



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**"CONCENTRACIÓN DE CITOCROMO P450
AROMATASA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN
SEXUAL Y EL ESTADO ADULTO DE LA RATA".**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

M.V.Z. MIREYA CALDERÓN BECERRIL

TUTORES

**Dra. ANA MARIA ROSALES TORRES
Dr. MARCO ANTONIO RODRIGUEZ MEDINA**

ASESORES

**Dr. ENRIQUE CANCHOLA MARTÍNEZ
M. en C. MARCELA VERGARA ONOFRE**

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

Mi agradecimiento al consejo nacional de ciencia y tecnología por la beca-crédito otorgada numero 153014

GRACIAS

A DIOS

Por darme la fuerza necesaria para salir adelante de los momentos tan amargos que he vivido.

A MIS PADRES

Por su apoyo y cariño incondicional que me permiten realizar mis sueños.

A GERARDO

Por su gran ayuda, su tiempo, su espacio y sobre todo por el gran amor que me expresa todos los días.

A MI HERMANO por estar conmigo cuando más lo he necesitado y a su ESPOSA por su ayuda de todos los días.

A LOS DOCTORES ANA Ma. ROSALES Y ADOLFO ROSADO

Por compartir conmigo sus conocimientos

A MARCO Y MARCE

Gracias por su tiempo, su ayuda y por distinguirme con su amistad.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LABORATORIO

A Héctor por su ayuda continua durante la realización de esta tesis y a Juanita por los momentos de trabajo que juntas compartimos haciendo mas agradable mi instancia en el laboratorio.

A MIS TRES ANGELITOS

Mireyita, José y Ale, por alejar la rutina de mi vida a cambio de momentos extraordinarios y por compartir conmigo la experiencia de ejercer la profesión más compleja y gratificante de todas... ser mamá.

A LA DOCTORA IVONNE

Por su contribución en la aportación del material biológico

A MI UNIVERSIDAD

Por permitir formarme en sus aulas y por ser el lugar donde he pasado momentos hermosos de mi vida.

DEDICATORIA

**A MI NUEVA FAMILIA: GERARDO, MIREYITA, JOSÉ Y MI NUEVA
ADORACIÓN: ALE, A QUIENES DEDICO MI TRABAJO Y MI VIDA
ENTERA.**

ABREVIATURAS

APO	Área Preóptica
SVN	Sistema Vomeronasal
NAM	Núcleo Amigdaloso Medio
NDS-APO	Núcleo Dimórfico Sexual del Área Preóptica
ÁPOm	Área Preóptica Medial
NPV-APO	Núcleo Periventricular del Área Preóptica
LH	Hormona Luteinizante
HMB	Hipotálamo Medio Basal
NPV-APOm	Núcleo Periventricular del Área Preóptica Medial
BSTMA	Base del Núcleo de la Stria Terminalis Medial Anterior
BSTLA	Base del Núcleo de la Stria Terminalis Lateral Anterior
AM	Amígdala Media
RNAhn	Ácido Ribonucleico heteronuclear
NE	Neuroesteroides
SNC	Sistema Nervioso Central
NPm	Núcleo Preóptico Medial
BNST	Base del Núcleo de la estria terminalis
AMYm	Amígdala Medial
AMYCo	Amígdala Cortical
NVM	Núcleo Ventromedial
RAs	Receptores para Andrógenos

RESUMEN

Los eventos reproductivos de la mayoría de los vertebrados dependen de la expresión armónica de las conductas estereotípicas de cada sexo, comprenden eventos fisiológicos que integran coordinadamente la información sensorial y hormonal indispensable en este proceso y que aún es muy difícil de explicar.

Los estudios iniciales precursores del concepto actual de la diferenciación sexual cerebral, mostraron que, además del sexo genético, el ambiente hormonal que rodeaba el tejido cerebral era también indispensable. En este sentido, los testículos juegan un papel crucial, ya que sus secreciones hormonales (testosterona) en una fase específica del desarrollo cerebral "período crítico" son capaces de ejercer cambios morfo-anatómicos, farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos que dan lugar a cambios permanentes estableciendo estructuras sexualmente dimórficas.

La posibilidad de que el RNA total y el RNAm del citocromo P450 arom, presenten diferencias sexuales en su concentración o expresión (asimetría funcional) en el hipotálamo, como resultado de fenómenos de masculinización (presencia de la aromatización de andrógenos) y feminización (ausencia de la aromatización de andrógenos), son discutidos en esta tesis.

Los resultados obtenidos en cuanto a concentración de RNA total y concentración de citocromo P450 aromatasa en hembras y machos tanto tratados como controles resaltaron el hecho de que la diferenciación sexual del cerebro como la desfeminización y masculinización, asociados con la biosíntesis de proteínas que dan lugar a las funciones sexuales del cerebro de la rata son irreversibles una vez que el proceso ha sido completado.

Este acontecimiento fue confirmado con los datos presentados en esta tesis ya que la mayor concentración RNA total se encontró en ratas hembras tratadas neonatalmente con PT que en ratas las controles, y viceversa en los machos, la mayor concentración se observó en los machos controles que en los tratados con tamoxifén. Ambos eventos son indicadores de que la modificación del ambiente hormonal durante el período crítico de la diferenciación sexual hipotalámica produce cambios irreversibles sobre la transcripción de la información genética de las células hipotalámicas involucradas.

La concentración de RNA demostró la presencia de asimetría funcional en la concentración de RNA entre los hemisferios hipotalámicos en casi todos los tiempos estudiados al compararse con el de los hemisferios de los animales controles. El hemisferio hipotalámico derecho (hhd) de los machos controles recién nacidos presenta un pico máximo en la concentración del RNA total (22.53 $\pm$ 1.0 μ g/mg de tejido hipotalámico), a la 3 h para posteriormente mantenerse en

una concentración sin diferencia significativa en cuanto a concentración a las 6, 12, 24 y 48 h.

En el caso del hemisferio hipotalámico izquierdo (hhi) de los machos controles, la máxima concentración del RNA se observó a las 1 y 12 h (24.07 ± 1.0 y 22.60 ± 1.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido hipotalámico). La administración de tamoxifen provocó un significativo decremento en la concentración del RNA total, en el hhd a la hora post tratamiento para decrecer a valores significativamente menores en los otros tiempos estudiados, en el hhi se da una conducta similar al estudiar los distintos tiempos.

En el caso de las hembras tratadas, existe también una tendencia a presentarse una respuesta asimétrica en la concentración del RNA total en todos los tiempos estudiados. La máxima concentración en el hhd se presentó a la hora del tratamiento (27.66 ± 1.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido hipotalámico), mientras que en el HHI se dio a las 6 h post tratamiento (18.31 ± 1.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido hipotalámico).

Lo anterior está relacionado con la expresión en la edad adulta de conducta pseudomasculina de las ratas hembras tratadas con andrógenos durante su etapa neonatal y que se conoce desde hace años

En cuanto a la existencia de asimetría funcional en la expresión del RNAmP450arom entre los hipotálamos de la rata macho, en los machos controles la máxima expresión del RNAmP450arom en el hhd, se presenta entre las 3 Y 12 horas (neonatos) y 90 días posteriores al tratamiento (+++) mientras que en los otros tiempos 1, 24 y 48 h se observa una menor expresión del RNAmP450arom (+).

En el caso de las ratas hembras control, observamos también una conducta de asimetría funcional en la expresión del RNAmP450arom, se observa además, que los niveles de expresión del RNAmP450arom en ambos hemisferios nunca alcanzan el nivel de expresión de los hemisferios de los machos control (+++), es decir, su nivel de biosíntesis de RNAm P450arom, es menor.

Por otro lado, la administración neonatal de propionato de testosterona modifica la expresión del RNAmP450arom en las hembras en ambos hemisferios hipotalámicos, en todos los tiempos estudiados, de hecho los patrones de expresión son más similares a los de los machos control que al de sus propios controles en ambos hemisferios.

Nuestros datos proponen la existencia de asimetría funcional en la concentración de RNA total y de la expresión del RNAm citocromo P450 arom en el hipotálamo durante la diferenciación sexual hipotalámica y el estado adulto de la rata.

ANTECEDENTES

1.0 HIPOTÁLAMO

1.1 Localización

El hipotálamo deriva de la vesícula cerebral secundaria denominada diencefalo, se encuentra en el piso y paredes laterales del tercer ventrículo el cual lo divide en una porción derecha y otra izquierda. Se encuentra separado de el tálamo por el surco hipotalámico. En su cara basal se encuentran dos eminencias: los cuerpos mamilares. La región limitada por los cuerpos mamilares, quiasma óptico y cintillas ópticas se denomina tuber cinereum o tubérculo ceniciento. En dicha región se localiza el infundíbulo del hipotálamo (tallo hipofisiario), que emerge de la eminencia medial inmediatamente por detrás del quiasma óptico y se continua con la porción nerviosa de la hipófisis o proceso infundibular. De hecho, el tallo infundibular, la eminencia medial y el proceso infundibular forman el lóbulo posterior de la hipófisis o neurohipófisis (Barr y Kierman., 1986).

El hipotálamo puede ubicarse fácilmente desde la cara inferior de los hemisferios enmarcado por el rombo opto peduncular formado por las cintillas ópticas (que salen hacia atrás desde el quiasma óptico y de los nervios ópticos) y los pedúnculos cerebrales o Mesencéfalo (Joseph y Knigge, 1978).

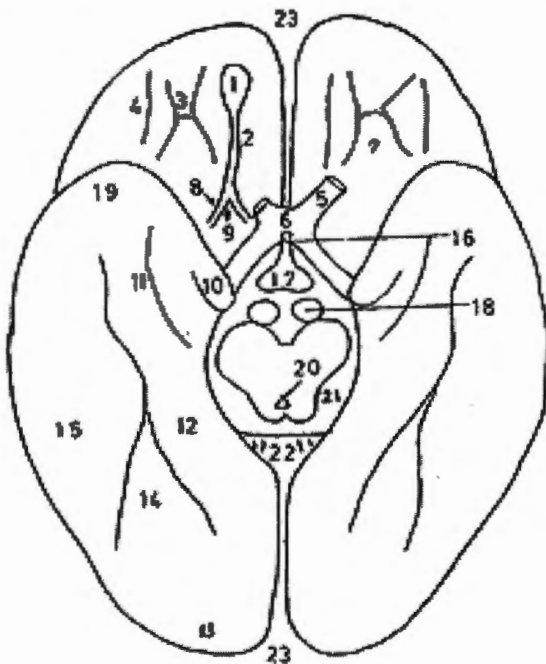


FIGURA 1.

LÍMITES HIPOTALÁMICOS:

1. Bulbo Olfatorio 2. Cintilla Olfatoria 3. Surco en H 4. Surco Orbitario 5. Nervio Óptico 6. Quiasma Óptico 7. Circunvoluciones Orbitales 8. Estria Olfatoria externa 9. Trigono Olfatorio 10. Gancho del Hipocampo 11. Surco Rinal 12. Circunvolución Parahipocámpica 13. Lóbulo Occipital 14. circunvolución lingua. 15. Circunvolución Fusiforme 16. Tallo de la Hipófisis 17. Eminencia Media o Tuber 18. Cuerpos Mamilares 19. CTBLP 20. Acueducto Cerebral 21. Parte lateral de la hendidura cerebral de Bichat 22. Espleno del cuerpo calloso 23. Cisura Inter hemisférica

1.2 División hipotalámica

En el hipotálamo podemos reconocer distintas agrupaciones celulares llamados núcleos hipotalámicos que presentan características neuronales específicas, capaces de modificar el patrón de secreción hormonal de su órgano blanco (Nauta y Haymaker, 1969).

Las columnas del fórnix que vienen del hipocampo al lóbulo temporal, atraviesan el hipotálamo para llegar a los cuerpos mamilares y sirven como punto de referencia para trazar un plano parasagital que divide a ambas regiones derecha e izquierda del hipotálamo en una zona medial y otra lateral (figuras 1 y 2) (Joseph y Knigge, 1978).

Zona medial: la zona medial está constituida por núcleos subdivididos en tres regiones: supraquiasmática, tuberal y mamilar. Delante del hipotálamo se encuentra el área preóptica, la cual embrionariamente y anatómicamente pertenece al prosencéfalo. Sin embargo el área preóptica pertenece funcionalmente al hipotálamo (Nauta y Haymaker, 1969; Barr y Kierman, 1986).

Región supraquiasmática

- Núcleo supraóptico
- Núcleo supraquiasmático
- Núcleo paraventricular
- Núcleo anterior

Región tuberal

- Núcleo ventromedial
- Núcleo dorso medial
- Núcleo tuberal
- Núcleo periventricular

Región mamilar

- Núcleo mamilar
- Núcleo hipotalámico posterior

Zona lateral: Se localizan células nerviosas grandes, dispersas que constituyen el núcleo lateral del hipotálamo. Entre las células nerviosas se encuentran fibras nerviosas longitudinales, que comunican a los núcleos hipotalámicos, o bien simplemente atraviesan al hipotálamo. En esta zona también se localiza el núcleo tuberal lateral, cerca de la superficie del *tuber cinereum* (Nauta y Haymaker, 1969; Barr y Kierman, 1986).

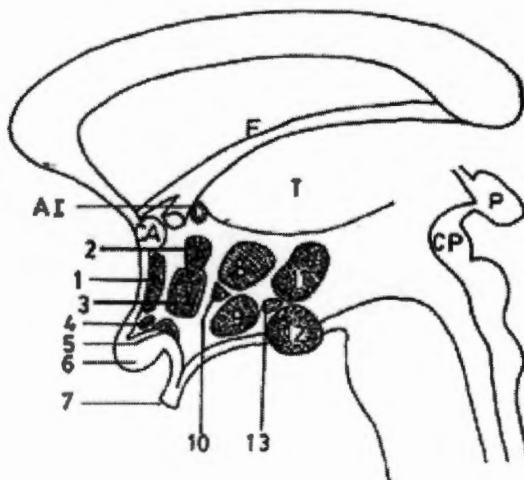


FIGURA 2.

SECCIÓN MEDIAL DEL HIPOTÁLAMO

AI: agujero interventricular F: Fornix T: Tálamo
P: pineal CM: Comisura Posterior 1. Área Preóptica 2. Núcleo Paraventricular 3. Núcleo anterior 4. Núcleo Supraquiasmático 5. Núcleo Supraóptico 6. Quiasma Óptico 7. Tallo Pituitario 8. Núcleo Dorso Medial 9. Núcleo Ventromedial 10. Núcleo Perifornical 11. Núcleo Posterior 12. Núcleo Gémini

1.3 Tractos aferentes del hipotálamo

El hipotálamo recibe información de varios tractos nerviosos para poder regular funciones neurovegetativas. Fibras viscerales ascendentes a través de la formación reticular del tallo cerebral y del fascículo longitudinal dorsal llegan al hipotálamo, proporcionándole información visceral y gustativa. El tracto medial teleencefálico que se origina de las células localizadas en la región septal o medial se extiende por la zona lateral del hipotálamo enviando fibras a los núcleos hipotalámicos. Otras fibras de este tracto se extienden caudalmente hasta los núcleos del rafe de la formación reticular del mesencéfalo y puente. Las aferencias que conducen este tracto son de tipo olfatorio y emocional (Ju G y col., 1991).

La estría terminal es un tracto que se origina en el núcleo amigdalino, el cual se encuentra localizado en el uncus del lóbulo temporal. La estría terminalis se arquea sobre el tálamo junto al lado medial del núcleo caudado y termina parte en el área preóptica y en el núcleo anterior del hipotálamo. Se encuentra relacionada con información olfatoria y conductas afectivas, el fórnix se origina en la formación hipocampal del lóbulo temporal. Se arquea sobre el tálamo y cruza el hipotálamo. El fórnix es un tracto importante del sistema límbico, por lo que está relacionado con respuestas afectivas e instintivas y con el proceso de

memorización. El hipotálamo recibe tractos aferentes del núcleo talámico dorsomedial, el cual presenta conexiones recíprocas con la corteza prefrontal, dichas estructuras constituyen la base anatómica que controla los estados de ánimo o afecto del individuo (Nauta y Haymaker, 1969).

1.4 Tractos eferentes del hipotálamo

Entre las fibras descendentes del hipotálamo se encuentran las fibras periventriculares, que se continúan con el fascículo longitudinal dorsal en la sustancia gris central del mesencéfalo. Estas fibras terminan en los núcleos salivales, dorsal del vago y columnas intermediolaterales de la médula espinal. De esta forma el hipotálamo puede actuar sobre las neuronas preganglionares parasimpáticas y simpáticas del sistema nervioso motor visceral (Chiba y Murata 1985).

Otras fibras descendentes del hipotálamo, el tracto mamilotegmental, se curvan en dirección caudal y terminan en los núcleos de raíz de la formación reticular del tallo cerebral y médula espinal, el tracto mamilotalámico conecta en ambos sentidos al cuerpo mamilar con los núcleos anteriores del tálamo, que a su vez tiene conexiones recíprocas con el giro del cíngulo, todos son componentes del sistema límbico con la responsabilidad de las emociones y aspectos de la conducta relacionadas con la conservación del individuo y de la especie (Chiba y Murata 1985; Nauta y Haymaker, 1969).

2.0 FUNCIÓN HIPOTALÁMICA

Las funciones del hipotálamo no guardan proporción con su tamaño, pues regulan funciones vitales para el organismo. Una de las principales funciones del hipotálamo es el controlar la hipófisis, glándula endocrina que participa en la regulación de diversas funciones del organismo, muchas de ellas también relacionadas con la homeostasis (regulación de la glicemia, de la osmolaridad) (Ben-Jonathan, 1985). Pero el hipotálamo también es el centro coordinador del sistema nervioso autónomo e integra señales que vienen del medio ambiente y del medio interno modulando así las respuestas viscerales y las somáticas (Everett, 1978), por lo que dividiremos las funciones del hipotálamo en endocrinas y no endocrinas con el fin de facilitar su comprensión.

2.1 Endocrinas

Con funciones endocrinas nos referimos tanto al tipo de estímulo como al forma de respuesta, ambas de carácter hormonal que ejerce sobre la hipófisis mediante dos mecanismos, uno que corresponde a conexiones directas que establece con la neurohipófisis a través del tracto supraóptico-hipofisiario para producir y liberar oxitocina y vasopresina, estas hormonas son transportadas por flujo axoplásmico a través de fibras en el tracto supraóptico hipofisiario en axones terminales en el lóbulo neural y liberadas bajo condiciones fisiológicas apropiadas hacia el seno cavernoso (Palkovits, 1986). El otro mecanismo libera mensajeros químicos desde axones terminales en la eminencia media hacia capilares fenestrados y transportados por flujo axoplásmico a través de fibras en el tracto

supraóptico corresponde a un sistema porta de vasos sanguíneos que pasan del hipotálamo a la adenohipófisis y que transportan factores liberadores u hormonas (Sétalo y col., 1978).

FUNCIÓN ENDOCRINA DEL HIPOTÁLAMO

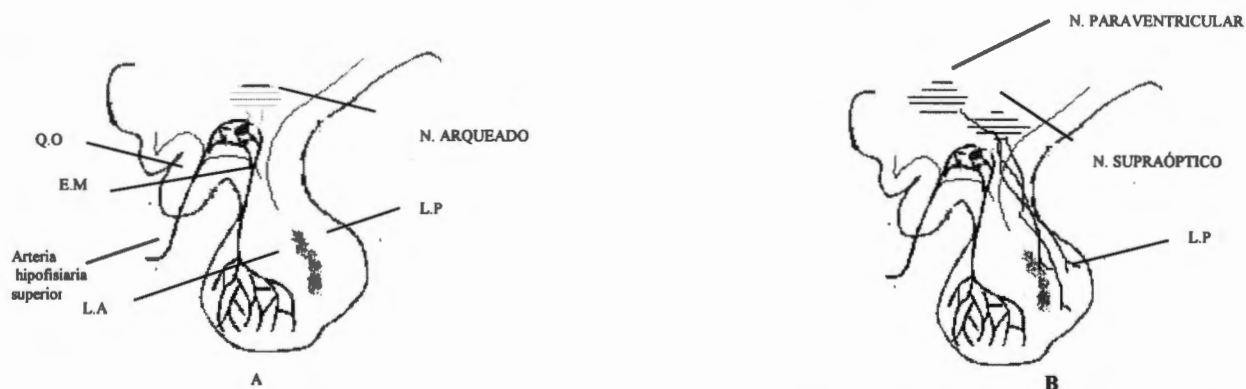


FIGURA 3. A. La neurosecreción provee el mecanismo por el cual el hipotálamo controla las funciones del lóbulo anterior de la hipófisis (L.A.) a través de una comunicación neurovascular. B. por otra parte, las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular sintetizan y liberan hormonas como la oxitocina y vasopresina que son transportadas por flujo axoplásmico hacia el lóbulo posterior (L.P.) de la hipófisis

La función de la hipófisis está controlada por hormonas reguladoras producidas por el hipotálamo. Estas hormonas liberadoras e inhibidoras son, en su mayoría, polipéptidos sencillos, de los cuales muchos se han identificado y sintetizado (Everett, 1978).

Las hormonas liberadoras de gonadotrofinas (**GnRH**) se encuentran en el caso de los humanos en el área preótica medial y en las ratas en el núcleo periventricular y también en el área preótica medial, estas regiones hipotalámicas son las encargadas de estimular tanto la secreción de la hormona estimulante del folículo (**FSH**), como la hormona luteinizante (**LH**) de las células adenohipofisiarias (Merchenthaler y col., 1988). La secreción de la hormona liberadora de tirotropina (**TRH**) por parte de los núcleos paraventricular, supraquiasmático, preóptico, dorsomedial y porción laterobasal del hipotálamo estimulan la liberación de tirotropina (**TSH**) por los tirotropos (Brownstein, 1982). Las neuronas encargadas de liberar la hormona liberadora de corticotropina (**CRH**) se encuentran distribuidas extensamente en el núcleo paraventricular y estimulan la liberación de corticotropina (**ACTH**) por los corticotropos (Merchenthaler y col., 1984). La hormona liberadora de la somatotropina (**GHRH**) y la hormona inhibidora de la liberación de somatotropina (**GRIF**, somatostatina) se encuentran principalmente en el núcleo periventricular y el área preótica, y estimulan la liberación de la hormona del crecimiento (somatotropina, **GH**) de las células somatotropas (Finley, 1981). Las neuronas encargadas de liberar tanto la hormona liberadora de la prolactina (**PRF**) como la hormona inhibidora de la prolactina (**PIF**) o dopamina y que regulan la secreción de la dopamina por las células lactotropas se localizan dentro de neuronas dopaminérgicas del tallo infundibular, en el núcleo arqueado y en el núcleo periventricular (Goldsmith y Thind, 1990). La hormona liberadora de la

hormona estimulante de los melanocitos (**MRH** o **MRF**) y la hormona inhibidora de la hormona estimulante de los melanocitos (**MRIH** o **MIF**) regulan la secreción de la hormona estimulante de los melanocitos (**MSH**) por las células melanotropas de la adenohipófisis (Ben-Jonathan, 1985; Schally y col., 1973).

La necesidad de hormonas hipotalámicas inhibidoras, así como de estimuladoras para la GH, prolactina y MSH, puede ser explicada por la ausencia de sustancias con una retroalimentación negativa producidas por sus órganos blanco. En el caso de la TSH, ACTH, FSH y LH (corticoesteroides, tiroxina y esteroides sexuales) desde los órganos blanco inhiben la secreción de estas hormonas de la adenohipófisis por acción de retroalimentación negativa sobre la hipófisis, hipotálamo o ambos (Sétalo y col., 1978).

Sin duda la rata de laboratorio (*Ratus norvegicus*) es el mamífero mejor conocido en lo que concierne a los mecanismos hipotalámicos reguladores del ciclo sexual. Ya hemos visto que estos ciclos cesan si desconectamos funcionalmente a la hipófisis del hipotálamo, pero no es necesario cortar el tallo hipofisiario para lograr este cambio. Separar las conexiones entre la eminencia medial, el hipotálamo anterior y la región preóptica es suficiente, ya sea con cortes circunscritos de bisturí (pequeñas islas hipotalámicas) o simplemente con cortes transversos frente a la eminencia media. Esto implica que las vías nerviosas de los "centros" anteriores son esenciales para la actividad cíclica normal. Uno de los descubrimientos más importantes de la fisiología reproductiva en los últimos 30 años es lo que se llama "fase crítica" en la cual en la rata dura únicamente alrededor de dos horas en la tarde del proestro. Durante este período de tiempo se generan señales excitantes en el hipotálamo que liberan LH-RF en cantidades suficientes para provocar la descarga de una cuota ovulatoria de gonadotropina hipofisiaria (Schally y col., 1973).

Por otro lado, como se ha demostrado los estrógenos ováricos juegan un papel importante como mensajeros en la regulación de la liberación hipotalámica de LHRH (vía larga) sin embargo, este no es el único mecanismo de regulación hipotalámico, pues la hipófisis (vía corta) o el mismo hipotálamo (vía ultracorta) podría estar regulando la actividad del hipotálamo sobre los ciclos ováricos. En los mamíferos que ovulen "espontáneamente" como la rata, el comportamiento de apareamiento está sincronizado con el ciclo estral, lo que hace que los espermatozoides estén disponibles en el oviducto antes del desprendimiento del ovocito secundario; este comportamiento depende también del hipotálamo. Una de las ilustraciones más espectaculares de esto es el hecho de que, la implantación de pequeñas cantidades de estradiol cristalino en el hipotálamo anterior de ratas ovariectomizadas, provoca no sólo la restauración de la conducta sexual, sino un incremento en esta (Hardy y De Bold, 1971).

2.2 No endocrina

Mucha de la producción hormonal hipotalámica por razones anatómicas y territoriales de contigüidad depende de las funciones que tenga el hipotálamo no endocrino; entre ellas destacan: control de la temperatura, del apetito, emoción y hábito, funciones autonómicas, ritmos, memoria y sueño (Cooper, 1987; Swanson y Van Der Weff, 1980).

Todas las funciones del cuerpo humano requieren efectuarse a una temperatura determinada, cuyo rango de oscilación es muy estrecho; de aquí que el hipotálamo necesite aplicar ajustes rápidos y precisos con el propósito de no perder energía, ya que las fluctuaciones amplias de temperatura pueden poner en peligro la vida. Como se ha demostrado, el hipotálamo preóptico anterior contiene neuronas termosensibles que registran la temperatura de la sangre (Cooper, 1987).

El hipotálamo también debe regular el balance calórico entre la ingesta de alimentos y el gasto de energía. Aquí, el sistema límbico tiene un papel central en la traducción e interpretación de necesidades conforme sean percibidos por el hipotálamo para influir en conducta acorde con estas mismas necesidades. La mayoría de los mecanismos que intervienen en la hiperfagia en obesidad no se han establecido, pero se sabe que las neuronas del hipotálamo ventromedial detectan los niveles existentes de glucosa en la sangre y coordinan la respuesta hipotalámica a la hipoglucemia. En contraste hay lesiones hipotalámicas que inducen anorexia y pérdida de peso (Schally y col., 1973; Swanson, 1980).

También debe mencionarse el papel de algunos péptidos al parecer un tanto ubicuos, como la colecistocinina que, a pesar de saberse su localización y efectos en el ámbito intestinal, estimulando la contracción de la vesícula biliar principalmente, también se le ha encontrado en el cerebro, donde al parecer influye sobre el centro de la saciedad (Joseph y Knigge, 1978). Como se sabe los centros que coordinan las emociones y la libido se encuentran distribuidos en todo el cerebro y no necesariamente confinados a un solo punto (Barr y Kierman, 1986).

Así se ha visto que el sistema límbico, los lóbulos frontales y temporales y el hipotálamo participan en la regulación de las emociones. Este último el hipotálamo (hipotálamo caudal), se considera es vital en la integración y expresión de las conductas de miedo, temor, apatía e ira. Por otra parte, la disminución en la libido puede hacerse presente en casos de hipogonadismo secundario generado a partir de una deficiencia en la producción de la hormona liberadora de gonadotropinas hipofisiarias o GnRH (Swanson, 1980).

El hipotálamo también exhibe un papel prominente en la integración de funciones del sistema nervioso autónomo (SNA). Así, en el caso de los efectos cardiovasculares el estímulo del hipotálamo anterior en el área preóptica es causa de braquicardia e hipertensión de la actividad barorrefleja (Brown-Grant, 1966). Por otro lado, los ritmos biológicos relativos a la reproducción en los mamíferos

tienen su asiento principal en el hipotálamo. Estos períodos oscilan de segundos hasta años (Cooper, 1987).

Así se denomina ritmo circádico aquel que dura 24 h; ultradiano, aquel con períodos menores de 24 h; el infradiano el de períodos mayores de 24 h. Entre las moléculas que presentan ritmos biológicos podemos mencionar a las: monoaminas y catecolaminas cerebrales, aminoácidos, corticotropinas, GH, prolactina, vasopresina, aldosterona, insulina, melatonina, gonadotrofinas y hormonas esteroideas sexuales (Forman y Jansson, 1986). El hipotálamo también está asociado con el ciclo de sueño-vigilia, con reacciones de ira, apatía, somnolencia. En el caso de la memoria, suele afectarse sólo aquella de tipo anterógrado o para hechos recientes y en el caso del sueño se ha observado en pacientes con esclerosis múltiple, abscesos o infartos con afección de la unión hipotálamo cerebral, que llegan a presentar hipersomnia o inversión de los ciclos vigilia-sueño (Joseph y Knigge, 1978).

Como se puede apreciar, todas estas instancias relativas al hipotálamo no endocrino deben de ser tomadas en cuenta muy en particular en lo que se refiere a la biología de la reproducción, puesto que eventos como el de la pubertad, ovulación o en los síndromes de hipersecreción hormonal pueden verse influidos en su evolución por la participación del hipotálamo desde un episodio febril hasta cambios en el patrón de sueño (Cooper, 1987).

3.0 DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA

La diferenciación sexual hipotalámica es el resultado de la expresión de diversos procesos anatómicos, morfológicos, hormonales, genéticos, farmacológicos, fisiológicos y sensoriales, que al interactuar en condiciones normales son capaces de establecer estructuras sexualmente dimórficas en etapas tempranas del nacimiento.

Estudio cronológico de la diferenciación sexual.

El estudio de la diferenciación sexual del hipotálamo, se puede dividir en cuatro fases o períodos: **fenomenológico, crítico, anatómico y molecular.**

3.1 Período fenomenológico

Este primer período comprende finales de la década de los años treinta y principios de la década de los cuarenta, con trabajos de Pleiffer (1936) y de Wilson y col. (1940, 1941) quienes proporcionaron la primera evidencia de que las hormonas de origen fetal eran capaces de ejercer influencia en las funciones neuroendocrinas. Si el tejido ovárico se transplantaba a ratas macho castrados o normales en edad adulta el injerto mostraba solo crecimiento folicular, sin embargo, si el trasplante se realizaba a machos neonatos, el tejido era capaz de presentar ciclos ovulatorios semejante al de una hembra normal. A partir de estos resultados Pleiffer concluyó que el agente responsable del efecto inhibitorio eran

los andrógenos de origen testicular y que la hipófisis, la cuál se creía controlaba la ovulación era diferente entre machos y hembras y que ésta diferencia era inducida por las secreciones gonadales post-natales.

Posteriormente los estudios de Harris (1964) ayudaron a comprender de que era el hipotálamo y no la hipófisis el sitio de control de la secreción de gonadotropinas y se desarrolló la idea de que era el hipotálamo el sitio de diferenciación sexual involucrado en el control de la secreción de gonadotropinas y la integración de la conducta sexual.

Los estudios de Phoenix y col., (1959) y Barraclough y col., (1961) fueron los primeros en sugerir claramente que los esteroides gonadales actuaban directamente en el hipotálamo.

Phoenix y colaboradores propusieron que los esteroides podrían actuar fundamentalmente de 2 formas diferentes: **“Organizacional y Activacionalmente”**, según estos autores los esteroides sexuales actúan tempranamente para **organizar** las vías o sustratos neuronales responsables de la conducta reproductiva siendo este efecto diferencial de los esteroides sexuales permanente, posteriormente, en el estado adulto, los esteroides sexuales actúan sobre las vías o sustratos diferenciados para **“activar”** las conductas o funciones que fueron previamente organizadas, éstas acciones según los autores son reversibles y transitorias.

Lo anterior, sugería que el efecto **“organizacional”** de los esteroides sexuales conducían a la diferenciación sexual del hipotálamo y el efecto **“activacional”** de los mismos regulaban los circuitos neuronales sexualmente dimórficos (Phoenix y col., 1959; Barraclough y Gorski, 1961).

3.2 Período crítico

El interés sobre el efecto directamente hipotalámico de los esteroides sexuales llevó a la segunda fase del estudio de la diferenciación sexual del hipotálamo. Entre las décadas de 1960 y 1970, un gran número de trabajos permitieron definir, el tiempo o **“período crítico”** en que actuaban los esteroides sexuales para organizar la función hipotalámica (Tabla 1) y dieron a conocer cuáles esteroides son efectivos y la forma en que las hormonas esteroides actúan en términos de mecanismos moleculares (Gorski y Warner, 1965).

Estos estudios confirmaron que los andrógenos testiculares eran los responsables de controlar el desarrollo de la conducta copulatoria masculina y femenina. Si la testosterona está presente durante el período crítico ya sea proveniente de testículos de un macho normal o mediante la administración exógena a una hembra, los animales podrían ser permanentemente masculinizados y/o desfeminizados. Refiriéndonos a **masculinización** hipotalámica como la capacidad de mostrar altos niveles de conducta copulatoria, secreción tónica de gonadotropinas o cualquier otra característica que sea típica

del macho. Por **desfeminización** nos referimos a la pérdida del desarrollo de las características femeninas como sería la tendencia a mostrar altos niveles de conducta copulatoria femenina (lordosis) durante el estado adulto y la capacidad de mostrar ciclos ovulatorios de secreción de gonadotropinas (Gorski y Warner, 1965).

TABLA 1. PERÍODO CRÍTICO DEL DESARROLLO PARA LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE ALGUNOS VETEBRADOS

ANIMAL	TIEMPO DE GESTACIÓN	PERÍODO CRÍTICO (DÍAS DESPUÉS DE LA CONCEPCIÓN)
RATA	21 a 22	18 a 27
RATÓN	19 a 20	Post-natal
HÁMSTER	16	Post-natal
CONEJO DE INDIAS	63 a 70	30 a 37
HURÓN	42	Post-natal
PERRO	58 a 63	Pre y Post-natal
OVEJA	145 a 155	30 a 90
MONO RHESUS	146 a 180	40 a 60
CODORNIZ JAPONESA	17 a 18	Pre-anidación
POLLO DOMÉSTICO	22	Pre-anidación
CEBRA	12 a 14	Post-anidación
PICHÓN	14	Post-anidación

(Goy y Mc Ewen, 1980)

Es indispensable mencionar que las conductas reproductivas del macho que no se dan en la hembra no se deben sólo a la relativa ausencia de testosterona circulante, ya que cuando son tratadas con altas dosis de testosterona estas no son suficientes para mimetizar la conducta de un macho normal, ya que el período de sensibilidad a la testosterona (en el caso de que se quiera masculinizar a la hembra) o de estradiol (en una hembra gonadectomizada) no se da en la etapa adulta, si no en etapa perinatal y post-nacimiento temprano, a lo que se le denomina **“periodo críticos de diferenciación sexual”** (Brown-Grant, 1974 Swanson y Van DerWerff, 1965; Goy y Mc Ewen, 1980).

Las diferencias que existen en la extensión del período crítico se deben principalmente a la maduración y sensibilidad del Sistema Nervioso Central que puede darse en etapas prenatal, perinatal y/o postnatal. En el caso de la rata hembra el período sensible o crítico persiste hasta los 7 a 10 días después del nacimiento, mientras que en el macho existen dos períodos críticos de sensibilidad neuronal, ambos coinciden con los picos de secreción de testosterona por los testículos fetales, uno se da en el día 18 a 19 de vida intrauterina y el segundo se da dos horas después del nacimiento, posteriormente esta sensibilidad se pierde rápidamente después del quinto día (Goy y Mc Ewen, 1980).

Aunque la experimentación en el humano es particularmente difícil, las observaciones de conducta sexual en hombres afectados por algunas enfermedades congénitas que modifican la actividad de los esteroides gonadales han permitido concluir que el período crítico se presenta antes del nacimiento (Breedlove, 1997), sin embargo, el desarrollo de las diferencias sexuales en el humano son básicamente los mismos mecanismos de desarrollo que operan en otras especies.

3.3 Período Anatómico

En 1973 Raisman y Field establecieron la existencia de diferencias sexuales en los tipos de sinápsis dendrítica que se encontraban en el área preóptica del hipotálamo de la rata hembra, además, se dieron cuenta de que dicha diferencia morfológica podía ser revertida por la administración neonatal de andrógenos, reflejando una disminución en la capacidad de manifestar durante la edad adulta los mecanismos de carácter activacional de estructuras previamente organizadas durante el desarrollo embrionario que dan lugar a las conductas reproductivas, a las características morfológico-neuronales y de patrones de secreción gonadotropa típicas de cada sexo que se basan en el establecimiento temprano de estructuras sexualmente dimórficas no sólo a nivel cromosomal y/o gonadal, sino a nivel hipotalámico y hormonal, como los esteroides, principalmente el 17β estradiol cuya participación es indispensable en el mantenimiento de la conectividad del Sistema Nervioso Central que en la edad adulta requieren para presentar un funcionamiento neuroendocrino, así como un patrón de conducta típico de cada sexo (Hutchinson y col., 1999).

El estradiol que participa en la formación de estas redes neuronales indispensables en la formación de estructuras sexualmente dimórficas proviene en mayor parte de la aromatización durante y después del nacimiento de los andrógenos aromatizables principalmente la testosterona, cuya fuente principal son las gónadas de la rata macho (Naftolin, 1994).

Y aunque en la rata hembra los estrógenos a nivel gonadal son más abundantes que en los machos este no es capaz de ejercer sus efectos a nivel neuronal, ya que se encuentra secuestrado por una alfa feto proteína altamente específica para estrógenos, por lo que no pueden entrar libremente a las

neuronas, en cambio la testosterona pasa al interior de ellas fácilmente para ser aromatizada a estrógenos y ejercer sus funciones (Toran, 1984; Lephart, 1997) (figura 4).

Las redes estrogénicas interactúan con otros sistemas neuronales influenciados por corticosteroides, neuroesteroides, progestágenos y junto con neurotransmisores son importantes para inducir cambios en la maduración hipotalámica permitiendo la formación de núcleos hipotalámicos dimórfico sexuales, los cuales presentan diferencias morfológicas, farmacológicas, fisiológicas y hormonales entre hembras y machos lo que da como resultado que las diferencias no se limiten a procesos fenomenológicos que se aprecian a simple vista como los procesos conductuales (Hutchinson y col., 1996).

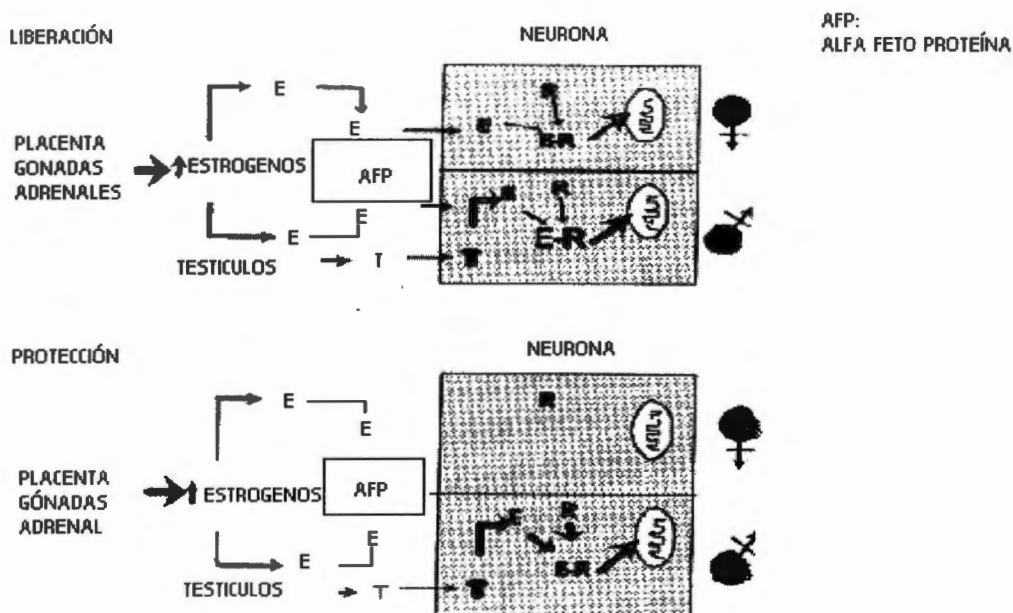


FIGURA 4. La paradoja de porque en la hembra y en el macho existían diferencias morfológicas y conductuales que eran dadas por el ambiente hormonal principalmente por los estrógenos, fue resuelta cuando observaron que los estrógenos se unían a una proteína altamente afín a los estrógenos llamada Alfa feto proteína, secuestrando a los estrógenos y evitando su paso hacia estructuras del Sistema Nervioso Central sin embargo, la testosterona pasa fácilmente al interior de este tejido ejerciendo sus funciones.

El papel de los estrógenos en el establecimiento de estructuras sexualmente dimórficas se da a través de los siguientes mecanismos: estimulando la neurogénesis (Brinton y col., 1996), modulando el reconocimiento de la superficie celular de las neuronas, evitando la muerte celular gracias a sus efectos neuroprotectores (Chia-Yi y col., 2000) y potenciando el efecto de neurotransmisores (Joels y Karst, 1995).

3.4 Período Molecular

Cuando se comprendió que los estrógenos eran indispensables en establecer las estructuras dimórfico sexuales, los horizontes se extendieron a estudios a nivel genómico ya que se ha demostrado que la modificación del genoma inducido por los estrógenos manifiesta cambios morfológicos en las neuronas que acumulan estas hormonas esteroides como el núcleo ventromedial (VMN). Tales cambios incluyen: aumento en la concentración intracelular de RNA y consecuentemente en el número de ribosomas, hay un aumento en el número de vesículas de secreción y síntesis de proteínas importantes para la función nerviosa, como receptores de progesterona, algunos neuropéptidos como las encefalinas y la proteína dependiente de estrógenos indispensables para la inducción de la diferenciación sexual hipotalámica (Brinton y col., 1997; Chowen y col., 1992; Hutchison y col., 1999). Un trabajo que ha servido como antecedente a este período es el de Salaman y Birket (1974), quienes demostraron que la administración de fármacos inhibidores de ácidos nucleicos fueron efectivos para prevenir los efectos masculinizantes de los andrógenos en ratas hembras de 4 días de edad extrauterina.

La investigación de la expresión de genes indispensables en el proceso de la diferenciación sexual neuronal involucra el gen responsable del proceso de aromatización que convierte la testosterona a estrógenos, es el complejo enzimático aromatasa, cuyo sitio catalítico es el citocromo P450 aromatasa producto del gen CYP19 (Resko y col., 2000; Simpson, 2000).

4.0 NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS DIMÓRFICO SEXUALES EN LA RATA

Desde hace casi dos décadas se han estudiado los dramáticos dimorfismos sexuales en el Sistema Nervioso Central que resultan de las acciones de los andrógenos durante el período crítico, promoviendo diferencias morfológicas, bioquímicas y de metabolismo de neurotransmisores específicamente en el área preóptica anterior (Tagaki y Kawashima, 1993), tales cambios inducidos por las hormonas esteroides gonadales incluyen: incremento en el número y tamaño de neuronas, diferencias en las conexiones sinápticas, en el número y tipo de proyecciones dendríticas, en la densidad e inervación axonal y en el mayor volumen de grupos neuronales específicos (Arnold y Gorski 1984; Allen y col., 1989; Kawata y col., 1994).

El APO fue la primer región dimórfico sexual descrita por Döner y Staud en 1968 y por Raciman y Field (1973), ellos descubrieron que las dendritas de las neuronas de esta región recibían más impulsos sinápticos en la rata hembra que en los machos, la magnitud de los impulsos que recibía del SVN a través de la estria terminalis, NAM y estria terminalis anterior y posterior eran de mayor magnitud en las hembras que en los machos, además de la presencia de una extensa variedad de neurotransmisores, neuropéptidos y por la densa inervación

vasotocinérgica, y el volumen y tamaño de sus neuronas, sin embargo, en 1978 Gorski y colaboradores encontraron dentro de esta región un núcleo que solo existía en los machos pues en la hembra representaba solo vestigios, su tamaño era seis veces mayor en los machos y lo llamaron Núcleo Dimórfico Sexual del Área Preóptica (NDS-APO), este núcleo forma una parte densa del ÁPOm, su desarrollo se da durante la vida prenatal y depende del ambiente hormonal que lo rodea durante el período crítico de la diferenciación sexual que en el caso de los machos comienza entre los días 18 y 19 de la gestación hasta el día 5 post-natal (Rhees y col., 1990). Las diferencias dimórficas sexuales que presenta este núcleo no solo se dan en términos de volumen, también existen diferencias neuroquímicas por su abundante inervación y número de sinapsis, además de ejercer influencia dimórfica en cuanto a su actividad sobre los neurotransmisores (Simerly y col., 1986) ya que sus neuronas tienen receptores de función GABAérgica, catecolaminérgica, glicinérgica y colinérgica (Davis y col., 1996). Se encuentra conectado bidireccionalmente a regiones de las que recibe impulsos sensoriales, manda impulsos al sistema vegetativo y tiene neuronas con alta actividad de aromatasa constituyendo así un punto clave en la activación de la conducta sexual del macho (Lauber, 1996), estos fenómenos han sido estudiados ampliamente en esta región debido a su gran magnitud, por su localización en un área específica del cerebro y porque se desarrolla rápidamente después de la exposición a esteroides (Abe-Dohmae y col., 1994).

Otro núcleo dimórfico sexual importante en la reproducción y conducta sexual de las hembras es el NPV-APO, esta región es esencial para la secreción cíclica de gonadotropinas, contiene una masa muy densa de neuronas que expresan receptores a estrógenos y progesterona (50% más en hembras que en machos) (MacLusky y col., 1997), el número de neuronas, así como sus proyecciones dendríticas son ocho veces mayores en las hembras que en los machos; tal característica es indispensable en la integración de la información hormonal y sensorial como los impulsos olfatorios que regula la secreción de LH y prolactina y de este modo controlar las conductas reproductivas y secreción de gonadotropinas (Simerly 1998).

Existe evidencia de que estos procesos dimórficos sexuales se encuentran influenciados por factores tanto genómicos (Lephart y col., 1992) como no genómicos (Joels y Karst, 1995), la evidencia de tal aseveración sobre los efectos genómicos se basa en estudios de Beyer y colaboradores en 1993 que demostraron una marcada diferencia en cuanto a la actividad de la aromatasa, punto clave en la activación de la conducta sexual del macho incitada por los andrógenos testiculares que forman el mayor sustrato y el mayor regulador de este complejo enzimático. Su actividad y concentración es mayor en los machos que en las hembras alcanzando su pico durante el período crítico de la diferenciación sexual hipotalámica el día 19 de gestación, lo cual también coincide con el primer pico de testosterona (Lephart y col., 1992).

5.0 CARACTERÍSTICAS DIMÓRFICO SEXUALES INVOLUCRADAS EN LOS PROCESOS REPRODUCTIVOS

5.1 Bioquímicas

1. La expresión y actividad de la enzima aromatasa es mayor en las neuronas de los machos que en las neuronas de ratas hembra (Lephart y col., 1992).
2. Aunque la distribución del RNAm para la aromatasa es el mismo en ambos sexos, los niveles de RNAm son menores en las hembras (Lephart y col., 1992).
3. La cantidad de RNAm para la aromatasa es mayor en la rata macho adulto que en la hembra en el HMB (Roselli y Resko, 1993).
4. Las conexiones sinápticas en los núcleos ventromedial (NMV) y arqueado son más abundantes en las hembras que en los machos (Breedlove, 1992).
5. La distribución de neuronas, fibras nerviosas y los niveles de recambio de los neurotransmisores es diferente dentro de los núcleos hipotalámicos de la misma rata y entre ambos sexos (Breedlove, 1997).
6. Existen diferencias en la concentración y distribución de la calmodulina la cual es mayor en los machos que en las hembras (Rodríguez y col., 1998).

5.2 Morfológicas

1. El tamaño del Núcleo Dimórfico Sexual del Area Preóptica (SDN-POA) es seis veces mayor en machos que en hembras (Gorski y col., 1978).
2. El NPV-APOm es más grande en hembras que en machos (Raciman y Field, 1973).
- 3.- Número y tamaño de las neuronas en todo el hipotálamo es mayor en machos que en hembras (Goldstein y col., 1990).
4. La Base del Núcleo de la Stria Terminalis Medial Anterior es más grande en hembras que en machos (Goldstein y col., 1990).
5. El número de neuronas de la BSTMA y BSTLA es mayor en las hembras que en los machos (Kerchner y col., 1995).
6. El volumen de la AM es mayor en machos (Kerchner y col., 1995).

5.3 Conductuales

En el Macho:

1. Cortejo que consiste en la orientación del macho hacia la hembra (Dewsbury 1969).
2. Olfateo de la zona genital (Dewsbury 1969).
3. Persecución a lo largo de la caja de prueba (Dewsbury 1969).
4. Marcaje de territorio (Dewsbury 1969).
5. Monta, se caracteriza por el contacto del cuerpo de la hembra con las extremidades anteriores del macho. (Dewsbury 1979).
6. Intromisión, consiste en la inserción peneana. (Dewsbury 1979).
7. Eyaculación, transmisión de esperma a la vagina de la hembra. (Dewsbury 1979).

En la Hembra:

1. Atractividad (Dewsbury 1979).
2. Proceptividad: pequeños saltos llamados "karting y doping" (Dewsbury 1979).
3. Receptividad; cambios de coloración en la región genital (Dewsbury 1979).
4. Producción de sustancias odoríferas (feromonas) (Dewsbury 1979).
5. Movimientos rápidos de cabeza y orejas "ear wiggling" (Dewsbury 1979).
6. Lordosis: arqueamiento del lomo para facilitar la intromisión por parte del macho (Dewsbury 1979).

6.0 EL ESTRADIOL EJERCE EFECTOS GENÓMICOS Y NO GENÓMICOS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA.

6.1 Efectos genómicos

Los efectos genéticos de los esteroides incitan a respuestas de latencia y duración media que pueden durar horas y hasta días (Sutter-Dub, 2002), sus efectos comienzan cuando la hormona esteroidea atraviesa la membrana celular fácilmente debido a su alta liposolubilidad e interactúan con una familia de proteínas solubles citosólicas (que a su vez pertenecen a un grupo de proteínas de choque térmico) para ejercer sus efectos genómicos (McEwen, 1988). Este reconocimiento es altamente específico, capaces de formar ligandos de alta afinidad con las hormonas e interaccionar con el receptor a hormonas esteroides, el cual sufre un cambio conformacional que forma parte de una secuencia de activación, la cual aumenta la afinidad del complejo hormona-receptor por el DNA presente en los cromosomas en interfase en secuencias conocidas como elementos de respuesta a la hormona esteroide, mediante uniones electrostáticas y puentes de hidrógeno en lugares específicos localizados relativamente lejos (-22 a -95 pb) de la caja TATA, que en las células eucariotas forman la región promotora (Sutter-Dub, 2002).

Estos sitios de fijación se caracterizan por la presencia de secuencias específicas en el extremo 5' terminal, la interacción del complejo con el DNA y el RNA polimerasa II induce la síntesis de moléculas precursoras como el RNAhn que son productos primarios de la transcripción genética, son de gran longitud, se encuentran en el núcleo y son procesados para constituir el RNA mensajero específico, esta estimulación requiere de aproximadamente 30 minutos a partir de la penetración del esteroide a la célula blanco (Beato, 1989).

Se ha observado que en respuesta a la penetración de los esteroides se produce dentro del núcleo de las células blanco una acumulación de RNAhn y poco después el aumento en la concentración de RNAm tanto en el núcleo como en el citoplasma (Beato, 1989). Existe un gran número de proteínas las cuales pueden ser enzimas, receptores u hormonas y RNAs mensajeros que son regulados por la presencia de estrógenos y que participan de manera directa en el mecanismo de transmisión del impulso nervioso y logran constituir parte importante de los cambios de comunicación interneuronal inducidos por la presencia de hormonas esteroides brindando a la célula la adaptación al estímulo químico recibido (Brinton y col., 1997). Se ha demostrado que subsecuentemente a la modificación genómica inducida por los estrógenos es posible observar cambios morfológicos en las neuronas que acumulan estas hormonas esteroides (Sutter-Dub, 2002).

Los cambios observados incluyen: aumento en la concentración intracelular de RNA y consecuentemente en el número de ribosomas y en la cantidad de retículo endoplasmático, aumento en el número de vesículas de secreción y en la síntesis de proteínas importantes para la función nerviosa, tales como los

receptores para la progesterona y algunos neuropéptidos como las encefalinas (Sutter-Dub, 2002).

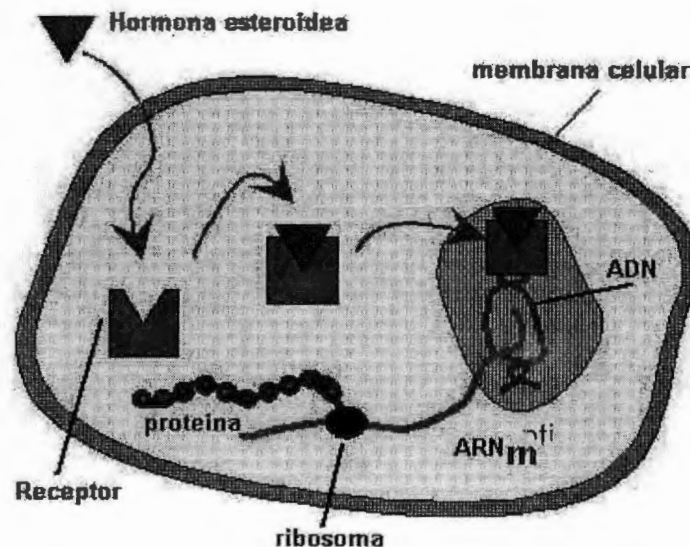


Fig. 5 Los esteroides por su tamaño y liposolubilidad tienen la capacidad de penetrar a la célula e interactuar con receptores nucleares y ejercer sus efectos genómicos lo cual implica síntesis de proteínas que participan de manera directa en el proceso de la diferenciación sexual hipotalámica.

6.2 Efectos no genómicos

A los esteroides producidos en el cerebro se les denomina neuroesteroides (NE), los cuales son capaces de potenciar el efecto de algunos neurotransmisores como los GABAérgicos, glutamatérgicos, glicinérgicos y colinérgicos (Gibbs y Aggarwal, 1998; McEwen y Alves, 1999; Murphy y col., 1998). Son efectos de duración y latencia corta (milisegundos, segundos o minutos) los cuales dependen también de la concentración y tiempo de exposición del esteroide al receptor y no implican el genoma celular. La interacción de estos NE con receptores membranales contribuyen a la regulación de la excitabilidad neuronal alterando la conducta iónica o modulando el efecto inhibitorio de los neurotransmisores (Kelly, 1980; Morley y col., 1992). Estos efectos rápidos son de los más consistentes y de clara acción sobre la función del cerebro, por lo que se han considerado para determinar posibles modelos de acción del esteroide sexual sobre la diferenciación del cerebro (Mermelstein y col., 1996). La actividad de un esteroide a nivel de un receptor de membrana depende de su estructura y de los sitios de reconocimiento del receptor para el ligando. Los esteroides reconocen a la proteína membranal, eliminando la posibilidad de que el esteroide se intercale con los lípidos y modifique la permeabilidad de la membrana (Mermelstein y col., 1996).

La composición de las unidades proteicas expresadas en el receptor define la afinidad al esteroide. Sus efectos sobre los receptores son de tipo alostérico, es decir, modulan la actividad del neurotransmisor a partir de un sitio distinto ocupado por su ligando. Así en el caso de un neurotransmisor excitador como el ácido glutámico el esteroide permite un incremento de su actividad y el consecuente ingreso de calcio al interior de la célula (Kelly, 1980). El estudio de la interacción de los NEs se encuentra en gran expansión dada la amplia gama de procesos por ellos regulados tales como la disforia, la depresión, sus efectos ansiolíticos, analgésicos, anestésicos, anticonvulsivos o proconvulsivos (Kendall y col., 1982), sobre la memoria (Luine y col., 1998) o en conductas como el apetito sexual, los cambios emocionales durante el ciclo estral y la gestación (Herzog, 1991).

7.0 BASES HORMONALES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA DE LA RATA.

Se sabe de manera general que las diferencias sexo específicas en la fisiología sexual y reproductora en los roedores, y en otras especies animales, se debe a las diferencias anatómicas, morfológicas, farmacológicas y fisiológicas dadas por el ambiente hormonal que predomina en ambos sexos, principalmente por el estradiol, que se ha relacionado con la supervivencia y plasticidad de las neuronas (Brinton y col., 1997), con la formación de las prolongaciones dendríticas, la maduración del SNC, además de estar involucrados en la protección de las neuronas de la corteza cerebral contra enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Fillit y col., 1986; Beyer y col., 1997). Tales propiedades les permiten participar en el desarrollo y maduración de las estructuras hipotalámicas y extrahipotalámicas que regulan la actividad hipofisiaria y por tanto las funciones reproductivas (Beyer y Hutchison, 1997).

Aunque la testosterona es el mayor producto del testículo se cree que actúa directamente a muy pocos sitios durante el desarrollo, no obstante es considerada como una prohormona que actúa en muchos sitios solo después de su conversión por una aromatasa neural a un metabolito más activo, dihidrotestosterona por la enzima 5α reductasa (Roselli y Klosterman, 1998) o a estradiol a través de la acción específica del citocromo P450 aromatasa (Naftolin y MacLusky, 1984; Naftolin, 1994). El estradiol es el metabolito más potente resultante de la aromatización y juega un papel fundamental en el mantenimiento y crecimiento de las neuronas relacionadas con las funciones reproductivas tanto del macho como de la hembra (Arnold y Gorski, 1984; Balthazart y Foidat, 1993).

El estradiol es capaz de ejercer su efecto tanto en la conducta como en la diferenciación sexual del macho así como en el tamaño de áreas relacionadas con las conductas y fisiología reproductiva de la mayoría de los vertebrados adultos (Hutchison y Steimer, 1984; Hutchison y col., 1995).

Las conductas sexuales del macho son dependientes de testosterona las cuáles desaparecen después de la castración pero que pueden ser restablecidas

por un tratamiento con testosterona en períodos críticos de la diferenciación sexual hipotalámica (Tabla 1) (Naftolin y col., 1971; Lephart y col., 2001)

Los estudios realizados en hembras ovariectomizadas permitieron hacer algunas observaciones como la reducción o bien la inhibición de la conducta de estro y de lordosis, lo cual llevó a una serie de investigadores a analizar el papel de las hormonas esteroides ováricas, sobre esta conducta. De esta manera se ha establecido que varias hormonas esteroides incluyendo estrógenos, andrógenos y progestinas participan en la regulación de esta conducta y por tanto tienen un papel importante en la fisiología de la reproducción de la hembra (Morali y Beyer 1979; Chowen y col., 1992). La administración repetida de estrógenos a dosis bajas puede inducir conducta sexual femenina. La conducta de lordosis también puede ser inducida por la administración secuencial de una dosis baja de estrógenos seguida de la administración de progesterona (Davison, 1969; Arai y col., 1996).

Las características de la conducta de lordosis han sido relacionadas con la cantidad de estrógenos administrados. Al aumentar la dosis de estrógenos, la intensidad y la duración de la lordosis aumenta, de la misma manera la conducta perceptiva (que consiste en cambiar la coloración de los genitales), parece estar relacionada con la dosis de estrógenos (Beyer, 1976). La cantidad de estrógenos necesaria para inducir conducta receptiva varía considerablemente entre animales de la misma especie. Algunas de estas diferencias podrían deberse a variaciones en el esquema del tratamiento como serían la administración de dosis únicas versus la administración de dosis repetidas. Sin embargo, otros factores deben ser considerados, tales como la edad, la experiencia o la historia endocrina de los animales (Daniel, y col., 1997).

En relación a los estrógenos ha sido establecido que de los tres estrógenos que existen naturalmente, el estradiol es el más potente en la inducción de la conducta receptiva, seguido de la estrona y el estriol, además de que los estrógenos esterificados, como el benzoato de estradiol, son más potentes que los estrógenos libres en la inducción de la conducta de lordosis (Hutchison y col., 1999).

8.0 EVIDENCIAS EXPERIMENTALES QUE DEMUESTRAN LA IMPORTANCIA DE SUSTRATOS AROMATIZABLES PARA LA FUNCION SEXUAL Y REPRODUCTORA DE LA RATA.

8.1 En el macho Macho

El efecto estimulatorio de la testosterona sobre la conducta sexual masculina en la rata fue cuidadosamente investigado por Beyer y col. (1973). Comúnmente la testosterona se administra por un largo período de tiempo (varios días) y los efectos que se observan sobre la conducta sexual son el resultado de la dosis, el tiempo de tratamiento, el éster administrado y la ruta de administración. Así, los primeros efectos después de la administración de

testosterona consisten en la inducción de la conducta de monta seguida de la conducta de intromisión y finalmente de la de eyaculación (Beyer y col 1973).

En vista de que la dihidrotestosterona se considera como un metabolito de la testosterona en la mayoría de las células andrógeno-sensibles, se supuso que ésta hormona podría inducir la conducta sexual masculina. Sin embargo, varios grupos de investigadores han demostrado que esta hormona, 5 - alfa reducida, es incapaz de inducir conducta sexual masculina (Beyer y col 1973; Tiefer y Jonson, 1973; Naftolin, 1994). Además de la dihidrotestosterona, se han probado otra serie de compuestos no aromatizables sobre la conducta sexual masculina. (Lauber, 1996). Los resultados de estos experimentos han demostrado que ninguno de estos compuestos es capaz de activar la conducta copulatoria; entre los andrógenos probados por Beyer y col. (1973) solamente tres; testosterona, androstendiol y androstendiona, todos aromatizables, fueron capaces de producir conducta sexual. Sobre la base de estos datos se propuso que la testosterona ejerce sus efectos conductuales sexuales y reproductivos a través de su conversión a estradiol y no a dihidrotestosterona (Beyer y col. 1973; Abalgadir y col., 1994; Abe-Dohmae y col., 1994).

Para probar esta hipótesis se desarrollaron una serie de experimentos que incluyeron la aplicación de estrógenos solos, así como de estrógenos y dihidrotestosterona sobre la conducta sexual, demostrándose que el tratamiento con estradiol sólo induce la presencia de conducta de tipo copulatoria (Södersten, 1973; Larsson y col., 1973; Timmers y Lambert, 1987; Hutchison y col., 1999). Sin embargo, las dosis requeridas son muy altas por lo que parece improbable que esta hormona actúe sola para inducir esta conducta. Basándose en ello y a otros datos anteriores Larsson y col. (1973), propusieron que los andrógenos y los estrógenos sinergizan para inducir conducta sexual masculina (McEwen y Alves, 1999).

La inyección secuencial en dosis bajas de estos dos esteroides induce conducta sexual normal en animales castrados. Otra línea de investigación que incluye el uso de inhibidores de la aromatización apoya la idea que la testosterona debe ser aromatizada parcialmente para producir su efecto estimulatorio sobre la conducta sexual masculina (Christensen y Clemens, 1975).

8.2 En la Hembra.

La idea de que eran los andrógenos aromatizables los responsables de las conductas sexuales y las funciones reproductivas fueron apoyadas por dos líneas de investigación: a) la administración de andrógenos no aromatizables no induce conducta receptiva (Beyer y col., 1973) y b) La administración de antiestrógenos inhibe la conducta de lordosis inducida por andrógenos (Beyer y col., 1973). La conducta sexual femenina inducida por andrógenos es muy parecida a la producida por estrógenos, sin embargo, se requieren cantidades más grandes de andrógenos para obtener niveles similares de receptividad. Si bien, los estrógenos y los andrógenos utilizados aisladamente son capaces de inducir conducta sexual

femenina, parece ser que en condiciones fisiológicas, la inducción de ésta conducta se debe a la acción combinada de estrógenos y progesterona. Así, la ovariectomía realizada antes del pico preovulatorio de progesterona evita la manifestación de la conducta sexual femenina (Powers, 1970).

El efecto facilitatorio de la progesterona esta condicionado a un pre-tratamiento con estrógenos es decir, la progesterona no facilita la conducta sexual a menos que la hembra haya sido pretratada con estrógenos por un período mínimo. Una gran variedad de pregnanos, incluyendo algunos corticoides, son capaces de inducir conducta de lordosis en animales pretratados con estrógenos (Gorski, 1985). Sin embargo, ninguna de las progestinas naturales parece ser más efectiva, que la progesterona misma, en la facilitación de la conducta de lordosis (Joels y Karst, 1995).

La progesterona, además de inducir conducta de lordosis, participa en la inducción de la conducta proceptiva (Edwards y Pfeiffle, 1983), la calidad (intensidad) de la conducta de lordosis parece estar determinada por la cantidad de estrógenos administrada, la calidad de los componentes proceptivos parece estar asociada con la concentración de progesterona (Whalen, 1974). Por otro lado, se ha demostrado que la administración sinérgica de inhibidores del sistema calcio $^{2+}$ /calmodulina y de progesterona inhibe el efecto facilitatorio de la progesterona sobre la expresión de conducta sexual femenina en ratas hembras adultas ovariectomizadas pre-tratadas con estrógenos (Canchola y col., 1996). Las observaciones en animales adultos son hechas principalmente en factores conductuales, que se pueden interpretar de manera objetiva y relacionarlos directamente con las funciones reproductivas.

9.0 EL PROCESO DE LA AROMATIZACIÓN COMO UN PASO LIMITANTE EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA DE LA RATA.

En las neuronas hipotalámicas se ha reportado actividad de aromatasa desde el día 16 de gestación, y aumenta paulatinamente hasta llegar a su pico el día 19 de gestación lo cual coincide con el primer pico de testosterona en el macho y disminuye gradualmente hasta llegar al estado adulto (figura 6) (Houtsmuller y col., 1995).

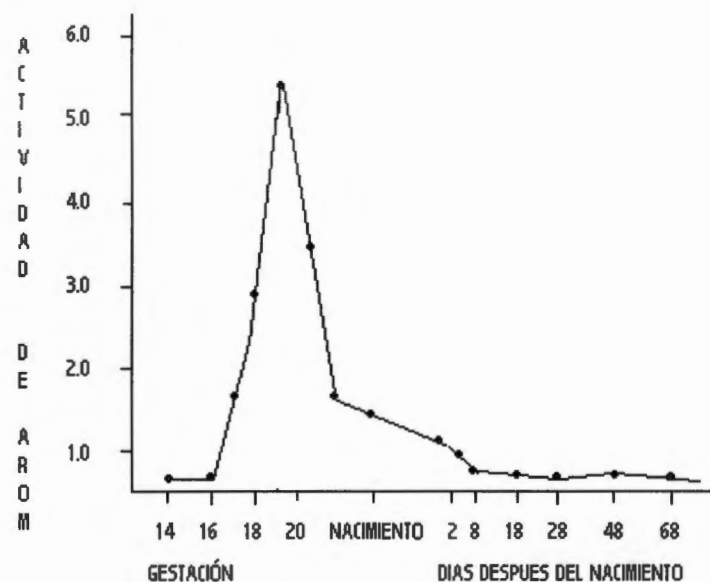


FIGURA 6. La mayor actividad del citocromo P450 aromatasa en el HMB-APO del macho se registra al día 19 de gestación. La actividad fue registrada usando testosterona [^{3} H] como sustrato (Houtsmuller y col., 1995).

Ha quedado bien establecido que los efectos de la testosterona sobre la diferenciación sexual hipotalámica se dan vía aromatización a estradiol a través de los siguientes experimentos: castración neonatal, administración sistémica de 1,4,6-androstatrieno-3,7-diona (ATD) un inhibidor competitivo de la aromatasa dentro del APOm bloqueando la cópula en animales gonadalmente intactos (Naftolin y MacLusky, 1984), utilizando compuestos antiestrogénicos u oligonucleótidos antisentido contra el receptor citoplasmático para estrógenos (McEwen, 1992). Todos estos tratamientos experimentales modifican el número de neuronas y/o la densidad sináptica de los núcleos dimórficos así como el desarrollo normal de la conducta fisiológica reproductiva de la rata (Torán-Allerand, 1984).

9.1 Diferencias sexuales en la actividad de la aromatasa dentro de los núcleos hipotalámicos

La actividad de la aromatasa es dimórfica, ya que existe mayor cantidad de neuronas con actividad de aromatasa en los machos que en las hembras (Lauber, 1994) su mayor actividad se encuentra en las regiones hipotalámicas involucradas en los procesos reproductivos: en la BNST, el NPM y en la AMYm y AMYCo. Los niveles intermedios de actividad de aromatasa se encuentran en el hipotálamo anterior y el NVM. En otras regiones como la corteza, y el septum lateral la actividad de la aromatasa no se detecta en machos adultos (Roselli y col., 1985; Lauber y Lichtensteiger, 1994).

La actividad del complejo enzimático aromatasa dentro del APO e hipotálamo de rata adulta está regulada por los esteroides gonadales a través de un mecanismo de receptor específico. Las ratas que son genéticamente deficientes en expresar RAsr reducen significativamente la aromatasa hipotalámica y no presentan susceptibilidad a mostrar alteraciones por la castración o por la administración exógena de testosterona (Roselli y col., 1987).

Las hormonas esteroides gonadales son las encargadas de controlar la actividad de la aromatasa en algunas regiones del cerebro, pero no en todas. Los resultados de estudios con animales castrados revelaron que las hormonas esteroides gonadales ejercen su efecto en el APO, en la BNST y AMYm ya que al administrar testosterona lograron restablecer la actividad de estas áreas de modo similar al de animales intactos (Roselli y col., 1984, 1985). La acción de las hormonas esteroides es dependiente del receptor de andrógenos a través del cual actúan. Los animales que genéticamente carecen del receptor a andrógenos se consideran como animales feminizados y presentan baja actividad de la aromatasa en el APO y en la BNST.

Algunas regiones como la AMYCo son independientes de la actividad de los esteroides, ya que la castración no afecta la actividad de la aromatasa (Roselli y col. 1985). Aunque la distribución regional del RNAm de la aromatasa es igual en hembras que en machos, la actividad de esta tiende a presentar grandes diferencias ya que el número de células con actividad de aromatasa es mucho mayor en los machos en algunas regiones como el AMYm, BNST, APO y NVM (Roselli y col., 1985).

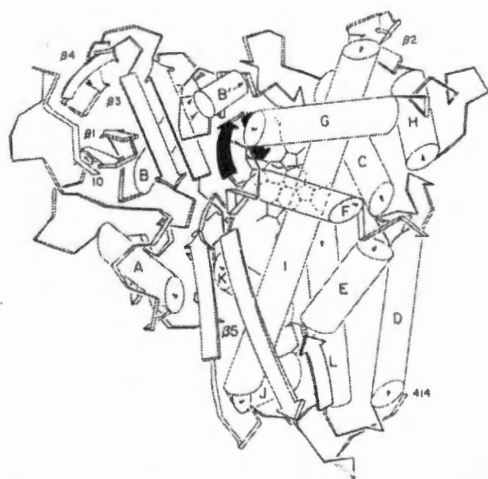
La manipulación perinatal (día 1-5 postnatal) de las hembras con testosterona demostraron que esta hormona participa en la organización del SDN-POA e incrementa el tamaño del núcleo de las neuronas con actividad de aromatasa. Los machos que fueron castrados tuvieron un núcleo de neuronas para aromatasa más pequeño que el de machos control. Lo que sugiere que la testosterona o su metabolito el estradiol actúa durante el período crítico para organizar el desarrollo de las neuronas con actividad de aromatasa en el POAm.

Como se mencionó anteriormente el NDS-APO juega un papel indispensable en la regulación de la conducta copulatoria masculina, cuando ésta área es dañada o sufre lesiones se elimina la expresión de la conducta sexual de los machos de la mayoría de las especies (Allen y col., 1989; Arai y col., 1996).

Heimer y Larsson fueron los primeros en demostrar que las lesiones bilaterales del APO interrumpen la copula en las ratas, en contraste con lo que sucede si se estimula eléctricamente ya que se acelera la eyaculación, además de ser el mayor sitio donde la testosterona actúa para facilitar la conducta sexual masculina. El APOm presenta alta actividad de la aromatasa así como su RNAm, esta región abarca el NDS-APO, por lo que la actividad de la aromatasa es alta dentro de un grupo de núcleos del sistema límbico los cuales están

Otras regiones también se han reportado que exhiben alta actividad de aromatización como son el NPV-APO y el NVM aunque no están implicadas en la conducta copulatoria (Timmers y Lambert., 1987).

La aromatasa es un complejo enzimático que se encarga de la aromatización de testosterona a estradiol, su componente catalítico del complejo enzimático es el citocromo P450 aromatasa (P450arom), el cual es el responsable de la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, por lo que este complejo enzimático juega un papel único en mantener un balance fisiológico entre andrógenos y estrógenos que son esenciales para un adecuado desarrollo y funcionamiento reproductivo en los vertebrados (Corbin y col., 1999). En el cerebro existen dos formas de RNA mensajero de P450, uno largo de 430 nucleótidos y otro corto de 300 nucleótidos y es solo el RNAm largo de 400 nucleótidos es capaz de formar una proteína completamente funcional (Salah y col., 1994).



25

La síntesis de estrógenos a través de la expresión de la aromatasa, contribuye significativamente al crecimiento normal tanto en hembras como en machos (Hutchison y col., 1999). El citocromo P450 se encuentra altamente conservado, su secuencia peptídica es entre el 50 y 90% idéntica entre mamíferos, aves y peces, lo que se conoce acerca de sus propiedades catalíticas ha derivado de estudios hechos a partir de placenta humana en donde se expresa a muy altos niveles comparada con la placenta de otros animales primates o de especies domésticas (Hahn y col., 1985). Se conoce mucho menos acerca de la función bioquímica del citocromo P450arom expresado en los tejidos de otras especies.

Este citocromo es codificado por un solo gen (CYP19) (Corbin y col., 1999) el cual ya ha sido clonado y secuenciado así como los promotores específicos del gen ya han sido demostrados y su actividad enzimática se sabe está relacionada con el comportamiento sexual (Resko y col., 2000). Esta enzima clave forma un complejo con el NADPH-citocromo P450 reductasa y se ha demostrado su presencia en el sistema neuronal de ratones. Existen diferencias sexuales en la concentración de aromatasa en las células hipotalámicas durante la vida pre y postnatal del embrión, en el cuál los ratones machos tienen un número más elevado de neuronas con actividad de aromatasa ya que la testosterona incrementa el número de aromatasas que contienen las neuronas en el hipotálamo (Hutchison y col., 1996). Existen otros complejos enzimáticos por ejemplo, la estradiol deshidrogenasa y la estrógeno sulfatasa que aumentan efectivamente las fuentes de estrógenos las cuales aún no son entendidas pero que también son expresados en cerebro, hígado, tejido adiposo, en algunos tejidos del feto, así como en tumores de seno, gónadas, próstata y en procesos patológicos como la leucemia (Corbin y col., 1999).

La aromatasa está asociada con los cuerpos celulares de las neuronas específicamente en el retículo endoplasmático (RE) y posiblemente en la membrana nuclear donde dicha localización es la apropiada para una efectiva producción de estrógenos que activan eventos a nivel genómico. Además se ha encontrado en las arborescencias dendríticas y muy bajas cantidades o la ausencia total en las células de la glia (Canick y col., 1986).

Su expresión en el cerebro está íntimamente relacionada con efectos regulatorios de los andrógenos que ejercen influencia sobre la diferenciación sexual, la plasticidad neuronal, la conducta sexual, funciones neuroendocrinas y neuroprotectoras debido a la formación de estradiol a partir de su sustrato la testosterona por lo que representa una terapéutica para enfermedades neurodegenerativas (McEwen y Alves., 1999).

Existen diferencias en la biología del P450arom dentro de diferentes especies, por ejemplo, el cerdo expresa isoenzimas específicas de acuerdo al tejido. La placenta del cerdo expresa una isoenzima, las gónadas expresan otras y en la etapa temprana de blastocisto la isoenzima es diferente a las anteriores. Existen isoenzimas gonadales también en otros mamíferos, se expresan en la

teca interna, en las células de la granulosa y en células de Leyding del testículo, sin embargo se desconocen las funciones de cada isoenzima y el ambiente celular que muy posiblemente tiene influencia sobre la función catalítica. Se han hecho pocos estudios que comparen la función de las diferentes isoenzimas, lo cual brindaría la oportunidad única de explorar la evolución funcional de una enzima tan altamente conservada y crítica para procesos reproductivos en los mamíferos (Corbin y col., 1999).

10.1 Mecanismo de acción del citocromo P450 aromataasa

Estudios de inmunoreacción confirmados por Western-Blot y por inhibición de la actividad de la aromataasa usando homogenizados de tejido de ovario de ratón, de hipotálamo de macho recién nacido y de cultivos hipotalámicos (Beyer y col., 1994a) donde se conoce actividad de aromataasa han descartado la presencia en el caso del cerebro en células de la glía, su actividad y presencia se ha detectado únicamente en las neuronas hipotalámicas y corticales (Beyer y col., 1994b).

El citocromo P450 arom es el producto del gen CYP19, tiene un dominio hemo altamente conservado que forma el ligando del sitio aceptor (sitio de unión al sustrato) y está además involucrado en la reacción catalizadora de la aromataasa y tanto el NADPH como el oxígeno son requeridos para esta reacción. Los equivalentes reductores del NADPH se transfieren a través de una flavoproteína al citocromo P450 aparentemente la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa es la flavoproteína que se encuentra en el retículo endoplásmico de la mayoría de las células, incluyendo las células neuronales. Durante la conversión de andrógenos a estrógenos se necesitan 3 moléculas de oxígeno y tres de NADPH. Después de la unión del andrógeno el oxígeno se inserta dentro de la molécula por tres hidroxilaciones secuenciales que sufre la molécula sustrato (el andrógeno). El anillo del C19 de la testosterona insaturado sirve de sustrato para la reacción de aromatización, no así la dihidrotestosterona (DHT) que aunque es un potente andrógeno tiene un anillo saturado el cual no es aromatizable (Resko y col., 2000). La primera hidroxilación se realiza en la posición C19 (grupo metilo) para generar el alcohol en la posición C19, la segunda hidroxilación se realiza en esta misma posición C19, resultando en la pérdida de agua y la formación de un radical aldehído C19 (George y Ojeda, 1982). El mecanismo exacto de la tercera hidroxilación no está bien descrito y existe evidencia de que el grupo metilo es de nuevo hidroxilado. El paso final de la aromatización al parecer no es enzimática, la cual da como resultado la pérdida del grupo metilo del C19 como ácido fórmico y al mismo tiempo la aromatización del anillo a una estructura de anillo fenólico por la pérdida estereo específica de los hidrógenos 1β y 2β como lo muestra lo la. Una vez que los andrógenos son convertidos a estrógenos por la P450arom estos puede ser metabolizados dentro de regiones específicas del hipotálamo o la hipófisis (Aldelgadir y col., 1997; Corbin y col., 1999).

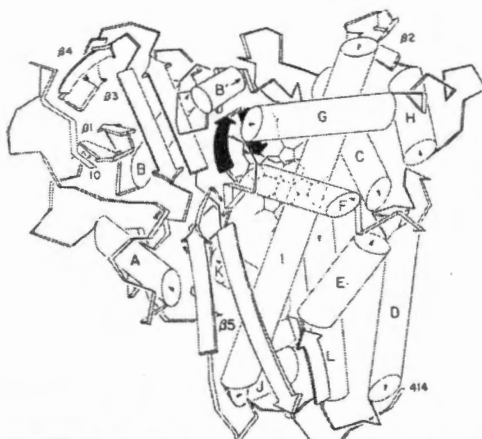


FIGURA 7. Las tres primeras hidroxilaciones se realizan en el grupo metilo (C19), para después perderse como ácido fórmico y al mismo tiempo se aromatiza el anillo A por la pérdida de hidrógenos.

ASIMETRÍA CEREBRAL.

11.0 ASIMETRÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los vertebrados son animales simétricos desde el punto de vista de su configuración externa, de allí que sus cuerpos puedan ser divididos por un plano vertical en dos partes iguales, una derecha y otra izquierda, cada una de ellas imagen especular de la otra (figura 8) (López y col., 1997). El cerebro es uno de los órganos en los que se han estudiado con mayor detenimiento las diferencias existentes entre las partes (hemisferios) izquierda y derecha (López y col., 1997; Yarh y Greene, 1992). Introducirse en la explicación de estas diferencias y consecuencias exige definir, ante todo, que se entiende por lateralización y asimetría funcional. Mediante el término "lateralización" nos referimos al "lado" de un órgano que envía un determinado estímulo, y la expresión "asimetría funcional" elude a las diferencias puestas en manifiesto, en sus respuestas ante un mismo estímulo, por las partes constituyentes de los llamados órganos pares (ovarios y testículos por ejemplo) (Mc Cormick y Singh, 1996). Aunque la existencia de asimetría morfológica cerebral se conoce desde hace más de cien años, y el predominio del uso de la mano derecha sobre la mano izquierda había sido reconocido desde mucho tiempo antes, solo a comienzos de este siglo llegaría a establecerse la vinculación del uso preferencial de una mano o de una pierna con la organización cerebral (Mc Cormick y Singh, 1996).



FIGURA 8. Desde el punto de vista externo la mayoría de los vertebrados son especies simétricas, su estructura derecha e izquierda son imagen especular una de la otra.

La primera evidencia sobre la lateralización de las funciones del cerebro surge de los trabajos de Paul Broca, antropólogo y cirujano francés, quien en el año 1861 describió el caso de un paciente con una lesión en la región frontal del hemisferio izquierdo que presentaba perturbaciones en el lenguaje. La hipótesis planteada para explicar esta relación sustentaba que la importancia del hemisferio izquierdo en el control del lenguaje era consecuencia directa del uso de la mano derecha para escribir. Sin embargo, durante el tiempo en el que se descubrió esta lateralización de las funciones del cerebro vinculada con el desarrollo del lenguaje, la mayoría de la población mundial era analfabeta, por lo que la propuesta careció de bases sólidas (Hernández, 1985).

El estudio de numerosos pacientes que presentaban daños cerebrales mostró que, en el ser humano, el hemisferio cerebral izquierdo participa preferentemente en la expresión del habla y en la habilidad manual mientras que el cerebro derecho está relacionado con las manifestaciones emocionales, las aptitudes musicales y la atención. Cabe señalar que ambos hemisferios estarían vinculados con la expresión de ciertos estados de ánimo en particular: el izquierdo con la alegría y el júbilo y el derecho con la depresión (Hernández, 1985).

Esta asimetría funcional tiene como sustrato desigualdades en el tamaño o la composición de diversas estructuras cerebrales, en la mayoría de los vertebrados estas diferencias dependen del sexo del animal. Sin embargo, la asimetría fisiológica puede ocurrir aunque existan similitudes anatómicas. Por ejemplo, el canto de las aves paseritas es controlado por el núcleo hiperestriado ventral del hemisferio izquierdo, el cual es anatómicamente simétrico del lado derecho, lo cual sugiere que las diferencias dadas no solo dependen de la morfología sino de las conexiones neuronales y concentraciones hormonales que pueden ser asimétricas, permitiendo así el control de diferentes funciones por parte de cada lado (Hernández, 1985).

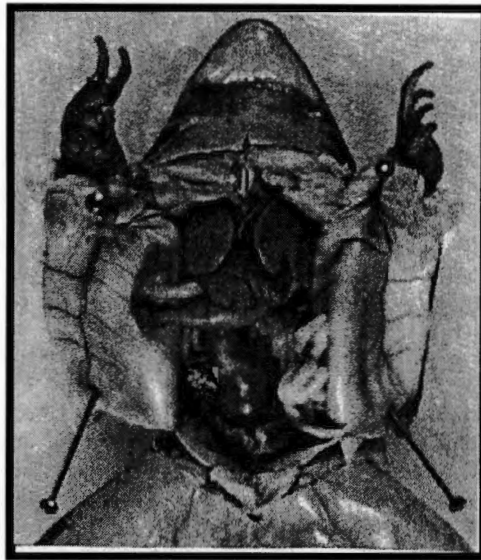


FIGURA 9. Aunque externamente la mayoría de los vertebrados son simétricos, no sucede lo mismo internamente, desde este punto de vista somos totalmete asimétricos tanto morfológica como funcionalmente

En los últimos 20 años se ha demostrado que la participación del hipotálamo en los mecanismos de regulación neuroendocrina reproductiva, también podría presentar conductas de asimetría funcional y lateralización (Harish y col.,1985), Así en el hipotálamo medio basal donde e producen las gonadotropinas, la cantidad liberada es mayor por parte del lado derecho que del izquierdo, además el hipotálamo derecho parece ser más importante en el control de la conducta sexual masculina y el izquierdo en la conducta sexual femenina. Por lo tanto se puede considerar que la asimetría funcional y bioquímica del hipotálamo es el resultado de diferencias bioquímicas y anatómicas relacionadas con las diversas señales neuroendocrinas que regulan la secreción de las hormonas hipotalámicas. Por otro lado, el desarrollo dimórfico de la conducta sexual y la secreción de gonadotropinas en los roedores, es el resultado de la presencia perinatal de andrógenos aromatizables en el hipotálamo (Rhoda y col., 1984).

En 1978 Corballis y Morgan realizaron estudios muy interesantes sobre las posibles causas responsables de que exista la lateralización cerebral. Ellos postulan que la asimetría es causa de un efecto inhibitorio que ejerce un lado sobre el otro, sin embargo, cuando este efecto inhibitorio desaparece por causas patológicas el otro lado es capaz de ejercer funciones semejantes a el otro lado, a este proceso lo llamaron gradiente maduracional pues las diversas funciones cerebrales pueden ser ejercidas preferencialmente por el lado derecho y otras por el lado izquierdo, sin embargo, en caso de daño este gradiente puede cambiar de dirección y dirigir sus funciones hacia el lado opuesto.

Esta especialización lateralizada puede deberse a que los vertebrados ejercen múltiples y complejas funciones que es preciso distribuir en todo el tejido cerebral, por lo que el cerebro puede funcionar como un gran sistema que tiene

que dividirse en subsistemas necesariamente para que cada lado tenga tareas específicas a realizar y que lo haga de manera exacta, aunque ésta especialización no exenta al resto de sus subsistemas a ejercer las mismas acciones en caso de que este llegara a fallar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mecanismo de acción a través del cual actúan perinatalmente los andrógenos aromatizables para inducir la organización del hipotálamo en los roedores, ha sido objeto de numerosos estudios, la mayoría de estos apoyan la idea de que la aromatización de la testosterona es la responsable del desarrollo dimórfico de una gran cantidad de conductas reproductivas.

La existencia de una respuesta diferencial del hipotálamo entre los sexos e inclusive dentro del mismo sexo en cuanto a su aspecto organizativo y activacoinal, aún debe ser demostrada.

En este trabajo se propone estudiar la existencia de asimetría funcional en la concentración del RNA total y en el patrón de expresión para el citocromo P450 aromatasa y si existen o no cambios en estadios de la desfeminización y desmaculinización sobre la expresión de los anteriores parámetros bioquímicos.

HIPÓTESIS

Existe asimetría funcional en la concentración de RNA total y en el patrón de expresión del citocromo P450 aromatasa en el hipotálamo tanto en la etapa de diferenciación sexual hipotalámica como en el estado adulto de la rata.

OBJETIVO GENERAL

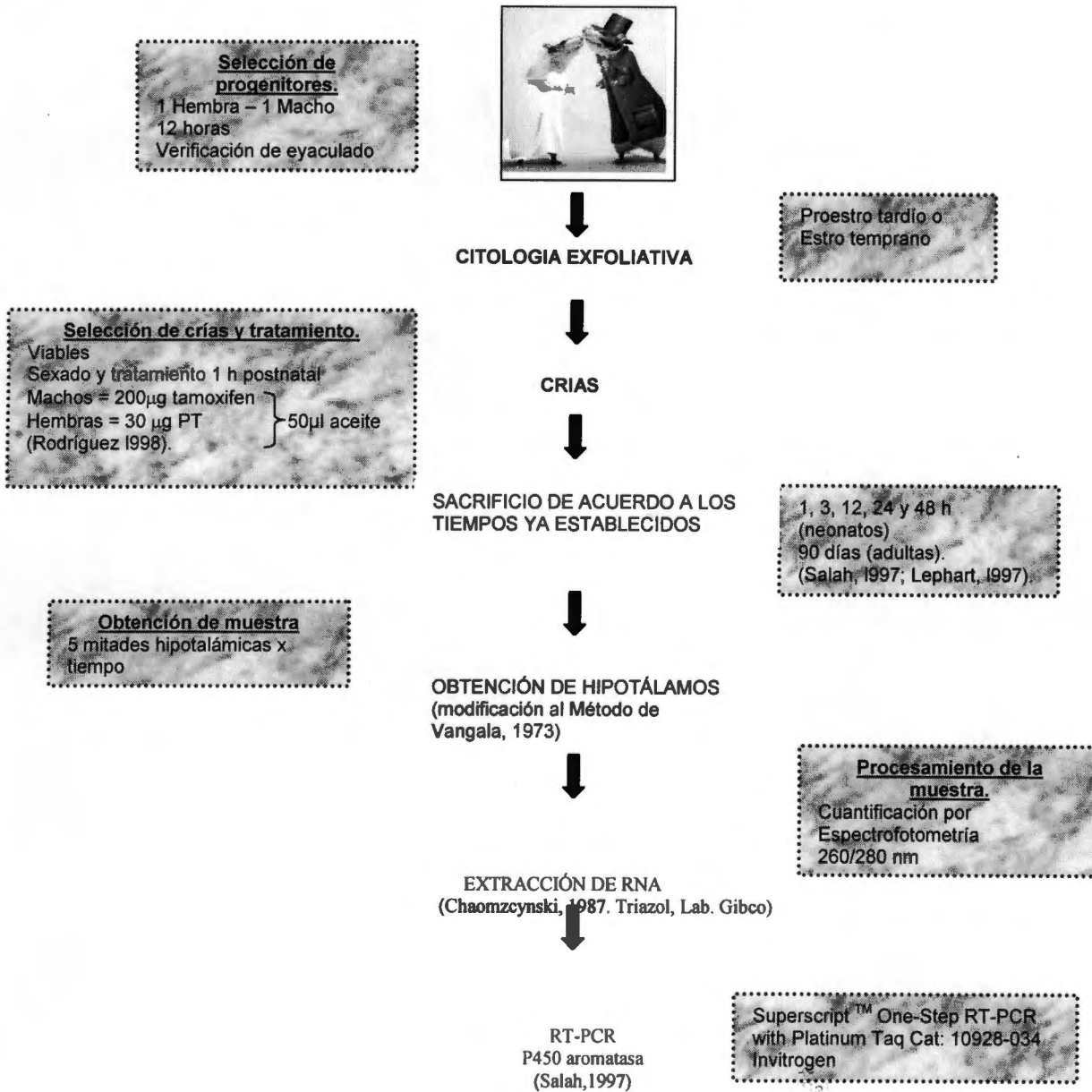
Demostrar la existencia de asimetría funcional en la concentración de RNA total y en el patrón de expresión del citocromo P450 aromatasa en el hipotálamo durante la diferenciación sexual hipotalámica y el estado adulto de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la concentración de RNA total y el patrón de expresión del citocromo P450 aromatasa en el hipotálamo de ratas intactas de ambos sexos en la etapa neonatal (1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas de vida extrauterina) y en el estado adulto de la rata (90 días).
2. Evaluar el efecto de la administración del propionato de testosterona sobre la concentración del RNA total y el patrón de expresión del citocromo P450 aromatasa durante la diferenciación sexual del hipotálamo y el estado adulto de la rata hembra.
3. Estimar el efecto de la administración neonatal de tamoxifén sobre la concentración hipotalámica del RNA y el patrón de expresión del citocromo P450 aromatasa durante la diferenciación sexual hipotalámica y el estado adulto de la rata macho.

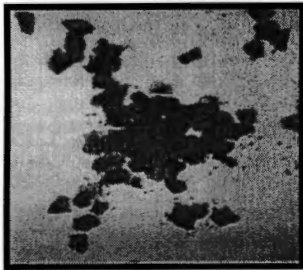
MATERIAL Y MÉTODOS

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

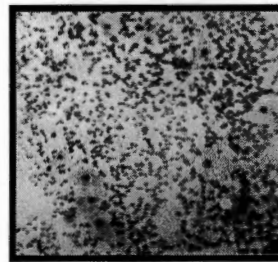


SELECCIÓN DE PROGENITORES

Se trabajó con ratas de la cepa Wistar del bioterio de la UAM Xochimilco, se eligieron madres sanas, múltiparas de 220g (+/- 20g) y machos reproductivamente probados de 260g (+/- 20g). Las ratas se mantuvieron en condiciones de fotofase invertido con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. El ciclo de las hembras se determinó mediante citología exfoliativa y se observó al microscopio a 40X. Cuando las ratas se encontraban en período de proestro tardío o estro temprano se procedió a colocar 1 hembra por 1 macho en una caja circular de arena manteniéndolos con luz roja (la cual no pueden percibir) y se verificó que el macho ejecutara la intromisión en la hembra por lo menos tres veces. La presencia de espermatozoides se corroboró realizando otra citología a las hembras y se mantuvieron en observación hasta el momento del parto.



ESTRO



PROESTRO

El momento del nacimiento se determinó con exactitud mediante inspección visual (la inspección abarcó de las 6 h. a.m. a las 18 h p.m., los partos registrados fuera de este horario no fueron incluidos en el experimento a excepción de los de 12 horas).

SELECCIÓN DE CRÍAS Y TRATAMIENTO

(Rodríguez-Medina, 2001)

Después del parto, madres y críos fueron transferidos a un cuarto con las mismas condiciones ambientales. Los críos fueron pesados y sexados visualmente, utilizando como criterio la distancia ano-genital (distancia la cual es significativamente mayor en los machos por el posterior descenso de los testículos hacia esa zona), posteriormente a cualquier manipulación, se les esparció un poco de aceite de sésamo en la superficie corporal de los críos, lo anterior con el propósito de ocultar el olor del sudor de las manos que pudiese provocar el rechazo del crío por parte de la madre y por el contrario buscando que el acicalamiento del cuerpo del crío reforzara la conducta materna. El esquema de tratamiento fue el siguiente:

MACHOS	HEMBRAS
GRUPO I: CONTROL 50µl de aceite de sésamo	GRUPO I: CONTROL 50µl de aceite de sésamo
GRUPO II: TAMOXIFEN 200µg/50µl de vehículo	GRUPO II: PROPIONATO DE TESTOSTERONA 30µg/50µl de vehículo

Las hembras se trataron con propionato de testosterona para masculinizarlas, los machos con tamoxifén para feminizar, ambos tratamientos se aplicaron justamente 1 hora después de su nacimiento en 50 µl de aceite de sésamo libre de colesterol como vehículo y los controles solo se trataron con los 50µl del vehículo.

OBTENCIÓN DE MUESTRA

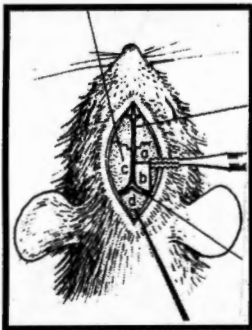
Las ratas crías se decapitaron y las adultas se mataron por dislocación cervical a los siguientes tiempos post-tratamiento:

HORAS: 1, 3, 6, 12, 24 y 48
DÍAS: 90

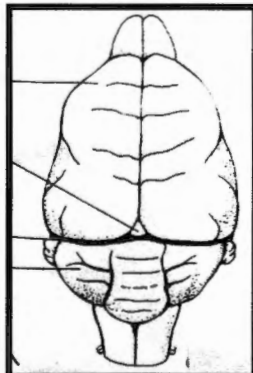
Los hipotálamos fueron extraídos (bajo condiciones de esterilidad y sobre hielo seco) por una modificación del método de Vangala (1973) utilizando los siguientes límites:

Limite anterior.
Limite posterior.
Lateralmente.

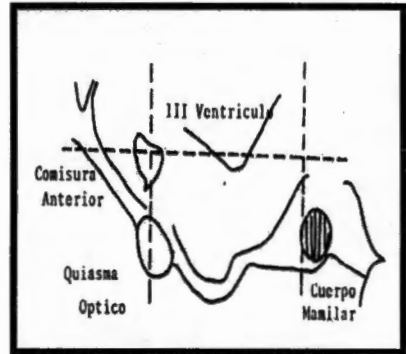
Anterior al quiasma óptico.
Posterior a los cuerpos mamilares
Por los surcos hipotalámicos de ambos lados



1.- Disección del cráneo.



2.- Obtención del encéfalo

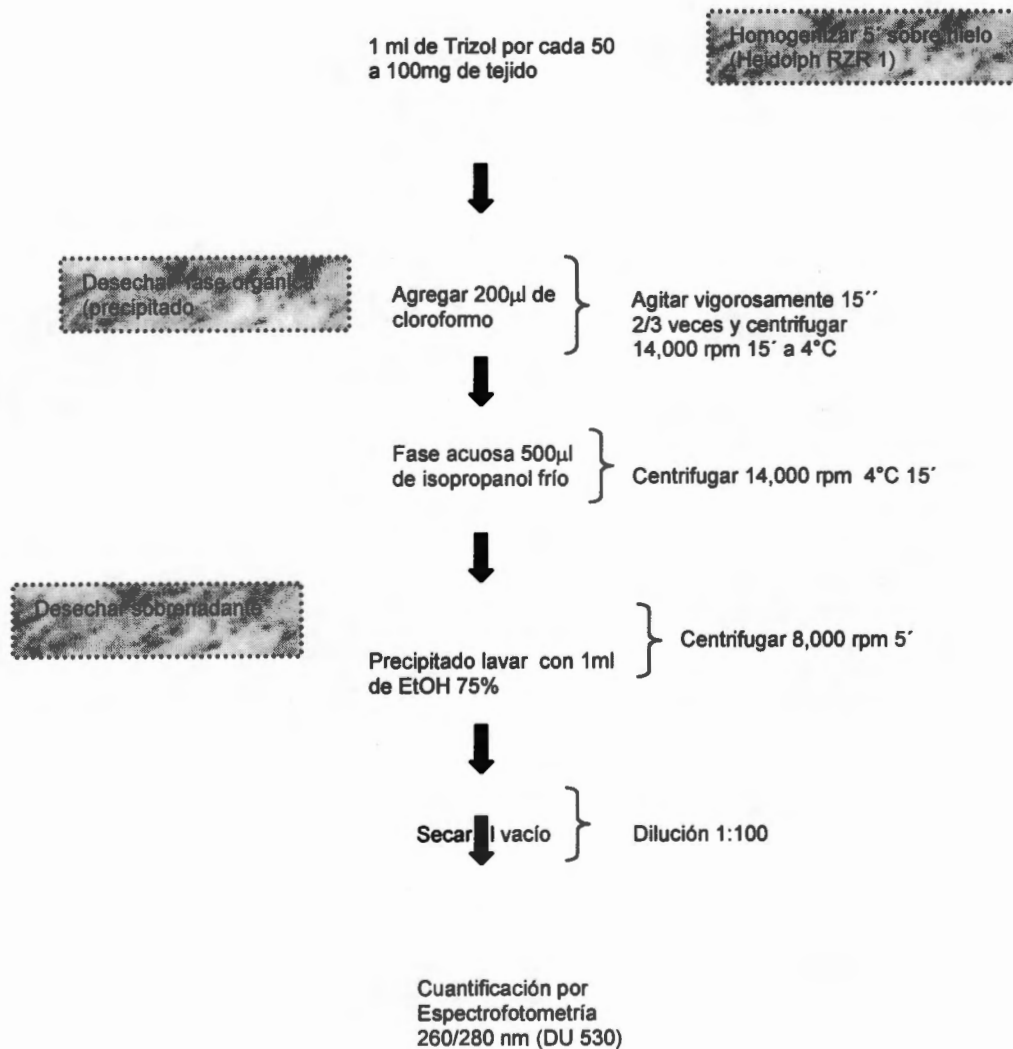


3.- Extracción del hipotálamo

Una vez obtenido el hipotálamo, este se dividió en su lado derecho e izquierdo, para cada tiempo se colectaron 3 grupos y se almacenaron en pozas de 5 mitades en cada tubo previamente esterilizado tanto hembras como machos. La muestra se conservó a -70°C hasta su uso.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Esquema de aislamiento del RNA total (Método de Chaomzinsky 1987))



La extracción de RNA se hizo mediante la técnica de Chaomzinsky (1987) en presentación Trizol, que contiene fenol y tiocinato de guanidina. La muestra se homogenizó (Heidolph RZR1) sobre hielo para evitar que se calentara por la fricción y que se degradara el RNA. Posteriormente se agregó 200µl de cloroformo y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos para separar la fase orgánica (contiene el DNA y proteínas) de la fase acuosa que es la que contiene el RNA. La fase orgánica se desechó y a la fase acuosa se le agregó 500µl de isopropanol frío y se centrifugó a 14000 rpm para precipitar el RNA. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con etanol al 75%, se centrifugó a 8000 rpm, el sobrenadante fue desechado, el precipitado se seco al vacío y se agregó 100µl de agua desionizada estéril. Posteriormente se hizo una dilución 1:100 y se cuantificó en el espectrofotómetro a 200 - 300 nm en cuvetas de cuarzo de 1.0 ml, ya que el vidrio no transmite bien la radiación U.V y se tomó la lectura a 260 y 280 nm

Se determinaron como criterios de calidad:

- a) Cuantificación del RNA por espectrofotometría a 260 nm. (E.F. BECKMAN DU 530 UV-VIS)
- b) Relación 260/280 (1.8 -2.0)
- c) Espectro del RNA realizando lectura de 200-300 nm.
- d) Gel de electroforesis en MOPS

DETERMINACIÓN DE CRITERIOS DE CALIDAD PARA EL RNA TOTAL

- a) La densidad óptica máxima del RNA se mide a 260 nm y es igual a 40 µg/ml RNA y en 0.5 ml el rango es de 2 a 10 µg, dicho criterio se utilizó para elegir el RNA total que se utilizó. La magnitud de la absorción de la luz U.V es directamente proporcional a la cantidad de muestra atravesada por la radiación. Esta relación cuantitativa se expresa mediante la ecuación de Lambert-Beerr $A = \epsilon \cdot c \cdot l$

A = absorvancia molecular, es una constante característica de cada compuesto a una longitud de onda específica.

c = concentración de la muestra, mol/litro.

l = espesor de la muestra atravesado por radiación.

E = absorvancia de una solución molar de una sustancia que se mide a una longitud de onda específica

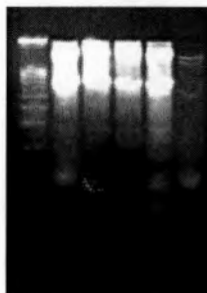
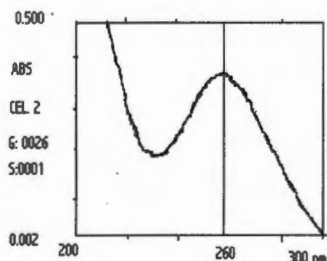
Los picos de absorción son típicamente anchos. Se registran usualmente con longitud de onda creciente de izquierda a derecha y la longitud de onda del RNA es de 260 nm.

(Stanley, 1982)

- b) la densidad óptica del RNA que es medido como la absorbancia máxima es de 260 nm y otro no tan notable a 280 nm. La relación 260:280 nm de absorbancia debe ser menor de 1.8, si este rango es menor, podemos asegurar que la muestra está contaminada con proteínas ya que se ha demostrado que la densidad óptica de éstas es a 280 nm

- c) El rango espectrofotométrico al que debe visualizarse el RNA es a 200-300 nm

- d) Las moléculas de RNA se separaron en geles de agarosa al 2% (GIBCO BRL, ultra PURE) con formaldehído al 0.06% para su análisis cualitativo y cuantitativo ya que nos permite apreciar las diferencias de tamaño de las moléculas. El gel se corrió a 100 volts y se utilizó MOPS 12X (MOPS 1x Acetato de sodio 1M, EDTA 0.5M. Ajustar el pH a 7.0 y no esterilizar) como amortiguador de corrida, 2 µl de bromuro de etidio y 5 µl de amortiguador de carga (Azul de bromofenol 0.25%; Xileno de cianol 0.25%; Ficoll 400 15%).



RT-PCR

La expresión del gen para el citocromo P450 aromatasa se identificó mediante la técnica de RT-PCR utilizando 1µg de RNA total y oligonucleótidos para citocromo P450 aromatasa de cerebro de rata:

PRIMER	SECUENCIA	CONC. FINAL
1	5'ATACCAGGTCCTGG3'	0.2 µM
2	5'GGTGTCCAGCATG3'	0.2 µM

(Sahala y col., 1997)

Se utilizó el estuche comercial Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq Cat: 10928-034 Invitrogen. La mezcla se realizó en tubos de 0.2µl estériles y libres de RNAsas de acuerdo al siguiente protocolo:

PASOS	COMPONENTES	VOLUMEN/50µL	CONC. FINAL
1	2X Reacción Mix	25µl	1X
2	Templado de RNA		1µg
3	Primer Sence	1µl	0.2µM
4	Primer Anti-sence	1µl	0.2µM
5	platinum Taq/Mix	1µl	
6	Agua Destilada		Cbp 50µl
7	Aceite Mineral	20µl	

Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq Cat: 10928-034 Invitrogen

Una vez hecha la mezcla se procedió a agitarla vigorosamente y centrifugarla por unos segundos, posteriormente para la síntesis y pre-desnaturalización del cDNA se colocaron los tubos en un termociclador (geneamp PCR System 9600, Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones:

	FUNDAMENTO	PASOS	N° DE CICLOS		TEMPERATURA	TIEMPO
A	Síntesis de cDNA y pre-esnaturalización	1	1	—	50°C	25 min.
		2			94°C	2 min.
B	Amplificación PCR	3	35	Desnaturalizar	94°C	15 seg.
				Anclaje	58°C	30 seg
				Extensión	70°C	3 min.
C	Extensión Final	4	1		72°C	8 min.

La electroforesis de los cDNAs obtenidos se realizó en geles de agarosa al 1% utilizando 10 µl de producto del PCR, 5µl de amortiguador de carga y 2µl de Bromuro de Etidio usando TAE 1X como amortiguador de corrimiento. Las muestras se dejaron correr a 100Volts durante 1 hora y se observaron usando un Analizador de Imagen BIO-RAD



Gel de β-actina



cDNA de citocromo P450 arom

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las concentraciones de RNA total se obtuvieron considerando la absorbancia a 260 nm y el factor de dilución (100) de la manera siguiente:

$$\frac{24\text{UA}}{100 (\text{abs a } 260\text{nm})} \times \frac{1.0 \text{ mg de RNA}}{X}$$

24 unidades de absorbancia (UA) es una constante que refiere a 1.0 mg de RNA total y 100 es el factor de dilución. La concentración final se expresó en µg/mg de tejido hipotalámico.

El análisis estadístico de los resultados consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de una cola y prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$, para lo cual se utilizó el programa estadístico **MICROSTAT**.

RESULTADOS

RESULTADOS

Tabla 1. Parámetros generales de ratas machos y hembras controles y tratados experimentalmente con propionato de testosterona (hembras) y tamoxifen (machos).

	Hembras control	Hembras tratadas	Machos control	Machos tratados
Animales neonatos				
Número de animales	n= 15	n= 15	n= 15	n= 15
Peso al nacimiento (g)	6.2 ± .9 a	6.4 ± .8 a	6.6 ± 1 a	6.5 ± .4 a
Peso hipotalámico (mg)	15.8 ± 3.2 a	14.1 ± 2.1 a	16.6 ± 3.4 a	15.8 ± 3.1 a
Hipotálamo (% peso corporal)	0.22 ± 0.04 a	0.20 ± 0.04 a	0.23 ± 0.03 a	0.21 ± 0.03 a
Animales Adultos				
Número de animales	n= 15	n= 15	n= 15	n= 15
Peso corporal (g)	231 ± 10 a	226 ± 11 a	321 ± 19 b	313 ± 21 b
Peso hipotalámico (mg)	57.6 ± 7.2 a	45.3 ± 8.2 b	51.2 ± 7.2 a	59.3 ± 14.2 a
Peso ovárico (mg)	56.3 ± 8.7 a	25.4 ± 9.3 b	-----	-----
Peso testicular (g)	-----	-----	1.50 ± .09 a	1.23 ± .2 b
Hipotálamo (% peso corporal)	0.024 ± 0.002 a	0.021 ± 0.0016 b	0.014 ± 0.001 c	0.019 ± .001 b

- incluye datos de animales sacrificados: 1, 3, 6, 12, 24, 48 horas y 90 días después del tratamiento. Los números muestran la media ± la desviación estándar del número de casos anotado como n (en el caso de los animales neonatos, pozos de 3 hipotálamos fueron utilizados para cada determinación).
- a, b, c: indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los datos de la misma fila (ANOVA, una vía y prueba de tukey), excepto en el caso del peso gonadal en el cual se utilizó el estadístico de t de Student.

En la tabla 1 se muestra los parámetros generales de los animales utilizados en este trabajo. Aunque el registro de pesos corporales, hipotalámicos y gonadales de los animales utilizados en este trabajo no estaba incluido en los objetivos de esta tesis, fue de suma importancia registrarlos con el fin de corroborar la efectividad de los tratamientos; el propionato de testosterona para hembras y el tamoxifen para machos.

Se trabajó con un total de 15 animales tanto para hembras como para machos controles y tratados. Se registró el peso corporal e hipotalámico al nacimiento sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre hembras y machos controles y tratados.

En el estado adulto las ratas macho tanto tratadas como control tuvieron mayor peso corporal que las hembras tratadas y control. Las hembras controles y tratadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso corporal, sin embargo el peso hipotalámico y el peso gonadal sí presentaron diferencias estadísticamente significativas, siendo menores ambos parámetros en las hembras tratadas que en las hembras control. En cuanto a los machos

tampoco se observaron diferencias estadísticas en el peso corporal, en el peso hipotalámico no se observaron diferencias estadísticamente significativas aunque el peso gonadal fue mayor en los machos controles que en los tratados. Un parámetro muy importante fue el índice peso corporal, peso hipotalámico, el cual tuvo diferencias significativas entre los cuatro grupos y los valores más altos fueron para las hembras controles y tratadas.

Tabla 2. Concentración de RNA total ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido hipotalámico) en hemisferios hipotalámicos de ratas macho controles y tratados neonatalmente con tamoxifen.

Tiempos Post-tratamiento	Hemisferio derecho control	Hemisferio izquierdo Control	Hemisferio Derecho tratado	Hemisferio izquierdo tratado
1 h	6.62 $\pm$ 1 a1	24.07 $\pm$ 1 a2	35.0 $\pm$ 1 a3	28.9 $\pm$ 1.05 a4
3 h	22.53 $\pm$ 1 b1	13.57 $\pm$.95 b2	13.50 $\pm$.9 b2	16.97 $\pm$ 1 b3
6 h	14.67 $\pm$ 1.11 c1	10.50 $\pm$ 1.18 c2	4.73 $\pm$ 1.36 c3	19.03 $\pm$ 1.15 b4
12 h	15.57 $\pm$ 1.33 c1	22.60 $\pm$ 1.21 d2	5.60 $\pm$ 1.14 c3	6.28 $\pm$ 1.17 c3
24 h	15.23 $\pm$ 1.21 c1	2.81 $\pm$ 1.05 e2	7.68 $\pm$ 1.08 c3	10.61 $\pm$ 1.35 d4
48 h	14.08 $\pm$ 1.01 c1	3.54 $\pm$ 1.1 e2	4.68 $\pm$ 1.23 c2	1.39 $\pm$.15 d3
90 d	5.65 $\pm$ 1.34 a1	7.20 $\pm$ 1.05 f1	6.68 $\pm$ 1.39 c1	3.56 $\pm$ 1.33 c2

Los datos en la tabla 2 indican la media $\pm$ la desviación estándar. El número de repeticiones para cada experimento fue de 3. Diferente literal indica diferencia estadística significativa en las concentraciones de RNA total dentro del mismo hemisferio ($p < 0.05$) utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de tukey. Diferentes número indica diferencia estadística significativa en las concentraciones de RNA total dentro de un mismo tiempo ($p < 0.05$) utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de tukey.

La tabla 2 muestra las concentraciones de RNA total en hemisferio derecho e izquierdo de machos controles y tratados obtenidos a diferentes tiempos después de la aplicación del tamoxifen. Las concentraciones de RNA total de los machos controles fueron asimétricos entre ambos hemisferios en la mayoría de los tiempos, a excepción de los machos adultos en los que las concentraciones de RNA total no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el lado derecho e izquierdo. En el hemisferio derecho de los machos control se encontraron concentraciones bajas de RNA a la hora de nacidos y aumentó de manera estadísticamente significativo a las 3 horas post-nacimiento para posteriormente bajar de manera significativa y mantenerse así durante los tres tiempos siguientes de recuperación, para bajar en la vida adulta y alcanzar valores similares a los de la primera hora de nacimiento. En el hemisferio izquierdo el comportamiento de la concentración de RNA fue muy diferente, en este hemisferio la concentración más alta se encontró en la primera hora de nacimiento, para caer posteriormente la concentración de manera significativa en los siguientes dos tiempos de recuperación y alcanzando una elevación estadísticamente significativa a las 12 horas, posteriormente cae de manera muy importante en los siguientes tiempos.

Cuando se analizaron las concentraciones de RNA total en los animales tratados encontramos que la mayor concentración de RNA se presentó 1 hora

post-tratamiento en el hemisferio derecho y la menor concentración a las 48 horas en el hemisferio izquierdo. Las concentraciones fueron asimétricas a la 1, 3, 6, 24 y 48 horas y a los 90 días post-tratamiento y fue en el hemisferio izquierdo donde las concentraciones de RNA variaban con mayor frecuencia a lo largo de los tiempos de exposición al tratamiento con respecto a su hemisferio derecho.

Tabla 3. Concentración de RNA total ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido hipotalámico) en hemisferios hipotalámicos de Ratas hembras controles y tratadas neonatalmente con propionato de testosterona

Tiempos Post-tratamiento	Hemisferio derecho control	Hemisferio izquierdo Control	Hemisferio derecho Tratado	Hemisferio izquierdo Tratado
1 h	5.51 $\pm$ 1.2 a1	10.44 $\pm$ 1.66 a2	27.66 $\pm$ 1.25 a3	8.3 $\pm$ 1.1 a2
3 h	14.13 $\pm$ 1.11 b1	17.67 $\pm$ 1.4 b2	9.43 $\pm$ 1.2 b3	15.69 $\pm$ 1 b12
6 h	19.64 $\pm$ 1.23 b1	12.26 $\pm$ 1.06 a2	9.70 $\pm$ 1.27 c3	18.31 $\pm$ 1.08 b1
12 h	35.64 $\pm$ 1.13 bc1	2.35 $\pm$.74 c2	11.48 $\pm$ 1.09 d3	8.52 $\pm$ 1.03 ac4
24 h	24.58 $\pm$ 1.39 c1	5.59 $\pm$ 1.27 c2	13.52 $\pm$ 1.12 e3	11.69 $\pm$ 1.33 c3
48 h	10.74 $\pm$ 1.18 bc1	10.51 $\pm$ 1.17 a1	10.71 $\pm$ 1.18 f1	2.72 $\pm$.67 d2
90 d	27.27 $\pm$ 1.06 d1	10.36 $\pm$ 1.21 a2	1.76 $\pm$.19 e3	4.63 $\pm$ 1.39 d4

Los números en las tablas indican la media $\pm$ la desviación estándar, El número de repeticiones para cada experimento fue de 3. Diferente literal indica diferencia estadística significativa en las concentración de RNA total dentro del mismo hemisferio ($p < 0.05$) utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de tukey. Diferente numero indica diferencia estadística significativa en las concentración de RNA total dentro de un mismo tiempo ($p < 0.05$) utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de tukey

La tabla 3 muestra las concentraciones de RNA total en ambos hemisferios a diferentes tiempos post-nacimiento de hembras controles y tratadas neonatalmente. La concentración de RNA total entre ambos hemisferios controles se comporta de manera asimétrica, sólo a las 48 horas post-nacimiento las concentraciones no muestran diferencias estadísticamente significativas. Al observar el cambio en las concentraciones de RNA a través de los diferentes tiempos post-nacimiento observamos aumentos significativos hasta las 12 horas en el hemisferio derecho, tiempo en que la concentración fue la máxima. El hemisferio izquierdo presentó una mayor concentración a las 3h, disminuyendo drásticamente a las 12 y 24 horas para después restablecerse a concentraciones similares a 1h post-nacimiento. Cuando a las hembras se les aplicó el tratamiento la mayor concentración de RNA se observó a la hora post-tratamiento del hemisferio derecho y la menor concentración a los 90 días en este mismo hemisferio. Las concentraciones entre ambos lados fueron casi en todos los tiempos asimétricas.

Tabla 4. Patrón de expresión de RNAm para citocromo P450 aromatasa en hemisferios hipotalámicos de ratas.

Machos

Tiempos Post-tratamiento	Control derecho	Control izquierdo	Tratado derecho	Tratado izquierdo
1 h	+	+	+	+
3 h	+++	+++	+	+
6 h	+++	+++	++	++
12 h	++	++	+	+
24 h	+	++	++	++
48 h	+	++	+	+
90 d	+++	++	++	++

(+) intensidad de la expresión

Hembras

Tiempos Post-tratamiento	Control derecho	Control izquierdo	Tratado derecho	Tratado izquierdo
1 h	+	+	+	+
3 h	+	+	+++	++
6 h	++	++	+++	++
12 h	+	+	+++	++
24 h	++	++	+	+
48 h	++	+	+	++
90 d	++	++	+++	++

(+) intensidad de la expresión

Intervalos (+) 1724-3456

(++) 3457-5188

(+++) 5189-6919

La tabla 4 registra el patrón de expresión del citocromo P450 aromatasa de hembras y machos controles y tratados de ambos hemisferios. La mayor expresión en los machos controles se registró a las 3 y 6 horas post-nacimiento, disminuyó a las 48 y en el estado adulto el patrón de expresión vuelve a intensificarse casi a los niveles observados a las 3 y 6 horas post-nacimiento. En este parámetro podemos observar asimetría a las 24, 48 horas y en la vida adulta, siendo el hemisferio izquierdo el de mayor actividad en la expresión de P450 arom, el tratamiento en los machos con tamoxifen ocasionó la pérdida de asimetría en la expresión de P450arom ya que en todos los tiempos de recuperación fueron simétricos los hemisferios.

En el caso de las hembras en general se puede decir que tienen menor expresión de P450 arom en ambos hemisferios, el patrón de expresión es inverso al de los machos. Los niveles más bajos de expresión se registraron en las hembras controles de ambos hemisferios a 1, 3 y 12 horas post-nacimiento y los niveles medios a las 6, 24, 48 horas y 90 días post-nacimiento. Cuando las hembras se trataron con el PT los niveles de expresión aumentaron a las 3, 6 y 12 horas post-tratamiento, disminuyeron a las 24 y 48 horas post-tratamiento y se restablecieron a los 90 días. Es importante resaltar que el patrón de comportamiento entre machos control y hembras tratadas fue semejante, especialmente en la expresión de P450 arom en el hemisferio derecho, así mismo el de los machos tratados tuvo un patrón muy similar en ambos hemisferios al de las hembras control, demostrando los efectos de los tratamiento sobre los niveles de expresión del citocromo P450 aromatasa.

DISCUSIÓN

Los estudios iniciales precursores del concepto actual de la diferenciación sexual cerebral, mostraron que independientemente del sexo genético, la presencia de testículo durante una fase específica del desarrollo cerebral, es capaz de modificarlo ; en esta fase (período crítico) , el desarrollo del cerebro es susceptible de sufrir cambios morfológicos que pueden dar lugar a modificaciones funcionales permanentes (Beach, F. 1976 ; D, G, Beyer y col.,1993) Durante el desarrollo del cerebro de los mamíferos, los andrógenos estimulan la diferenciación de circuitos nerviosos que se ha demostrado participan en la regulación de conductas reproductivas (Gorski, R. 1980). En particular, la biosíntesis perinatal de estrógenos (aromatización), a través de la enzima aromatasa en el hipotálamo, es esencial para el desarrollo dimórfico de la conducta sexual y la secreción de gonadotrofinas en los roedores (Arnold, A. y Gorski, R. 1984).

La posibilidad de que el RNA total y el RNAm del citocromo P450 arom, presenten diferencias sexuales en su concentración o expresión (asimetría funcional) en el hipotálamo, como resultado de fenómenos de masculinización (presencia de la aromatización de andrógenos) y feminización (ausencia de la aromatización de andrógenos), son discutidos en esta tesis. Como se observa en los resultados de la tabla 1, la administración de los fármacos no modificó, ni el peso corporal, ni el peso hipotalámico de las ratas hembras y machos tratadas neonatalmente con 30 ug de testosterona (T) o con 200 µg de tamoxifen (Tam) respectivamente al compararse con sus respectivos controles, lo anterior concuerda con el trabajo de Hoepfner, B y Ward, I. 1988, los cuales reportan que la administración neonatal de testosterona y tamoxifen, en las mismas dosis utilizadas en este experimento (aunque en tiempos más tardíos de administración), a ratas hembra y macho respectivamente, no provocó modificaciones ni en el peso corporal ni en el peso hipotalámico . Por otra parte, en cuanto al peso gonadal durante la etapa adulta (90 días) la tabla 1, nos

muestra que la administración de T a ratas hembras o Tam a ratas machos a la hora posterior al nacimiento, provocó una disminución significativa en el peso de las gonadas al compararse con los controles respectivos (macho control; 1.50 $\pm$ 0.09 g. Macho tratado; 1.23 $\pm$ 0.2 g y hembra control (fase de estro) 56.3 $\pm$ 8.7 mg. hembra tratada 25.4 $\pm$ 9.3 mg.

El efecto de virilización y feminización del hipotálamo, sobre el peso gonadal ha sido ya reportado con estos fármacos y a estas dosis aunque a tiempos más tardíos de diferenciación sexual hipotalámica (DSH) por Rodríguez-Medina, y cols. 1993.

Lo anterior, junto con la presencia de citología exfoliativa vaginal en estro persistente en las ratas virilizadas neonatalmente (Rodríguez-Medina, y cols. 1993), serían indicadores la eficiencia biológica de los fármacos utilizados en nuestra metodología.

En cuanto a la importancia del ácido ribonucleico (RNA), se ha demostrado es esencial para la expresión del genoma, principalmente para la biosíntesis de proteínas que se han asociado a la virilización o masculinización hipotalámica (Adcock, I y Greenstein, B, 1986; Rodríguez –Medina y cols. 2002).

De hecho desde los trabajos pioneros de Salaman, D y Birkett, S (1974), utilizando bloqueadores de DNA, RNA y proteínas, administrados a ratas hembras de 4 días de edad, previno (sólo en el caso de la inhibición del ADN Y RNA), el efecto de los andrógenos sobre la virilización del hipotálamo. Lo anterior según estos autores propondría un mecanismo genómico, ácidos nucleicos/ dependiente, para el establecimiento del fenómeno de virilización hipotalámica, de la rata.

En la tabla 2 se muestran los datos de la concentración de RNA total (ug de RNA/mg de tejido hipotalámico) entre los hemisferios hipotalámicos, durante la DSH (1,3,6,12,24 y 48 h) y el estado adulto (90días), así como el estudio dentro del mismo hemisferio (de los distintos tiempos estudiados), de ratas macho recién nacidas y adultas, tratadas neonatalmente (1 h post-parto) con 200 ug de Tamoxifen. Los datos muestran la presencia de asimetría funcional en la concentración de RNA entre los hemisferios hipotalámicos (HH) en casi todos los tiempos estudiados al compararse con el de los hemisferios de los animales controles. El HH derecho (HHD) de los animales controles recién nacidos presenta un pico máximo en la concentración del RNA total (22.53 $\pm$ 1.0 ug/mg de tejido hipotalámico), a la 3 h para posteriormente mantenerse en una concentración sin diferencia significativa en cuanto a concentración a las 6,12,24 y 48 h.

En el caso del HH izquierdo (HHI) de los machos controles, la máxima concentración del RNA se observó a las 1 y 12 h (24.07 $\pm$ 1.0 y 22.60 $\pm$ 1.21 ug/mg de tejido hipotalámico). La administración de Tam provocó un significativo aumento en la concentración del RNA total, en el HHD a la hora post tratamiento para decrecer a valores significativamente menores en los otros tiempos estudiados, en el HHI se da una conducta similar al estudiar los distintos tiempos.

Al respecto cabe mencionar que existen evidencias, de que la administración de 200 ug/rata a ratas machos recién nacidas de tamoxifen disminuyó significativamente la biosíntesis de calmodulina en el HHD e Izquierdo al compararse con los valores interhemisféricos de los animales controles Rodríguez-Medina y cols. 2002).

En el caso de las ratas hembra en la tabla 3, se observa la presencia de asimetría funcional entre los hemisferios controles y tratados en casi todos los tiempos estudiados, en cuanto a la concentración en el HHD de las hembras controles existe un pico máximo de concentración a las 12 h (35.64 ± 1.23 ug/mg de tejido hipotalámico), mientras que en el HHI la máxima concentración del RNA se observa a las 3 h (17.67 ± 1.4 ug/mg de tejido hipotalámico) con un valor de casi la mitad del encontrado en el HHD.

En el caso de las hembras tratadas, Existe también una tendencia a presentarse una respuesta asimétrica en la concentración del RNA total en todos los tiempos estudiados. La máxima concentración en el HHD se presenta a la hora del tratamiento (27.66 ± 1.25 ug/mg de tejido hipotalámico), mientras que en el HHI se da a las 6 h post tratamiento (18.31 ± 1.08 ug/mg de tejido hipotalámico).

Aunque en la literatura no señala con precisión donde actuarían específicamente los andrógenos durante la DSH de los roedores, se ha propuesto, que los andrógenos actúan sobre el hipotálamo derecho, para organizar la expresión de la conducta sexual de la rata macho (Kimura, D. 1987). En el mismo sentido, los trabajos de Karolczak, M y Beyer, C, 1998, muestran que existe dimorfismo sexual en la concentración del RNAm, para receptores β a estrógenos en el hipotálamo del ratón, siendo el macho recién nacido quien presenta valores significativamente mayores del RNAm, es factible pensar que los andrógenos actúan sobre el lado derecho del hipotálamo para organizar o estructurar algunas conductas de tipo masculino. Lo anterior relacionado con la expresión en la edad adulta de conducta pseudomasculina de las ratas hembras tratadas con andrógenos durante su etapa neonatal y que se conoce desde hace años (Wilson, J y col, 1941; Kimura, D. 1987). Las tablas 2 y 3 nos muestran que en el hipotálamo de machos y hembras existe asimetría funcional en la concentración del RNA total (diferencia significativa en concentración de RNA entre los hemisferios hipotalámicos) en todos los tiempos estudiados, de los animales controles y experimentales de ambos sexos. ¿por qué? Existe una fluctuación en la concentración en el HHD o Izquierdo en los tiempos estudiados y no existe una tendencia a ser sólo una la concentración de RNA total, es posible que los andrógenos masculinicen conductas reproductivas en ambos hemisferios hipotalámicos en la rata macho al provocar una expresión génica diferencial en la concentración del RNA total a diferentes tiempos por este motivo, es probable, por ejemplo, que actúen sobre la parte derecha del hipotálamo en un determinado tiempo, para organizar vías o sustratos para el establecimiento de la conducta sexual masculina, expresada activacionalmente en la edad adulta (Kimura, D. 1987), y actúen perinatalmente también sobre la parte izquierda en otro tiempo en el mismo animal, para organizar conductas como la ovulación (López y col, 1997).

En particular, resulta interesante mencionar, que existe una concentración significativamente más alta de RNA total (27.27 ± 1.06 ug/ mg de tejido hipotalámico) en el HDD de las ratas virilizadas neonatalmente (fase ovárica en estro persistente) donde no se presenta la ovulación (ausencia de cuerpos lúteos). En cuanto al ¿por qué?, la concentración del RNA total, es significativamente mayor interhemisféricamente, en casi todos los tiempos estudiados durante la etapa neonatal cuando se compara con el nivel encontrado en la edad adulta, los trabajos de Karolczak, M y col, 1998a; Karolczak, M. Y Beyer, C, 1998b, demuestran que los máximos valores de concentración del RNA mensajero para la biosíntesis de receptores beta a estrógenos, en el hipotálamo del ratón intacto, se presentan alrededor del parto, dicha concentración es significativamente menor a los 90 días de edad post parto, es decir la concentración neonatal de un tipo de RNA, es significativamente mayor cuando se compara con la de la edad adulta en el ratón de ambos sexos, esto independientemente de su peso hipotalámico.

La tabla 4 muestra los patrones de expresión del RNAm para el citocromo P450 arom (RNAmP450arom), en hemisferios hipotalámicos de ratas machos y hembras tratadas neonatalmente con Tam y T respectivamente. En cuanto a la existencia de asimetría funcional en la expresión del RNAmP450arom entre los hipotálamos de la rata macho. En los machos controles la máxima expresión del RNAmP450arom en el HDD, se presenta entre las 3 Y 12 horas(neonatos) y 90 días posteriores al tratamiento (+++) mientras que en los otros tiempos 1, 24 y 48 h se observa una menor expresión del RNAmP450arom (+). Como se sabe, en condiciones normales, los niveles de testosterona sérica se encuentran elevados en las ratas macho alrededor del parto (Perakis, A y Stylianopoulou, F, 1986; Weisz, J., Ward, I, 1980) y permanecen elevados 15 días después del mismo (Doler, K, y Wuttke,W., 1975). Sin embargo, algunos datos sugieren que los andrógenos, ejercerían su acción inductiva de diferenciación sobre el cerebro durante un periodo muy corto de tiempo 12 h o menos (Arai, Y, y Gorski, A, 1968), nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que los andrógenos bioquímicamente ejercen su acción promotora de diferenciación cerebral en 2 fases una corta de 3 horas donde son introducidos a los sustratos neuronales, seguida de una segunda fase más prolongada de (aproximadamente 9 h), donde actúan masculinizando al hipotálamo (Arai, Y, y Gorski, A, 1968 ; Perakis, A y Stylianopoulou, F, 1986; Weisz, J., y Ward, I, 1980).

El efecto de la administración neonatal del Tam, en las ratas macho, provocó un patrón de expresión del RNAmP450arom, diferente, como se observa en la tabla 5 desaparece la conducta de mayor expresión RNAmP450arom del entre las 3, 12 h y 90 días post tratamiento. Es interesante mencionar que nuestros datos muestran una similitud de expresión del RNAmP450arom con casi todos los tiempos estudiados en ambos hemisferios de las ratas hembras control.

En el caso de las ratas hembras control (tabla 4), observamos también una conducta de asimetría funcional en la expresión del RNAmP450arom, se observa además, que los niveles de expresión del RNAmP450arom en ambos hemisferios nunca alcanzan el nivel de expresión de los hemisferios de los machos control

(+++), es decir, su nivel de biosíntesis de RNAm P450arom, es menor. Esto parece sustentarse con lo reportado por otros autores quienes han sugerido que existen un mayor nivel de aromatización y de receptores a andrógenos en el hipotálamo de ratas machos durante la diferenciación sexual hipotalámica cuando se les compara con las hembras (Von-Ziegler, N, y Lichtensteiger, W, 1992). Por otro lado, la administración neonatal de la T modifica la expresión del RNAmP450arom, en las ratas hembras en ambos hemisferios hipotalámicos, en todos los tiempos estudiados, de hecho los patrones de expresión son más similares a los de los machos control que al de sus propios controles en ambos hemisferios.

El HHD de las hembras tratadas muestra una tendencia a mayor expresión RNAmP450arom del entre las 3 y las 12 h y 90 días post tratamiento en el caso del HHI, este nunca alcanza estos niveles de expresión del RNAmP450arom, a ninguna hora estudiada.

Nuestros datos proponen la existencia de asimetría funcional en la concentración de RNA total y de la expresión del RNAm citocromo P450 arom en el hipotálamo durante la diferenciación sexual hipotalámica y el estado adulto de la rata.

Es importante seguir acumulando evidencias para tener una total certeza de la existencia de una conducta de respuesta asimétrica del RNA y del RNAm citocromo P450 arom, como resultado de fenómenos de virilización y feminización (andrógenos aromatizables / dependiente y sus inhibidores) del hipotálamo durante su organización neuronal.

CONCLUSIONES

- 1.- Existe asimetría funcional tanto en la concentración del RNA total, como en el patrón de expresión del RNAm para el citógeno P450 arom, en el hipotálamo en ratas machos y hembras, durante la diferenciación sexual hipotalámica y en el estado adulto.
- 2.- La administración neonatal de 30 ug/rata de testosterona, a ratas hembras, modifica la concentración del RNA total, así como la expresión del RNAm para el citocromo P450 arom, hacia un patrón de tipo masculino en los hemisferios hipotalámicos, durante la diferenciación sexual hipotalámica y en el estado adulto.
- 3.- La administración neonatal de 200 ug/rata de tamoxifen a ratas macho, modifica la concentración del RNA total, así como la expresión del RNAm para el citocromo P450 arom, hacia un patrón de tipo femenino en los hemisferios hipotalámicos durante la diferenciación sexual hipotalámica y en el estado adulto.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abdelgadir S., Resko J., Ojeda S., Lephart E. y Roselli C.** 1994. Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger RNA in rat brain. *Endocrinology*. 135:395-401.
2. **Abe-Dohmae S., Tanaka R. y Harada N.** 1994. Cell type and region specific expresión of aromatase mRNA in cultured brain cells. *Mol. Brain Res.* 24:153-158.
3. **Allen L., Hines M., Shryne J. y Gorski R.** 1989. Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *J. Neurosci.* 9:497-506.
4. **Arai Y., Sekine Y. y Murakami S.** 1996. Estrogen in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res.* 25:403-407.
5. **Arai, Y., y Gorski, A.** Protection against the neural organizing effect of exogenous androgen in the neonatal female rat. *Endocrinol.* 82: 1005-1009. 1968 a.
6. **Arnold A. y Gorski R.** 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Ann. Rev. neurosci.* 7:413-442.
7. **Balthazart J. y Foidat A.** 1993. Brain aromatasa and the control of male sexual behavior. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44:521-540.
8. **Barr L. y Kierman J.** *Hypothalamus.* 1986. *The Human Nervous System.* N.Y. Harper and Row. pc 119-190.
9. **Barraclough C. y Gorski R.** 1961. Studies on mating behavior in the androgen-sterilized rat and their relation to the hypothalamic regulation of sexual behavior in the female rat. *J. Endocrinol.* 25: 175-182.
10. **Beach, F.** 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in the female mammals. *Horm. Behav.* 7: 105-138.
11. **Beato M.** 1989. Gene regulation by steroid hormone. *Cell.* 56:335-344.
12. **Ben-Jonathan W.** 1985. Dopamine: a prolactin inhibiting hormone. *Endocr. Rev.* 6:564-589.
13. **Beyer C.** 1976. Neuroendocrine factors and behavior. *Bol Estud Med Biol.* 29:181-185.
14. **Beyer C., Gree S, y Hutchison J.** 1994a. Androgens influence sexual differentiation of embryonic mouse hypothalamic aromatasa neurons in vitro. *Endocrinology.* 135:1220-1226.
15. **Beyer C., Green S., Barker P., Huskisson N. y Hutchison J.** 1994b. Aromatase-immunoreactivity is localized in neurones in the developing mouse hypothalamic and cortex. *Brain Res.* 638:203-210.
16. **Beyer C., Larsson K., Pérez-Palacios G., y Morali, G.** 1973. Androgen structure and male sexual behavior in the castrated rat. *Horm. Behav.* 4: 99-108.
17. **Beyer C., Vidal N. y Mijares A.** 1970. Probable role of aromatization in the induction of estrous behavior by androgens in the ovariectomized rabbit. *Endocrinology.* 87: 1386-1389.
18. **Beyer C., Wozniak A. y Hutchison J.** 1993. Sex specific aromatization of testosterone in mouse hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology.* 58:673-681.

19. **Breedlove S.** 1992. Sexual differentiation of the brain and behavior. *Behavioral Endocrinology*. Press: 39-70.
20. **Breedlove S.** 1997. Sex on the brain. *Nature*, 389: 801-807.
21. **Brinton R., Tran J., Profatt P. y Montoya M.** 1997. 17beta-estradiol enhances the outgrowth and survival of neocortical neurons in culture. *Neurochem. Res.* 22:1339-1351.
22. **Brown-Grant K.** 1974. On "critical periods" during the postnatal development of the rat. *Colloques del Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Medicale INSERN.* 32:357-376.
23. **Brown-Grant K. y Cross B.** 1966. Recent studies on the hypothalamus. *British. Med. Bull.* 22: 54-62.
24. **Brownstein M., Eskay R. y Palkovits M.** 1982. Thyrotropin releasing hormone in the median eminence is in processes of paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides.* 2: 197-201.
25. **Canchola E., Rodríguez M., Dueñas H., Mercado E. y Rosado A.** 1996. Ca²⁺/ calmodulin system: Participation in the progesterone-induced facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen-primed rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:403-409.
26. **Canick J., Vaccaro D., Livingston E., Leeman S., Ryan K. y Fox T.** 1986. Localization of aromatase and 5 α -reductase to neuronal and non- neuronal cells in the fetal rat hypothalamus. *Brain Res.* 372:277-282.
27. **Chia-Yi Kuan; Kevin A., Roth B., Richard A., Flavell C. y Pasko Rakic.** 2000. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. 23:291-297.
28. **Chiba T. y Murata Y.** 1985. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat. A WGA-HRP study, *Brain Res. Bull.* 14:261-272.
29. **Chomczynski P. y Sacchi N.** 1987. *Analytical Biochemistry.* 162:156.
30. **Chowen J., Torres-Aleman I. y Garcia-Segura L.** 1992. Trophic effects of estradiol on fetal-rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*, 56: 895-901.
31. **Christensen L. y Clemens L.** 1975. Blockade of testosterone-induced mounting behavior in the male rat with intracranial application of the aromatase inhibitor andros 1.4.6- triene-3-17 dione. *Endocrinol.* 97:1545-1551.
32. **Cooper K.** 1987. The neurobiology of the fever: Thoughts on recent developments. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 297-305.
33. **Corbin C., Trant J., Walters K. y Conley A.** 1999. Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine aromatase cytochrome P450. 140:5502-5510.
34. **Daniel J., Fader A., Spencer A. y Dohanich GP.** 1997. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav.* 32:217-225.
35. **Davidson J.** 1969. Effects of estrogen on the sexual behavior of male rats. *Endocrinol.* 84: 1365-1372.
36. **Davis E., Shryne J. y Gorski R.** 1996. Structural sexual dimorphism in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive

- to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology*. 63:142-148.
37. **Davis E., Shyrne J. y Gorski R.** 1996. A revised critical period for the sexual defferentation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *Neuroendocrinology*. 62(6):579-585.
 38. **Dewsbury D.** 1969. Copulatory behavior of rats (*Ratus norvegicus*) as a function of prior copulatory experience. *Anim. Behav.* 17:217-273.
 39. **Dewsbury D.** 1979. Descripton of sexual behavior in research on hormone-behavior interactions. En *Endocrine Control of Sexual Behavior*. Beyer C. Ed. Ney York Raven Press. 3-32.
 40. **Döhler, K., y Wuttke, W.** Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. *Endocrinol.* 97:898-907. 1975.
 41. **Döner G. y Staud J.** 1968. Structural changes in the preoptic anteriorhypothalamic area of the male rat, following neonatal castration and androgen substitution. *Neuroendocrinol.* 4:136-140.
 42. **Edwards D., y Pfeiffle K.** 1983. Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiol. Behav.* 30: 437-443.
 43. **Everett J.** 1978. The Mammalian Hypo-thalamo -Hypophysial System. En: *The endocrine Hypothalamus*. Jeffcoate, S y Hutchinson, J. (Eds). London. Academic Press. 1-33.
 44. **Fillit H, Weinreb H, Cholst I, Luine V, McEwen BS, Amador R, Zabriskie J.** 1986 Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type. *Psychoneuroendocrinology*. 11:337-345.
 45. **Finley J., Maderdrut J. y Roger L.** 1981. The imunocytochemical localization of somatostatin – containing neurons in rat central nervous system. *Neuroscience*. 6:2173-2192.
 46. **Frohman L., y Jansson J.** 1986. Growth hormone releasing hormone. *Endocr. Rev.* 7: 223-253.
 47. **George F. y Ojeda S.** 1982. Changes in aromatasa activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology*. 111:522-529.
 48. **Gibbs R. y Aggarwal P.** 1998. Estrogen and basal forebrain cholinergic neurons: implications for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline. *Horm Behav.* 34:98-111.
 49. **Goldsmith P. y Thind K.** 1990. Location of the neuroendocrine dopamine neuronsin the monkey hypothalamus by retrograde tracing and immunostaining. *J.Neuroendocrinol.* 2:169-179.
 50. **Goldstein L., Kurz E. y Sengelaub D.** 1990. Androgen regulation of dendritic growth and retraction in the development of a sexually dimorphic spinal nucleus. *J. Neurosci.*, 10: 935-946.
 51. **Gorski R.** 1973. Perinatal effects of sex steroid on brain development and function. *Prog. Brain Res.* 39:149-163.
 52. **Gorski R. y Warner J.** 1965. Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinol.* 76: 226-239.

53. Gorski R., Gordon J., y Shyne J. 1978. Evidence for an morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148: 333-346.
54. Gorski, R. 1985. Sexual dimorphism of the brain. *J. Anim. Sci.* 61: 1001-4.
55. Goy R. y Mc Ewen B. 1980. Sex differences in behavior: rodents, birds and primates. En: *Sexual Differentiation of the Brain*. Goy, R.W. y Mc Ewen, B.S., (Eds). Massachusetts: The MIT Press. 13-73.
56. Hahn E., Miyairi S. y Fishman J. 1985. 19-hydroxylation of androgens in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:597-600.
57. Hardy D. y De Bold J. 1971. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Horm. Behav.* 2: 287-297.
58. Harish P., Majchrowicz E. y Virmani M. 1985. Cerebral alteration in calmodulin levels associated with the induction of physical dependence upon ethanol in rats. *Brain Res.* 342: 379-381.
59. Harris G. 1964. Sex hormones brain development and brain function. *Endocrinology.* 75:627-648.
60. Hernández M. 1985. Lateralized rewarding brain stimulation affects forepaw preferences in rats. *Physiol. Behav.* 34(4): 495-499.
61. Herzog A. 1991. Reproductive endocrine considerations and hormonal therapy for women with epilepsy. *Epilepsy* 62:527-533.
62. Hoepfner B. y Ward I. 1988. Prenatal and neonatal androgen exposure interact to affect sexual differentiation in female rats. *Behav. Neurosci.* 102:61-65.
63. Hoepfner, B., y Ward, L. Prenatal and neonatal androgen exposure interact to affect sexual differentiation in female rats. *Behav. Neurosci.* 102:61-65. 1988.
64. Houtsmuller E., De Jong F., Rowland D. y Slob A. 1995. Plasma testosterone in fetal rats and their mothers on day 19 of gestation. *Physiol. Behav.*, 57:495-499.
65. Hutchison J. y Steimer T. 1984. Androgen metabolism in the brain: behavioral correlates. *Prog. Brain Res.* 61:23-51.
66. Hutchison J., Beyer C., Hutchison R. y Wozniak A. 1995. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53:307-313.
67. Hutchison J., Wozniak A., Beyer C. y Hutchison R. 1996. Regulation of sex-specific formation oestrogen in brain development: endogenous inhibitors of aromatase. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 56:201-207.
68. Hutchison J., Wozniak A., Beyer C., Karolczak M. y Hutchison R. 1999. Steroid metabolizing enzymes in the determination of brain gender. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 69: 85-96.
69. Joels M. y Karst H. 1995. Effects of estradiol and progesterone on voltage-gated calcium and potassium conductances in rat CA1 hippocampal neurons. *J Neurosci.* 15:4289-4297.

70. Joseph S., y Knigge K. 1978. The endocrine hypothalamus: Recent anatomical studies. *Res. Publ. Assoc. Res. Ner. Ment. Dis.* 56: 15-47.
71. Ju G., Liu S. y Zhang X. 1991. Peptidergic innervation of the pars distalis of the adenohypophysis. *Neuroendocrinology.* 53(1):41-44.
72. Kawata M., Yuri K. y Morimoto M. 1994. Steroid hormona effects on gene expresión, neuronal structure and differentiation. *Horm. Behav.* 28(4):477-482.
73. Kelly M. 1980. Electrical effects of steroids in neurons. In K.W. McKerns and V. Pantic (Eds), *hormonally Active Brain Peptides*, Plenum Press. N.Y. p.c.253-277.
74. Kendall D., Stancel G. y Enna S. 1982. The influence of sex hormones on antidepressant-induced alterations in neurotransmitter receptor binding. *J Neurosci.* 2:354-360.
75. Kerchner M., Malsburry C., Ward O. y Ward I. 1995. Sexually dimorphic areas in the rat medial amygdale: resistance to the demasculinizing effect of prenatal stress. *Brain Res.* 672(1-2):251-260.
76. Kimura, D. "Are men's and women brains really different?". *Canadian Psychol.* 28(2): 133-147. 1987.
77. Larsson K., Sodersten P. y Beyer C. 1973. Sexual behavior in male rats. treated with estrogen in combination with dihydro-testosterone. *Horm. Behav.*
78. Lauber M. 1996. Ontogeny of 5 alpha-reductase (type 1) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: early presence in germinal zones. *Endocrinology*, 137: 2718-2730.
79. Lauber M. y Lichtensteiger W. 1994. Pre and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expresión in the male rat brain studied by in situ hibridization. *Endocrinology.* 127:1121-1128.
80. Lephart E. 1997. Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. *J. Steroid Biochem Molec. Biol.* 61 (3):375-380.
81. Lephart E. Simpson E. y Ojeda S. 1992. Brain aromatase enzyme activity during prenatal development in the rat. *J. Neuroendocrinol.*, 4:29-36.
82. Lephart E., Call S., Rhees R., Jacobson N., Bledsoe J. y Teuscher C. 2001. Neuroendocrine regulation of sexually dimorphic brain structure and associated sexual behavior in male rats is genetically controlled. *Niol. Reprod.* 64(2):571-578.
83. Levallet J., Bilinska B., Mitre H., Genissel C., Fresnel J. y Carreau S. 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biology of Reproduction.* 58:919-926.
84. López E., Cruz M., y Dominguez R. 1997. Asimmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the adult rat. *Arch. Med. Res.* 28(3): 343-348.
85. Luine V, McEwen B. 1977. Effects of an estrogen antagonist on enzyme activities and ³H estradiol nuclear binding in uterus, pituitary and brain. *Endocrinology.* 100:903-910.

86. Luine V., Richards S., Wu V. y Beck K. 1998. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav.* 34:149-162.
87. MacLusky J., Bowlby A., Brown E. y Hochberg B. 1997. Sex and the developing brain: Suppression of neuronal estrogen sensitivity by developmental androgen exposure. *Neurochemical Research.* 22:11 1395-1414.
88. Mc Cormick C. y Singh P. 1996. Asymmetry in progesterone receptor levels and sexual behavior in female rats. *Physiol. Behav.* 59(2): 349-354.
89. McEwen B. 1988. Genomic regulation sexual behavior. *J. Steroid Biochem.* 30(1-6):179-83.
90. McEwen B. 1992. Steroid hormones: effect on brain development and function. *Horm. Res. Suppl.* 3:1-10.
91. McEwen B. y Alves S. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev.* 20:278-306.
92. McEwen B. y Parsons B. 1982. Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 22:555-598.
93. Merchenthaler I., Hynes M. y Vigh S. 1984. Corticotropin releasing factor (CRF): origin and course of afferent pathways to the median eminence (ME) of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 39:296-306.
94. Merchenthaler I., López F. y Negro-Vilar. 1988. The pro-LHRH system of the rat brain: effects of changes in the endocrine background. *Brain Res.* 20:713-720.
95. Mermelstein P., Becker J. y Surmeier D. 1996 Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci.* 16:595-604.
96. Morali G. y Beyer C. 1979. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. En: *Endocrine Control of Sexual Behavior.* Beyer C. (Ed). 33-75.
97. Morley P., Whitfield J., Vanderhyden B., Tsang B. y Schwartz J. 1992. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology.* 131:1305-1312.
98. Murphy D., Cole N., Greenberger V. y Segal M. 1998. Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 18:2550-2559.
99. Naftolin F. 1994. Brain aromatization of androgens. *J Reprod Med.* 39:257-261.
100. Naftolin F. y MacLusky N. 1984. Aromatization hipótesis revisited. In M. Serio (Ed). *Differentiation: Basic and Clinical Aspects.* Raven Press, N.Y. p.c. 79-91.
101. Naftolin F., Ryan K. y Petro Z. 1971. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:368-370.
102. Nauta W. y Haymaker W. 1969. Hypothalamic nuclei and fiber connection. p.c. 136-209.
103. Noback C. y Demarest R. 1980. *Sistema Nervioso HUmano.* Mc. Graw Hill. p.c. 253-259.

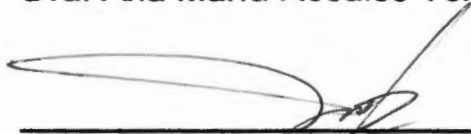
104. **Palkovits M.** 1986. Neuropeptides in the median eminence. *Neurochem Int.* 9:131-139.
105. **Perakis, A., y Stylianopoulou, F.** Effects of a prenatal androgen peak on rat brain sexual differentiation. *J. Endocrinol.* 36:415-416. 1986
106. **Pfeiffer C.** 1936. Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads. *Am. J. Anat.* 58: 195-225.
107. **Phoenix C., Goy R. y Young W.** 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65:369-382.
108. **Powers J.** 1970. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiol. Behav.* 5: 831-835.
109. **Ralsman G. y Field P.** 1973. Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res.* 54:1-29.
110. **Resko D., Pereyra A. y Roselli C.** 2000. Region-specific regulation of cytochrome P450 aromatase Messenger ribonucleic acid by androgen in brains of male rhesus monkeys. *Biol. Reprod.* 62(6):1818-1822.
111. **Rhees R., Shryne J. y Gorski R.** 1990. Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 52(1):17-23.
112. **Rhoda J., Colbier P. y Roffi J.** 1984. Gonadal steroid concentration in serum and hypothalamus of the rat at birth: Aromatization of testosterone to 17 beta estradiol. *Endocrinology.* 114: 1754-1760.
113. **Rodríguez M., Reyes A., Chavarría M.E., Vergara M., Canchota E. y Rosado A.** 2001. Asymmetric calmodulin distribution in the hypothalamus role of sexual differentiation in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 72:189-195.
114. **Rodríguez M.A., Reyes A., Cavaría M.A., Vergara M., Canchota E. y Rosado A.** 2001. Asymmetric calmodulin distribution in the hypothalamus role of sexual differentiation in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 72:1-7.
115. **Rodríguez M.A., Vergara M., Chavarría M.E., Rosado A. y Reyes A.** 1998. Changes in hypothalamic calmodulin concentration induced by perinatal hormone manipulation in rat. *Pharmacology Biochemistry and behavior.* 61(4):445-450.
116. **Roselli C. y Klosterman S.** 1998. Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinol.* 139(7):3193-3201
117. **Roselli C. y Resko J.** 1993. Aromatase activity in the rat brain: Hormonal regulation and sex differences. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44:499-508.
118. **Roselli C. y Resko J.** 1997. sex differences in androgen regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 61(3):365-374.
119. **Roselli C., Ellinwood W. y Resko J.** 1984. Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology.* 114:1754-1760.

120. **Roselli C., Horton L. y Resko J.** 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology*. 117:2471-2477.
121. **Roselli C., Horton L. y Resko J.** 1987. Time -course and steroid specificity of aromatase induction in rat hypothalamus preoptic area. *Biol. Reprod.* 37:628-633.
122. **Roselli C., Klosterman S. y Resko J.** 2001. Anatomic relationships between aromatase and androgen receptor mRNA expression in the hypothalamus and amygdale of adult male cynomolgus monkeys. *J. Comp. Neurol.* 439(2):208-223.
123. **Salah E., Abdegadir C., Resko J., Ojeda R., Lephart E., Michel J. y Roselli C.** 1994. Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology*. 135:395-401.
124. **Salah E., Abdelgadir S., Roselli C., Jerome V. y Resko J.** 1997. Distribution of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in adult rhesus monkey brains. *Biology of Reproduction*. 57:772-777.
125. **Salaman D., y Birkett, S.** 1974. Androgen induced sexual differentiation of the brain is blocked by inhibitors of DNA and RNA synthesis *Nature*. 247: 109-112.
126. **Schally A., Arimura, A., y Kastin, A.** 1973. Hypothalamic regulatory hormones. *Science*. 1179: 241-249.
127. **Segovia S. y Guillaumon a.** 1997. Sexual differences in the Vomeronasal system. *Brain Res. Rev.* 44(4):377-382.
128. **Sétalo G., Flerkó B. y Arimura A.** 1978. Brain cells as producers of releasing and inhibiting hormones. *Int. Rev Cytol.* 7(suppl):1-52.
129. **Simerly R.** 1998. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behavioural Brain Research*. 92: 195-203.
130. **Simerly R., Gorski R. y Sawnsen I.** 1986. Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: an immunohistochemical study in the rat. *J. comp. Neurol.* 246:343-363.
131. **Simpson R.** 2000. Role of aromatase in sex steroid action. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25:149-156.
132. **Södersten P.** 1973. Estrogen-activated sexual behavior in the rat. *Horm. Behav.* 4: 247-256.
133. **Sutter-Dub M.** 2002. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids*. 67(2):77-93.
134. **Swanson H. y Van Der Weff J.** 1965. The early androgen syndrome, effects of prenatal testosterone propionate. *Acta Endocrinol. Copenh.* 50:379-390.
135. **Swanson L. y Sawchenko P.** 1980. Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinol.* 31: 410-417.
136. **Szabó K.** 1987. Origin of the adenohipophyseal vessels in the rat. *J. Anat.* 154:229-235.

137. **Szentágothia J., Flerkó B., Mess B. y Halász M.** 1962. Hypothalamic control of the anterior pituitary. Budapest: Akadémiai Kiadó.
138. **Tagaki K. y Kawashima S.** 1993. Cultura of rat brain preoptic area neurons: effects of sex steroids. *Int. J. Dev. Neuros.* 11:63-70.
139. **Tiefer L. y Johnson W.** 1973. Restorative effect of various androgens on the copulatory behavior of the male golden hamster. *Horm. Behav.* 4: 359-364.
140. **Timmers R. y Lambert J.** 1987. Measurement of aromatase activity in the brain of the african catfish. *Claris gariepinus* a comparison of two assays methods. *Comp. Biochem. Physiol.* 88b:453-456.
141. **Toran Allerand C.** 1984. On the sexual differentiation of the central nervous system morphogenetic consequences of steroid exposure and possible rol of α -protein. *Progress Brain Res.* 61:63-97.
142. **Vangala V. Naftolin R. y Ryan K.** 1973. Aromatization in the central nervous system of rabbits: Effects of castration and hormona treatment. *Endocrinol.* 92:589-596.
143. **Vergara M., Canchola E., y Rosado A.** 1988. Dimorfismo sexual hipotalámico de la rata en diferentes estadios de maduración. *Memorias del Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro. México.* C-105.
144. **Von Ziegler, N.** Asymmetry of brain aromatase activity. Region-and sex specific developmental patterns. *Neuroendocrinol.* 55(5): 512-518. 1992
145. **Weisz, J., y Ward, I. L.** Plasma testos terone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetus and neonatal offspring. *Endocrinol.* 106:306-316. 1980
146. **Whalen, R.** Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm. Behav.* 5: 157-162. 1974.
147. **Wilson J., Hamilton J., y Young W.** 1941. Influence of age and presence of the ovaries on reproductive function in rats injected with androgens. *Endo-crinol.* 29: 784-789.
148. **Wilson J., Young W. y Hamilton J.** 1940. Technic suppressing development of reproductive function and sensitivity to estrogen in the female rat. *Yale J. Biol. Med.* 13: 189- 202.
149. **Yarh P. y Greene S.** 1992. Effects of unilateral hypothalamic manipulations on the sexual behaviors of rats. *Behav. Neurosci.* 106(4): 698-709.

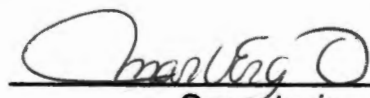
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 9 de agosto de 2002.

Dra. Ana María Rosales Torres



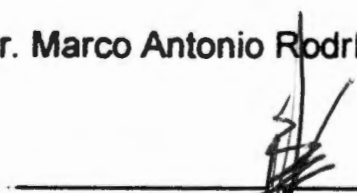
Presidente

M en C. Marcela Vergara Onofre



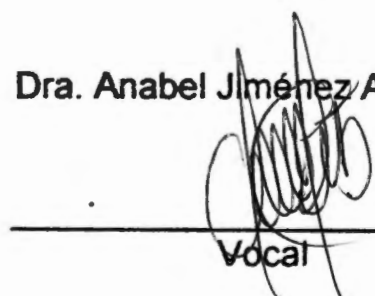
Secretario

Dr. Marco Antonio Rodríguez Medina



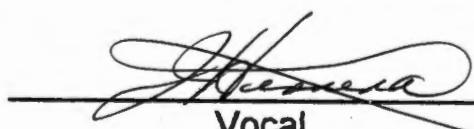
Vocal

Dra. Anabel Jiménez Anguiano



Vocal

M. en C. Joaquín Herrera Muñoz



Vocal