilada.. Si consideramos que en el cerebro, cerca del 50% es Poli A-, además de que en la etapa postnatal, el mecanismo de NTPasa disminuye significativamente , lo que va seguido por un aumento en las concentraciones de mRNA poli A-, además de que estos pueden estar presentes en el citoplasma por varios días, lo que podría indicar que los mensajeros deadenilados, juegan un papel importante en la síntesis de proteínas específicas importantes durante la diferenciación sexual del hipotálamo, que también se presenta en el periodo postnatal.

Se ha establecido una estrecha unión entre homeoproteínas y moléculas de adhesión como blancos de las primeras (Jones y col, 1993, Edelman y Jones, 1993), las cuales juegan un papel central en diferentes procesos celulares tales como el crecimiento, diferenciación, señalización y organización citoesquelética, algunas secuencias para la unión de homeoproteínas han sido identificadas en la región promotora del gen que codifica para la molécula de adhesión N-CAM, donde los dos genes adyacentes, HOXB9 y HOXB8 pueden diferencialmente estimular la actividad promotora del N-CAM y la baja expresión pudieran ser parte importante el proceso de diferenciación. (Jones y col, 1993, Edelman y Jones, 1993). En 1996 el grupo de Cillo sugiere que L-CAM (una de las primeras cadenas en ser aisladas) es regulada por el gen HOXD9, por lo que de esta manera los genes HOX podrían estar controlando la expresión de moléculas morforegulatorias esenciales para que se determine el proceso de diferenciación neuronal hipotalámica durante el periodo muy temprano alrededor de las 12 hrs.

En suma, 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 machos como hembras. En donde se establece el papel de las influencia hormonal esteroidea durante el periodo postnatal temprano, observando los patrones de conversión de la presencia de indicadores relacionados con la proliferación y muerte celular durante los periodos críticos importantes de la diferenciación.

## BIBLIOGRAFIA

- Appleby, D. W. and Modak, S. P. DNA degradation in terminally differentiating lens fiber cells from chick embryos. *J. Cell* (1977)
- Ani, M, Butterworth P, and Thomas, P.T.Efecto of Estradiol on Neurotransmitter Sensitive Adenylate Cyclase, its Possible Role in 'Sexual Differentiation'. *Brain Research* (1980)183:341-353.
- Arnold, A. P. and Gorski, R. A. , Gonadal steroid induction of structural sex differences in the centralnervous system. *Annu.Rev. Neurosci.*, (1984)7:413-442./
- Bachmann, M., Mayet, W. J., Schröder, H. C., Pfeifer, K., and Meyer, K. H. PNAS 83(1986):7770-7789.
- Baer, B. W., and Jornberg, r. D. The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poli (A)-ribonucleico protein. *J. Cell. biol.* (1983)96:717-721.
- Barr , G. A., Gibbons, J. L. and Moyer, K. E. Male-female differences and the influece of neonatal and adult testosterone on intraspecies aggressions in rats.*J. Comp. Physiol.*(1976)90:1169-1183.
- Barraclough, C. A. and Gorski, R. A. (1961). Evidence that the hipothalamus responsible for androgen-induced syterilityin the female rat. *Endocrinology* (1961)68:68-79.
- Beach F. A. (1975).Hormonal modificationof sexually dimorphic behavior. *Psychoneuroendocrinology* (1974)1:3-23
- Bernstein, P., Peltz, S. W. and Ross, J. The poli (A)-poli (A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Molecular and Cellular biology* (1989)9:659-670
- Beyer, C. Eusterschulte, B., Pilgri, C. and Reiser, I. Sex steroid do not alter sex differences in tyrosine hydroxylase activity of dopaminergic neurons in vitro.*Cell tissue Res.* 1992. In Press.
- Beyer, C., and Feder, H. H., Sex Steroids And Afferet Input. Their Rols in Brain Sexual Differentiation. *Ann. Rev. Physiol* (1987)49:349-364.
- Beyer. C., Kolbinger, W., Froehlich, U., Pilgrim, C. and Reiser, I.Diferencias sexuales de las celulas que producen prolactica en el hipotálamo, independientemente de la presencia de esteroides sexuales.*Brain. Res.* (1992)593:253-256.
- Blautein, J. D., Brown, T. J., Swearngen, E. S. Dopamine 'beta'hidrisylase inhibitors modulate the coentration of functional estrogen receptors in Female Rat Hypothalamus and Pituitary Gland. *Neuroendocrinology* (1989)43:150-156.
- Brawer. J. The role of the arcuate nucleus in the brain-pituitari-gonadal axis. *Comp. neurol.* (1974)143:411-446.
- Brown, T. J., Hochberg, R. B., Zielinski, J. E. and MacLuscky, N. J. Regional Sex. Differences in Cell Nuclear Estrogen'Binding Capacity in the Rat Hypothalamus and Preoptic Area. *Endocrinology*(1988)123:1761-1770
- Care A, Testa V., Bassani, A. tritarelli E. Montesoro E. Sameggia P, Cianetry L, y Peschle C. Coordinat expression and proliferate role of HOXB genes in activated adult T lymphocytes . *Mol. Cell, biol.* 16: 4872-4877, 1996.
- Clemens, L.G. Glaude, B. A. and Coniglio, L. P. Prenatalendogenousandrogenic influeces on masculine sexual behavior and genitalmorphologyin male and female rats. *Hormon. Behav.* (1978)10:40-53.
- Cunningham, T. J. Naturally Ocurring Neuron Death and its Regulation by Developing Neural Pathways. *Int. Rev. Cytol.* (1982)74:163-186.
- Christensen, L.W. and Gorski, R. A. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. *Brain Res.*(1978)146:325-340.
- Dawson, J. L.,Cheung, Y. M. and Lau, R.T. S.Developmental efectos ofneonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol.Psychol.* (1975)3:213-229.
- De Voogd, t. and Nottebohm, F. Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science* (1981)214:202-204.
- DeVito, W. J., Stone, S. and Avakian, C. Stimulation of hypothalamic prlactin release by veratridine and agiotensin II in the female rat'effect of ovariectomy and estradiol administration. *Neuroendocrinology* (1991)54:391-398.
- Dohler , K, D.a, Hines M, coquelin A, Davis, F, Shryne J. E. and gorski, R. A. Pre-and postnatal influece of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphicnucleusof the preoptic area in male and female rats. *Brain Res.* (1984)302:291-295.
- Döhler, K. D. and Wuttke, W., Changes with age in leves of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. *Endocrinology* (1975)97:898-907./
- Döhler, K. D., Coquelin, A., Davis, F., Hines, M., Shryne, J. E., Sickmöler, P. M., Jarzab, B. and Gorski, R. A. Pre-And Postnatal Influence of an Estrogen Antagonist and an Androgen Antagonist on Differentiation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in Male and Female Rats. *Neuroendocrinology* (1986)42:443-448.
- Döhler, K. D.,b Srivastava, S. S., Shryne, J. E., Jarzab, B., Sipos, A., Gorski, R. A. Differentiation of the Sexually Dimorphic Nucleus in the Preoptic Area of the Rat Brain Is Inhibited by Postnatal Treatment with an Estrogen Antagonist. *Neuroendocrinology* (1984)38:297-301.
- Döhler, K.D., c., Hancke, J. L., Srivastava, S. S., Hofmann, C. C.Shryne, J. E., Gorski, R. A. Participation of Estrogens in Female Sexual Differentiation of the Brain: Neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidences. *Progr. Brain. Res.* (1984)
- Edelman GM; Jones. Gene FS regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*, 26(2-3):337-52 1998 May
- Expresion de Raf-1 protein en cerebro de rata durante el desarrollo de su regulación gormonal en el hipotálamo.
- Feder H. H. Hormones and sexual behavior. *Ann.Rev. Psychol.*(1984)35:165-200.
- Garcia Segura, L. M., Olmos, G., Robbins, R.J., Hernandez P-, Meyer, J. H. and Naftolin, F. Estradiol induces rapid remodelling ofplasma membranes in developing rat cerebrocortical neurons in culture. *Brain Res.* (1989)498:339-343.
- Garcia-Segura, L. M., Olmos, G., Tranque, P. and Naftolin, F. Rapid efectos of gonadal steroids upon hypothalamic neuronal membrane ultrstructure, *J. Steroid. Biochem.*, (1987)27:615-623.
- Gerall, A. A., Hebdricks, S. E. Johnson, L. and Bounds T. W. Evaluation of the efectos of early castration in male rats on adult sexual behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* (1967)64:206-212.
- Giampolo A, Sterpetty P, gulgarini, D, Samoggia, P, Pelosi E, Valtieri M, y Pesche C. key functional role and lineage-specific expresion of selected RET gene purified hematopoietic progenitor differentiation. *Glodd* 84:3637-3647, 1994.

- Giordano, D. L., Murray, M., and Cunningham, T. J. Naturally Occurring Neuron Death in the Optic Layers of the Superior Colliculus of the Postnatal rat. *J. Neurocytol.* (1982)9:603-614.
- Gorski, R. A. aSexual dimorphism of the brain. *J. Anim. Sci.*(1985)61:1001-1004.
- Gorski, R. A. (1988)Hormone-induced sex differences in hypothalamic structure. *Bull. TMIN:* 16(3)67-90.
- Gorski, R. A. , Jacobson, C. D. Sexual Differentiation of the brain. In *Clinics in andrology:pediatric andrology.* Vol. III. Edited by Kogan, S. J. Hafez, E.S. E. (1981).pp 109-134.
- Gorski, R. A. bSexual differentiation of the brain. possible mechanisms and implications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (1985)63:577-594.
- Gorski,, R. A. Inflouece of age on the response to paranatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology* (1968)82:1001-1004.
- GriffithsE. C. Hooper, K.,C. Effect of neonatal androgen on the activiiv ofpeptidases in the rat brain inactivating luteinizing hormone-releasing hormone. *Horm. Res.*(1976)7:218-226.
- Gulder, F. H. Sexual dimorphism of axo-spine synapses and postsynaptic density material in the supraquiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett* (1982)145-150.
- Handa, R. J., Hines, M., Schoonmacker, J. N., Sgryne, J. E., and gorski, R. A. Evidence the Serotonin is Involved in the Sexually dimorphic Development of the Preoptic Area in the Rat. *Brain. Dev. Brain. Res.* (1986)30:278-232.
- Handa, R.J., Roselli, C. E., Horton, L., and Resko, J. A.. The quantitative distribution of cytosolic androgen receptors in microdissected areas of the male rat brain:effectos of estrogen treatment. *Endocrinology* (1987)121:233-240.
- Hanke, J. L., Döhler, K. D. Comparison of Estrogenic Versus Antiestrogenic Influences on postnatal defeminization and masculinization of the Rat Brain. *Exp. Brain. Res.* (1981) suppl.3 :352-353.
- HarburgenV, and Openheim R.W. Naturallyu-occurring neuronal death in vertebrates. *Neuroscienci. Commentaries* (1982)1:39-55.
- Harlan R. E. and Gorski, R. A. Steroid regulation of luteinizing hormone secretion in normal and androgenized rats at different ages. *Endocrinology* (1977)101-741-749.
- Hayashi S. and Gorski, R. A.Critical exposure time for androgenization by intracranial crystals of testosterone propionate in neonatal female rats.*Endocrinologi* (1974)94:1161-1167.
- Hines M. Prenatalgonadal hormones and sex differences in human behavior. *Psychol.Bull* (1982)92:56-80.
- Hornung, J. P., Koppel, H., and Clarke, P. G. H. Endocytosisi and Autophagy in dying Neurons: An Ultrastructural Study in Chick Embryos. *J. Comp. Neurol.*(1989)283:425-429.
- Hutchison, J. B. Hormonal control of behavior: Steroid action in the brain. *Curr. Opinion Neurobiol.* (1991)1:562-570.
- Jacobson, C.D., Shryne, J. E., Shapiro, F. and Gorski, r. A. Ontogey of the sexually dimorphic nucleusof the preoptic area. *J. comp. Neurol.* (1980)193:541-548.
- Jarzab. B., Kaminiski, M., Gubala, E., Achtelick, W., Wagiel, J. and Döhler, K. D. Postnatal Treatment of Rats with the (2-Adrenergic Agonist Salbutamol influences the Volume of the Sexually Dimorphic Nucleus in the Preoptic Area. *Brain Res.* (1990)516:257-262.
- Lawrence, J. M. raisman, G. Ontogeny of synapses in a sexually dimorphic kpart of the preoptic area in the rat. *Brain. Res.* (1980)183:466-471.
- Lincoln, G. A. and Short, R.V. Seasonal breeding:nature´s contraceptive.Recent Prog. *Horm. Res.* (1980)36:1-52. 1980
- LumiaA. R. Raskin, L A. Effects of androgen on marking and aggressive behavior of neonatally and prepubertally bulbectomized and castrated male gerbils. *J. Comp. Physiol. Psychol.*(1977)91:1377-1389.
- Magli MC; Largman C; Lawrence HJ. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol*, 173(2):168-77 1997 Nov
- Matsumoto, A. and Arai, Y.Sexual dimorphism in "Wiring Pattern" in the Hypothalamic Arcuate Nucleus and its Modification by Neonatal Hormonal Environment. *Brain Res.* (1980)190:238-242.
- Matsumoto, A., and Arai, Y. Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinology* 42(1986)232-236
- Meisel R. L. and Ward, I. L. Fetal female rats are masculinized by male littermates located caudally in the uterus. *Science*(1981)213:239-241.
- Michael, R. P., Bonsall, R. W., and Rees, H. D. The nuclear accumulition of 3H-testosterona and 3H-estradiol in the brain of the female primate`Evidence for the aromatization hypothesis. *Endocrinology* (1986)118:1935-1944.
- Naftolin, F., MacLusky, N. J., Leranth, C. Z., Sakamoto, H. S. and García-Segura, L. M., The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues. *J. Steroid. Biochem.*, (1988)30:195-207.
- Naftolin, Fa K. Ryan, J.Davier, V. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent. Prog. Horm. Res.* (1975)31:295-319.
- Nance D. M. Gorski R. A.Facilitation of female sexual behavior in male rats by septallesions: an interaction withestrogen. *Horm. Behav.* (1975)6:289-299.
- Nielsen, D. A. and Shapiro, D. J. Hormonal Control of the estability of the mRNA. *Molec. Endocrinologi* (1990)4(7)953-957,
- Nooshne, D., Reid, W., McNaught, Shirish, S. and Roy, G.S. Receptor Interversion Moderl of Hormone Action. 2. Requirement of both Kinase and Phosphatase Activities for Conferring Estrogen Binding Activity to the Estrogen Receptor. *Biochemistri* (1990)29:2691-2698.
- Nordeen, E.J., Nordeen, K. W., Sengelaub, D. R. and Arnold, A. P., Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* (1985)229:671-673.
- O'Keefe, R. T, Mayeda, A., Sadowski, C. L. Krainer, A. R. and Spector, D. L. Disruption of Pre-mRNA Splicing In Vivo Results in Reorganization of Splicing Factors. *Journal Cell.Biology* (1994)124:249-260.
- Ojeda , S. R. Futher sutidies on the maturation for the estrogen negative feedback on gonadotropin release in the female rat. *Neuroendocrinology* (1975)18:242-255.
- Olmos, G., Naftolin, F., Perez, J. Tranque, P. A. and Garcia-Segura, L. M., sunaptic remodelling in the rat ar arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* (1989)32:663-667.
- Pandey, N. B. and Marzluff, W. F.The Stem-Loop Structure at the 3'End of Histone mRNA Is Necessary and Sufficient for Regulation of Histone mRNA Stability.*Molec. and Cell. Biol.*(1987)7:4557-4559.

- Pascalini, C., El Abed, A. Kerdeljué, B., Strain differences in neuroendocrine responses to exogenous prolactin in the cycling female rat. *Neurosci. Lett.* 22(1989)663-667.
- Pérez, J. Naftolin, F., and García, S. L. M. Sexual Differentiation of synaptic Connectivity and neuronal Plasma Membrane in the Arcuate Nucleus of the Rat Hypothalamus. *Brain Res* (1990)527:116-122.
- Plapinger, L., McEwenn, B. S. Ontogeny of estradiol-binding macromolecule. *Endocrinology* (1973)93:1129-11139.
- Raisman and Field, reciente, conectividad sináptica. (Gorski, 1983),
- Reiset, J., and Pilgrim Ch. sexual diferenciación de monoaminérgico neurón-genético o epigenético? *Trends Neurosci* (1991)14:468-473.
- Reuben, W., Rhjees, J., Shrine E., and Gorski, R. A. Onset, perinatal period hormo-sensitiv to sexual differentiation of dimorphic nucleus of preoptic area in female rats. *J. Neurobiology* (1990)21:781-786.
- Rhees, R.W., Shryne, J. E. and Gorski, R.A. Termination of the Hormones-Sensitive Period for Differentiation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in Male and Female Rats. *Developmental Brain Research* (1990)52:17-23.
- Rhoda, J., corbier, P. and Roffi, J., Hypothalamic testosterona increase in the male rat at birth. *Int. J. Dev. Neurosci*, (1983)1:187-190.
- Roselli, C. E., Horton, L. E., and Resko, J. A. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* (1985)117:2471-2477.
- Sachs, A. B., Davis, R. W., and Kornberg, R. D. A single domains of yeast poly (A)'binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Cell Biol.* (1987)7:3268-3276.
- Sakach M; Safaei R. Localization of the HoxB5 protein in the developing CNS of late gestational mouse embryos. *Int J Dev Neurosci*, 14(5):567-73 1996 Aug
- Schröder, H. C., Bachmann, M., Diehl-Seifert, B. Müller, W.E. Transport of mRNA from Nucleus to Cytoplasm. *Progress in Nucleic Acid Research in Molecular Biology* 34(1987)89-142.
- Schröder, H. C., Zahn, R. K., y Müller, E. G. *J.B.C.* 257(1982)2305-2310
- Selmanoff, M. K., Brodtkin, L. D. Aromatization and 5 alpha reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. *Endocrinology* (1977)101:841-848.
- Steimer, T. H. and Hutchison, J. B. Is Androgen-Dependent aromatase activity sexually differentiated in rat and Dove preoptic Area? *J. Neurobiology* (1990)21(5)787-795.
- Steiner R. A. Clifton, D. K. Spies, H. G. Sexual differentiation and feedback control of luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Biol. Reprod.* (1976)15:206-212.
- Sudo, K., Monsma, F. J., Katzenellenbogen, F.S. Antiestrogen-binding sites distinct from the estrogen receptor: subcellular localization, Ligand Specificity, and Distribution in Tissues of the Rat. *Endocrinology* (1983)112:425-434.
- Swanson, H. E. and Van Der Werf ten Bosch, J. J. The "early-androgen" syndrome: differences in response to prenatal and postnatal administration of various doses of testosterone propionate in female and male rats. *Acta Endocrinol.* (1965)47:37-50.
- Torand-Alleran, C. D. Sex. Steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation, *Brain Res.* (1976)106:407-412.
- Torand-Alleran, C. d. Hashimoto, K., Greenough, W. T. and Saltarelli, M. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. III Effects of estrogens on dendritic differentiation. *Dev. Brain, Res.* (1983)7:97-101.
- Ulibarri, C. Popper, P and Micevych, P. E. Role of Postnatal Androgens in Sexual Differentiation of the Lordosis-Inhibiting Effect of Central Injections of cholecystokinin. *J. Neurobiol.* (1990)21(5):796-807.
- Vito, C., Fox, T. Androgen and Estrogen Receptors in Embryonic and Neonatal Rata Brain. *Dev. Brain, Res.* (1982)2:97-110.
- Vom Sall, F. S., Grant, W. M., McMuller, C. W., Laves, K. S. High Fetal Estrogen Concentrations: Correlation with Increased Adult Sexual Performance and decreased aggression in male mice. *Science* (1983)220:1306-1309.
- Walsh, R. J. and Brawer, J. R., Cytology of the arcuate nucleus in the newborn male and female rats. *J. Anat.* (1989)128:121-133.
- Walsh, R. J., Brawer, J. R. and Naftolin, F. Early postnatal development of the arcuate nucleus in normal and sexually reversed male and female rats. *J. Anat.* (1982)135:733-744.
- Weisz, J. And Ward, I.L., Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetus, and neonatal offspring. *Endocrinology* (1980)106:306-316.
- Whalen R.E. Rezek Inhibition of lordosis in female rats by subcutaneous implant of testosterone, androstendione or dihydrotestosterone in infancy *Horm. Behav.* (1974)5:125-128.
- Whorf, R. C. and Tobet, S. A. Expresion de Raf-1 protein en cerebro de rata durante el desarrollo de su regulación gormonal en el hipotálamo. *J. Neurobiology* (1992)23:103-119.
- Wickens, M. In the Beginning is the End: Regulation of Poly (A) Addition and Removal During Early Development. *TIBS* (1990)15:320-324.
- Wilson, J. D. George, R. F., Griffin, J. E., The hormonal control of sexual development. *Science* (1981)211:1278-1284.
- Williams, R.W. and Herrup, H. The control of neuron number. *Ann. Rev. Neurosci.* (1988)11:423-453.
- Wolin, L. The Formation of Estrogens by Central Neuroendocrine Tissue. *Rec. Prog. Horm. Res.* (1975)31:295-319.
- Wood, K.A., Dipasquale, B. and Youle. In situ labelling of granule cells for apoptosis' associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* (1993)11:621-632.

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

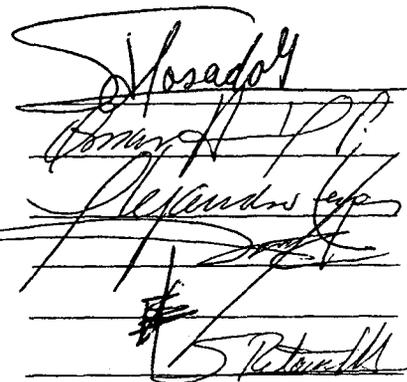
En la ciudad de México el día 24 de noviembre del 2003 a las 11:00 horas en la Unidad Iztapalapa, se reunieron para llevar a cabo el examen Predoctoral en Ciencias Biológicas de la alumna **Marcela Vergara Onofre**, los miembros del jurado que participaron en la revisión de la tesis titulada "Biología molecular de la diferenciación sexual hipotalámica" y el representante de la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas, quienes constataron que fueron incorporadas satisfactoriamente todas las recomendaciones sugeridas durante las revisiones previas al trabajo final de tesis.

Por la presentación y defensa del trabajo, se determinó que Si fue aprobado el examen Predoctoral de la alumna **Marcela Vergara Onofre**, por lo que Si está en condiciones para presentar la disertación final de su tesis para alcanzar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

**Atentamente**  
"Casa abierta al tiempo"

**MIEMBROS DEL JURADO  
COMITÉ TUTORIAL**

Tutor: Dr. Adolfo Rosado García  
Asesor: Dr. Omar Hernández Pérez  
Asesor: Dr. Alejandro Reyes Fuentes  
Jurado: Dra. Ana María Rosales Torres  
Jurado: Dr. Marco Antonio Rodríguez Medina  
Por la Comisión: Dra. Ma. del Socorro Retana Márquez



ccp: Archivo

**UNIDAD IZTAPALAPA**

Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina  
Iztapalapa, A.P. 55-535, 09340 México, D.F.  
Fax: (5) 612-80-83 Tel.: 5804-6551

**UNIDAD XOCHIMILCO**

Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud  
A.P. 23-181, Coyoacán, 04960 México, D.F.  
Tel.: 5483-7504 5483-7000 Ext.: 3082 y 3185  
E-mail: doctocb@hotmail.com



Casa abierta al tiempo

## UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

México D.F., a 29 de Octubre del 2003.

### COMITÉ DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTE

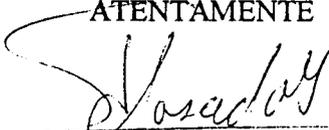
Por este conducto comunicamos a Ustedes, que hemos revisado la tesis de la Maestra en Ciencias Marcela Vergara Onofre, con el título "Biología Molecular de la Diferenciación Sexual Hipotalámica", como requisito para optar por el grado de doctor en Ciencias Biológicas. Después de discutir exhaustivamente la tesis mencionada, analizar los datos con la candidata y revisar al formato del documento escrito, consideramos que cumple con todos los requisitos científicos y académicos que exige el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana.

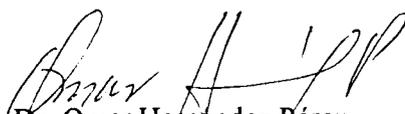
Sugerimos como sinodales a los siguientes académicos. (en orden de prioridad):

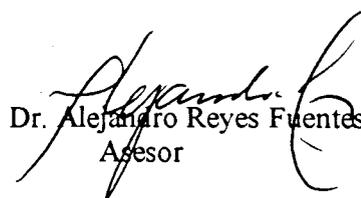
- |   |               |
|---|---------------|
| 1.- Dra. Ana Ma. Rosales Torres*        | UAM-Xoch.     |
| 2.- Dr. Marco Antonio Rodríguez Medina* | ENEP Zaragoza |
| 3.- Dr. Enrique Canchota Martínez*      | UAM Izt.      |

La fecha tentativa para el examen predoctoral es 24 de Noviembre del año en curso.

ATENTAMENTE

  
Dr. Adolfo Rosado García  
Tutor

  
Dr. Omar Hernández Pérez  
Asesor

  
Dr. Alejandro Reyes Fuentes  
Asesor

\* El Comité del Doctorado tiene en su poder los curriculum vitae de los que sugerimos.