



Universidad Autónoma Metropolitana

CASA ABIERTA AL TIEMPO

UNIDAD IZTAPALAPA

BIOLOGIA MOLECULAR DE LA
DIFERENCIACION SEXUAL
HIPOTALAMICA



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCION ANIMAL
P R E S E N T A :
MARCELA VERGARA ONOFRE

MEXICO, D.F.

1995

222269

NUEVAMENTE, GRACIAS HOY Y SIEMPRE

DIRECTORES

INTERNO

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

DIRECTOR DE LA MAESTRIA DE BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCION DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.

EXTERNO

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

JEFE DE LABORATORIO DE BIOQUIMICA MOLECULAR
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA EN BIOQUIMICA
DEL IMSS, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE BIOQUIMICA
MOLECULAR. JEFE DE LABORATORIO:
DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ.

PERTENECIENTE A LA UNIDAD DE
INVESTIGACION MEDICA EN BIOQUIMICA
DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL
C.M.N. s. XXI. JEFE DE UNIDAD:
DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ.

JURADO

PRESIDENTE

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

SECRETARIO

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

PRIMER VOCAL

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

SEGUNDO VOCAL

DR. EFRAIN MERCADO PICHARDO

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Q.F.B. LUZ MARIA BALLESTEROS NEGRETE
LABORATORIO DE BIOQUIMICA MOLECULAR

M en C. MARCO ANTONIO RODRIGUEZ MEDINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ZARAGOZA

M en C. REBECA GARCIA MACEDO
LABORATORIO DE BIOQUIMICA MOLECULAR

DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN
BIOQUIMICA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

***Y A TODO
SU GRUPO DE COLABORADORES***

**A MIS PADRES,
HERMANOS
Y SOBRINOS**

**A MIS
PROFESORES**

**A MIS
AMIGOS**

INDICE

INTRODUCCION.....	1
HIPOTESIS.....	30
OBJETIVO.....	30
MATERIAL Y METODOS.....	31
RESULTADOS.....	42
DISCUSION.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	64

INTRODUCCION

La diferenciación sexo-específica de los componentes del sistema reproductivo, tanto centrales como periféricos, constituye un proceso crítico que reviste la mayor importancia en los procesos de reproducción bisexual de los animales superiores. El requerimiento de una conducta reproductiva característica, así como el establecimiento de patrones de secreción gonadotropa peculiares de cada sexo, se sustenta en el establecimiento temprano de una estructuración cerebral sexualmente dimórfica. Los resultados obtenidos por una vasta cantidad de investigaciones realizadas sobre este mecanismo de diferenciación anatomo-funcional de las estructuras del sistema nervioso central, han sugerido que el proceso de diferenciación sexual neurobiológica involucra, en gran parte, la modulación por la presencia de hormonas esteroides en tiempos precisos del proceso.

Ha sido bien establecido que, durante los últimos días del embarazo y los primeros días después del nacimiento, la presencia de concentraciones eficientes de hormonas gonadales, (fundamentalmente andrógenos o estrógenos resultantes de la aromatización in situ de estas hormonas androgénicas), en algunas regiones del encéfalo de los roedores es capaz de inducir la diferenciación anatómica de regiones específicas del sistema nervioso central. Esta diferenciación morfológica es, a su vez, la causa de un desarrollo diferencial que termina con el establecimiento de un funcionamiento dimórfico sexual en el adulto, incluyendo fundamentalmente el patrón de secreción de las hormonas gonadotropas, y consecuentemente de las hormonas gonadales, y la presencia de una conducta sexual característica de cada sexo. Debe, sin embargo, mencionarse que algunos otros parámetros del funcionamiento cerebral han sido relacionados con la diferenciación sexual de este órgano, entre ellos: regulación del consumo alimenticio, diferencias en el aprendizaje y la función cognocitiva, la conducta social, el peso corporal, etc. (Ver Tabla I).

Aunque la presencia de una diferenciación sexual de las funciones cerebrales relacionada con la función reproductiva se ha establecido en diferentes especies de mamíferos, tales como: ratón, cuyo, criceto, oveja, mono rhesus, ferret gerbil y rata (Gorski, 1983), se debe tener mucho cuidado en la sobre-generalización de este fenómeno. En nuestro caso enfocaremos el problema de una manera más profunda en la rata, especie

**INDUCIDOS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL
CAMBIOS EN EL FUNCIONAMIENTO CEREBRAL**

- a).- La regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal (Nance, 1976).
- b).- Conducta agresiva (Barr, 1976)
- c).- Marcaje de territorio (Lumia, 1977).
- d).- Postura de Micción (Beach, 1974)
- e).- Conducta social y de juego (Goy, 1974)
- f).- Conducta de aprendizaje y/o ejecución (Dawson, 1975)
- g).- Lateralización de las funciones cerebrales, especialmente en el humano (Hines 1982).
- h).- El papel durante la cópula (Ehrnardt, 1978)
- i).- Actividad espontánea, reacción a varios estímulos sensoriales (Beatty, 1979).

en la que estos dos procesos fisiológicos, la regulación del patrón de secreción de gonadotrofinas y de la conducta reproductiva, han sido estudiados de una manera muy amplia.

Las diferencias mejor estudiadas, y por lo tanto las que representan el fenómeno de diferenciación sexual de una manera más clara, son por supuesto las que participan directamente en el fenómeno reproductivo, esto es: las hembras presentan fluctuaciones cíclicas notables en el patrón de síntesis y liberación de las hormonas gonadotropas, lo cual se refleja en cambios cíclicos en el aparato reproductor. Estos últimos fundamentan la ciclicidad en la síntesis y secreción de hormonas gonadales, en la maduración y puesta ovular, en la posibilidad de establecer el desarrollo de un embarazo normal a partir del ovocito fertilizado y, desde luego, en la ciclicidad de la conducta sexual típica de la hembra. Todo este patrón cíclico en el funcionamiento reproductivo se encuentra ausente en el macho, en el cual, como raíz de toda la fisiología reproductiva se encuentra una secreción tónica de las hormonas gonadotropas (Gorski, 1965; Castro-Vazquez, 1975; Campbell, 1977).

También ha sido establecido que la diferenciación sexual del encéfalo, como la del resto del aparato reproductivo, sigue un patrón inherentemente femenino, es decir que en ausencia de estímulos hormonales eficientes ejercidos en un tiempo crítico durante la diferenciación, el organismo seguirá pasivamente, independientemente de su sexo genético, un camino de desarrollo femenino.

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

La relación que existe entre la manipulación del ambiente hormonal en una época crítica después del nacimiento y el patrón reproductivo en la rata adulta fue demostrado originalmente por Carroll Pfeiffer en 1936. Este investigador castró a un grupo de hembras recién nacidas y cuando

llegaron a la edad adulta, les implantó ovarios, observando que estos ovarios mostraron la aparición de cuerpos lúteos, y fueron capaces de inducir los cambios típicos del ciclo estral en la vagina de las hembras transplantadas. En un segundo experimento, inmediatamente después de la ovariectomía se les injerto a las ratas recién nacidas fragmentos de testículo. Al llegar a la edad adulta, estas ratas, androgenizadas en el período perinatal, mostraron anovulación y por lo tanto esterilidad, y la presencia en el estudio del epitelio vaginal de estro persistente. Además, fueron incapaces de inducir los cambios cíclicos arriba anotados cuando les fueron trasplantados ovarios.

Este investigador encontró también que si se orquidectomizan ratas machos dentro de los 3 primeros días después del nacimiento y cuando llegan a la edad adulta se les hace un injerto de ovario, el macho será capaz de inducir la presencia de un pico de LH suficiente para inducir la luteinización del ovario injertado y presentará conducta sexual femenina, es decir, lordosis. También demostró que si una rata hembra recién nacida es tratada con andrógenos o estrógenos antes del cuarto día después del nacimiento, será una adulta estéril e incapaz de responder a la terapéutica substitutiva con estrógenos con un pico de secreción de LH suficiente para disparar la ovulación.

Como resultado de los experimentos de Pfeiffer, comprobados y extendidos después por numerosos investigadores (Gorski, 1979; MacLusky, 1981; McEwen, 1981), se postuló que las ratas machos y hembras, sin importar el sexo genético del animal, nacen con la capacidad, inherente, de desarrollar una secreción cíclica de gonadotrofinas. Sin embargo, si durante un período crítico del desarrollo, que comprende desde unos pocos días antes del nacimiento, hasta unos pocos días después, existen en el medio ambiente neuronal niveles elevados de hormonas esteroides (bajo condiciones normales testosterona por la presencia de testículos en el macho) entonces se inducirá una diferenciación de tipo masculino que tendrá como consecuencia la aparición de un patrón tónico de secreción de gonadotrofinas al llegar a la edad adulta. La ausencia de testículos, normal o inducida artificialmente, da como resultado la aparición de un patrón de secreción femenino de gonadotrofinas, sin que la ausencia o presencia de ovarios parezca tener ninguna importancia.

A los resultados relacionados con el patrón tónico o cíclico de secreción de gonadotrofinas, deben agregarse las observaciones posteriores realizadas sobre la conducta sexual. Los estudios de Gorski, (1971, 1978) y Pfaff (1986), han demostrado que la determinación del patrón conductual que un animal seguirá en la edad adulta, no depende de su constitución genética, ni tampoco, por lo menos totalmente, de sus características endocrinas en la edad adulta. El patrón conductual, es también una consecuencia de la diferenciación cerebral, y más específicamente hipotalámica, inducida por el ambiente hormonal existente en el período crítico perinatal.

En efecto, los machos castrados durante este período crítico, demostrarán en la edad adulta, un patrón conductual de tipo femenino, incluyendo proceptividad, atractividad y adopción frecuente de la posición de lordosis (Beach, 1966). Por el contrario, la hembra gonadectomizada en la etapa crítica no sufrirá alteraciones en su conducta y se comportará como hembra (Ehrhardt, 1981; McEwen, 1981; McLusky, 1981). Estos resultados indican que la presencia de ovarios en el animal recién nacido no desempeña ninguna función en la determinación de la conducta sexual del adulto normal.

La administración exógena de esteroides durante este período crítico (en la rata este período se extiende desde el nacimiento hasta el día 8, aproximadamente, con modalidades que después precisaremos) no provoca en el macho ninguna modificación de su conducta sexual en la edad adulta. Por el contrario, las hembras tratadas con esteroides gonadales durante este período de tiempo, no mostrarán en la edad adulta la conducta de lordosis típica de las hembras, sino que adoptarán la conducta de monta, típica de los machos, aún después del tratamiento hormonal adecuado (Dörner, 1975).

Las observaciones anteriores han sido realizadas fundamentalmente en la rata, pero otros experimentos han permitido hacer extensivo el fenómeno de diferenciación sexual neuronal a otras especies animales, incluyendo al hombre (Ehrhardt, 1981). Sin embargo, debe mencionarse que se encuentran grandes diferencias en cuanto a la iniciación y la extensión del período crítico en relación con el desarrollo general de las diversas especies animales, así como también a la susceptibilidad a la aplicación exógena de esteroides gonadales, incluyendo el tipo de esteroides, la dosis aplicada y el esquema de tratamiento (Pfaff, 1986).

El período de diferenciación sexual, llamado periodo crítico, en los mamíferos varía de especie a especie y será de acuerdo al nivel de maduración del sistema nervioso central, al momento de nacimiento puede ser:

- a).- Prenatal
- b).- Perinatal
- c).- Postnatal temprano.

Al igual que en otras especies estudiadas, la temporalidad de la diferenciación sexual en la rata presenta diferencias importantes en relación al sexo, particularmente obedeciendo a modificaciones de la sensibilidad al estímulo hormonal y también a la identidad de los esteroides gonadales específicos responsables de la diferenciación (Christensen, 1978; Gorski, 1981). Por ejemplo, la sensibilidad en la rata hembra persiste hasta los 7-10 días después del nacimiento, mientras que en el macho la sensibilidad se pierde rápidamente después del quinto día.

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

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 (Erhardt, 1981), ha permitido concluir que en nuestra especie el período crítico se presenta antes del nacimiento (Rhoda, , 1984).

Sin embargo, el desarrollo de las diferencias sexuales en el humano, están de acuerdo con el desarrollo de mecanismos básicos y que pueden ser los mismos que operan para otras especies (Amurra, 1987).

Hay esencialmente tres argumentos en favor de esta hipótesis:

- a.- La presencia de numerosas funciones así como características morfológicas que son sexo-específicas en el hombre y que se correlacionan con otros animales.
- b.- La sensibilidad del desarrollo cerebral humano a esteroides sexuales y su correlación con drogas. Existen varios tipos de desordenes que indican disturbios de los procesos de diferenciación sexual por factores genéticos y ambientales que pueden dejar anomalías morfológicas y funcionales del cerebro humano.
- c.- La existencias de períodos críticos distintos para la diferenciación sexual del cerebro humano, y se han extrapolado a animales de experimentación. Esta noción se soporta por el hecho de que la producción de testosterona en el feto macho, empieza a las 8 semanas después de la concepción y el pico es alrededor de las 20 semanas (Reinisch 1984).

Otros han sugerido que la pubertad es otro período de desarrollo sensitivo (Feder, 1984). Sin embargo, la posibilidad de que podría ser considerado de que existen más de "ventana abierta" a la sensibilidad y que de acuerdo al grado de sensibilidad y el tiempo exacto de la presencia del período crítico puede ser sexo-específico y podría variar dependiendo de ciertos circuitos neuronales determinados.

Existen dudas, en el caso de algunas de las especies en listadas, para precisar la duración precisa del período sensitivo del SNC a las hormonas gonadales. En estos casos, la información dada (pre o postnatal, pre o post anidación) indican el momento en que la administración exógena de hormonas gonadales ha demostrado algún efecto sobre la diferenciación y la organización del SCN.

Es conveniente mencionar que no todas las diferencias encontradas en el funcionamiento cerebral relacionadas con el sexo pueden ser explicadas por el efecto de los esteroides gonadales sobre la diferenciación neurobiológica.

TABLA II

RELACIÓN ENTRE EL PERIODO DE GESTACIÓN Y EL PERIODO CRITICO DE DESARROLLO PARA LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

ANIMAL	TIEMPO DE GESTACIÓN	PERIODO CRITICO (Días después de la Concepción)
--------	---------------------	--

MAMÍFEROS

Rata	20 a 22	18 a 27
Ratón	19 a 20	Postnatal
Hámster	16	Postnatal
Conejo de Indias	63 a 70	30 a 37
Hurón	42	Postnatal
Perro	58 a 63	Pre y post natal
Oveja	145 a 155	30 a 90
Mono Rhesus	146 a 180	40 a 60

AVES

Codornis Japonesa	17 a 18	Pre-anidación
Pollo doméstico	22	Pre-anidación
Zebra	12 a 14	Post-anidación
Pichón	14	Post-anidación

Modificado de:

Goy, R. W. Ed. Sexual Differentiation of the brain.
(MIT Press, Cambridge, Mass, 1980).

MacLaren, A. Reproduction in Mamals, Austin, C. R. Eds.
(Cambridge Univ. Press. New York, 1972) vol. 2.

Algunos experimentos han demostrado que otros factores pueden participar de manera importante en la determinación de estas diferencias. Por ejemplo, es conveniente mencionar los experimentos realizados por Arnold y Breedlove (1985), a fin de discriminar entre los efectos relacionados con el sexo de las hormonas gonadales, y el efecto de otros factores

Usando cultivos de tejido neuronal sexo-específico obtenido de varias regiones cerebrales durante el día 14 de la vida embrionaria, es decir antes de que se presente el primer pico de secreción testicular de testosterona, Arnold y Breedlove (1985) demostraron que las neuronas catecolaminérgicas de ratón desarrollan, en ausencia de hormonas gonadales, diferencias funcionales y morfológicas específicamente relacionadas con el sexo del animal de donde proceden. Estos experimentos permiten concluir que la diferenciación ligada al sexo de ciertos fenotipos neuronales puede ser inicialmente independiente de la presencia de hormonas gonadales.

Es importante considerar cuales hormonas esteroides son capaces de inducir los cambios descritos con anterioridad y revisar muy someramente cuales son las estructuras cerebrales, particularmente hipotalámicas, sobre las cuales ejercen su acción. También haremos algunas consideraciones sobre la relación dosis/ tiempo de administración de las hormonas activas sobre la diferenciación neuronal.

Aunque en los primeros experimentos se usó casi exclusivamente la testosterona, originándose los conceptos de androgenización o masculinización, actualmente se sabe que el estradiol es tan efectivo, o más efectivo, que la testosterona para producir los efectos de "Masculinización Hipotalámica" (Gorski, 1966; Sutherland, 1972). Estos resultados se han confirmado por que algunos compuestos anti-estrogénicos o inhibidores de la aromatización son inhibidores muy eficaces de la actividad masculinizante de la testosterona (McEwen, 1977; Vreeburg, 1977). También se ha comprobado que el encéfalo, particularmente el hipotálamo, como muchos otros tejidos periféricos, son capaces de metabolizar los esteroides, una de estas reacciones implica la aromatización de la testosterona para formar estradiol (Selmanoff, 1977).

TABLA III

LA AROMATIZACIÓN DE LA TESTOSTERONA A ESTRADIOL DESEMPEÑA UN PAPEL FUNDAMENTAL EN EL PROCESO DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA

La evidencia para esta propuesta ha sido cada vez más convincente:

- 1.- Administrado en la etapa neonatal, el Benzoato de estradiol es más potente que el propionato de testosterona para inducir cambios masculinizantes en la conducta y en el patrón de secreción de gonadotrofinas en la edad adulta. Al parecer, la aromatización de testosterona a estradiol es un paso intermedio necesario (Gorski, 1971).
- 2.- Los metabolitos reducidos de la testosterona que no tienen la capacidad de ser aromatizados, tales como la Dihidrotestosterona, parecen ser incapaces de producir cambios masculinizantes, o por lo menos son considerablemente menos efectivos. (Whalen, 1974).
- 3.- La presencia de una enzima, la aromatasa, que esta presente en el cerebro en la edad perinatal, parece ser determinante para que la testosterona sea activa. Esta enzima sería responsable de convertir la testosterona a estradiol (Naftolin, 1975, Selmanoff, 1977). El complejo enzimático que funciona como aromatasa, muestra una distribución neuroanatómica limitada en la mayoría de los vertebrados superiores, el principal sitio de actividad se localiza en el hipotálamo basal -área preóptica y el sistema Límbico, es decir coincide con los sitios en que es esperada la acción de los esteroides sobre el patrón de diferenciación sexual cerebral (Roselli, 1985). En los roedores, la actividad de la aromatasa, es sexualmente dimórfica en la edad adulta, la actividad enzimática es 2-3 veces más grande en machos que en hembras en áreas blanco a esteroides, tales como en el área preóptica.
- 4.- Mediante la aplicación perinatal de antiestrógenos es posible bloquear la diferenciación sexual masculina inducida por testosterona (Booth, 1977; Doughty, 1974).
- 5.- La administración perinatal de inhibidores de la aromatasa previene la masculinización inducida por la testosterona (Booth, 1977; McEwen, 1977;)
- 6.- Los antiandrógenos, como el acetato de ciproterona, también inhiben la diferenciación masculina (Naeumann, 1967). Estos resultados pueden ser interpretados como un apoyo al papel directo de la testosterona, pero ha sido reportado que el acetato de ciproterona también inhibe la aromatización en el hipotálamo (Naftolin, 1975).

Finalmente, la dihidrotestosterona, la cual es un andrógeno que no puede ser aromatizado, es incapaz de provocar la masculinización del hipotálamo. De esta manera, podemos llegar a la curiosa conclusión de que son los estrógenos las sustancias activas en provocar la "masculinización" del cerebro, situación que es similar a la también demostrada actividad de los estrógenos en relación a la conducta sexual (Crews, 1979).

Estos hallazgos no parecen ser correlacionables con la ineficiencia del ovario para regular la diferenciación sexual cerebral y lo son todavía menos cuando se sabe que la concentración de estrógenos en la sangre periférica de la rata hembra recién nacida, es bastante alta. De hecho se ha demostrado que la concentración más alta de estrógenos durante la vida de un animal se alcanza, precisamente, durante el período crítico neonatal (Gunsalus, 1973; Dohler, 1974; Ojeda, 1975).

Esta discrepancia fundamental ha sido explicada por la presencia en las ratas recién nacidas de una proteína fetal que de una manera muy eficiente y específica fija estrógenos (la afinidad de esta proteína para fijar andrógenos es unas 100 veces menor que para fijar estrógenos) (Raynaud, 1971; Paplinger, 1973), de esta manera se asume que los altos niveles de estrógenos plasmáticos presentes en la rata recién nacida se encuentran secuestrados por su unión a esta proteína fijadora de estrógenos (Estrogen Binding Protein) y por lo tanto no son capaces de ejercer su acción sobre el sistema nervioso central. Por el contrario, aún concentraciones bastante menores de testosterona, pueden ser funcionalmente capaces de provocar la "androgenización" del hipotálamo (Gorski, 1979).

Por otro lado, los progestágenos parecen ser antagonistas del efecto que los andrógenos y los estrógenos poseen sobre la diferenciación cerebral. Los cambios permanentes provocado en el patrón de secreción de gonadotrofinas por la inyección neonatal de andrógenos o estrógenos pueden ser prevenidos, al menos en parte, por la administración simultánea de dosis muy elevadas de progesterona (Dorfman, 1967); Dörner, 1970). Por lo tanto, los progestágenos parecen tener un efecto protector sobre la especificidad sexual de la diferenciación cerebral, la cual se ha relacionado con su actividad de competencia sobre los receptores hormonales intracelulares (Etgen, 1984).

Experimentos realizados por Barraclough (1967), para demostrar el efecto de una misma dosis de andrógenos aplicados en diferentes días del llamado período crítico, han demostrado, que la aplicación a ratas y ratones hembras de 1.25 mg de propionato de testosterona (TP) en los días 2o., 5o., 10o. y 20o. de edad, provocaron los siguientes cambios:

- 100% de los animales presentaron androgenización completa, con esterilidad y estro persistente, cuando la aplicación se realizó entre los días segundo y quinto.;

- 40% de los animales mostraron androgenización total o parcial cuando la TP fue aplicada en el día décimo de vida y finalmente,

- Ausencia casi total de efecto en los animales inyectados a los veinte días de edad (Barraclough, 1967).

De estos experimentos se concluyó que el período crítico en los ratones y en las ratas se extiende del nacimiento al décimo día de edad, siendo los animales de esta especie notablemente más susceptibles entre los días segundo y quinto.

Cuando se inyectaron diferentes dosis de TP a ratas hembras de cinco días de edad (Barraclough, 1967) se observó que 1.25 mg de hormona produjo esterilidad permanente en el 99.8% de los animales, 10 ug, fueron capaces de inducir esterilidad en el 70.6% de las ratas, 5 ug. en el 44 y 1 ug en el 30%. Richardson, y Barker en 1966, observaron estro persistente en el 80% de las hembras tratadas con 10 ug de TP en el quinto día de vida. Sin embargo, algunos de estos animales fueron capaces de ovular y ser embarazadas. Swanson y Van der Werff-Ten Bosch (1964) demostraron que la aplicación de 5 ug de TP en el día 3o. de vida fue capaz de producir esterilidad y anovulación en el 100% de los animales tratados.

La rata hembra presenta un ciclo estral característico que dura 4 a 5 días. Durante este ciclo estral podemos considerar que el mecanismo reproductivo se inicia con una elevación progresiva en los niveles periféricos de estrógenos, los cuales producen un estímulo neural cíclico que termina por disparar la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo (Kelly, 1984, Everett, 1988). El período crítico del ciclo en el cual esto ocurre se inicia en el día del proestro, aproximadamente 2 horas después del medio día. La liberación de GnRH estimula la secreción de hormona luteinizante (LH) por la

pituitaria, la cual resulta en la puesta ovular que se realiza un poco después de media noche. El pico de LH produce también un aumento en la secreción de progesterona y, unas horas después se puede determinar la expresión de la conducta sexual característica, es decir la adquisición de la postura de lordosis cuando la hembra es montada por el macho.

Es probable que la secuencia de altos niveles de estrógenos seguidos de niveles crecientes de progesterona participe en la facilitación de la lordosis, porque esta secuencia de eventos no se presenta en ninguna otra fase del ciclo estral.

En el caso de la rata hembra es posible precisar que una secuencia cíclica de fluctuaciones hormonales culmina con la producción de la ovulación y la expresión de la conducta sexual de lordosis que son requerimientos indispensables para la relación sexual exitosa y por lo tanto para la preservación de la especie. En contraste, la rata macho no presenta ninguno de estos cambios cíclicos en las concentraciones hormonales ni en la expresión de la conducta sexual, observándose la conducta de monta cada vez que el macho tiene la oportunidad de hacerlo.

Se han observado, además, los siguientes efectos en ratas hembras androgenizadas neo-natalmente:

- 1.- La administración de TP durante los primeros 3 días de vida inhibe o demora la apertura vaginal, en contraste, la administración durante los siguientes días puede provocar apertura vaginal precoz.
- 2.- El contenido de gonadotrofinas hipofisarias y secreción de gonadotrofinas son disminuidas en hembras altamente androgenizadas.
- 3.- La androgenización de ratas hembras neonatales muestran un incremento en el desarrollo corporal.
- 4.- La fijación de estradiol en el hipotálamo medio y anterior es significativamente reducida en ratas hembras androgenizadas.
- 5.- La ovulación puede ser inducida en las ratas hembras androgenizadas por la administración cíclica de gonadotrofinas, un efecto similar fue observado por la estimulación eléctrica del hipotálamo.

- 6.- Los ovarios de ratas hembras androgenizadas muestran incremento en la producción de andrógenos.
- 7.- Una sola aplicación de TP en los primeros días de vida causa cambios permanentes del metabolismo en el hígado y en la glándula pituitaria (Dörner, 1981).

MODELOS NEURONALES DIMORFICOS

Se podría proponer que la diferenciación sexual es la consecuencia de una expresión diferencial del genoma neuronal en los machos y en las hembras. Sin embargo, ha sido demostrado que la capacidad funcional del cerebro en la rata adulta depende del ambiente hormonal en que se encuentra este órgano durante el periodo de diferenciación sexual, el cual ocurre en la rata durante los primeros días después del nacimiento. Se ha demostrado que la rata macho nace con la potencialidad de desarrollar una conducta cíclica de secreción hormonal, capaz de apoyar el funcionamiento cíclico del ovario. Si el macho es castrado durante las 72 horas posteriores a su nacimiento, posteriormente será capaz de inducir la formación cíclica de cuerpos lúteos en ovarios injertados y mostrará la conducta de lordosis típica de las hembras. Si a este macho castrado se le aplica una sola inyección de 10 μ g de propionato de testosterona 24 horas después de la castración, las propiedades de apoyar la luteinización y de presentar conducta sexual femenina son totalmente abolidas. Un tratamiento similar de la hembra recién nacida con propionato de testosterona resulta en la abolición permanente de la ovulación espontánea en la rata adulta. Estas ratas androgenizadas presentan ausencia de variaciones cíclicas en la citología vaginal, manteniéndose en estro vaginal permanente, ovario poliquístico o polifolicular y ausencia total de cuerpos lúteos.

Estas observaciones demuestran que la diferenciación sexual en la función reproductora de la rata no obedece a diferencias sexo-específicas en la expresión del genoma neuronal, sino que este dimorfismo se establece a consecuencia de variaciones en la presencia y concentración de hormonas esteroides en el medio en que se realiza el desarrollo de algunas áreas del sistema nervioso central, principalmente el hipotálamo. Estos hechos

llevaron a C.F. Phoenix y colaboradores (1959) a proponer que durante el desarrollo perinatal de la rata la presencia de hormonas esteroides es capaz de propiciar una modificación en la organización, anatómica y funcional, de los circuitos neuronales que participarán en la regulación de la función neuroendocrina en el animal adulto. De acuerdo a esta hipótesis, la secreción de hormonas esteroides en el adulto tendrá una función fundamentalmente activacional, es decir, tendrán la función de activar, modular o inhibir, selectivamente, la funcionalidad de los circuitos neurales ya existentes, organizados de una manera sexo-específica durante la diferenciación sexual del encéfalo.

Se acepta de manera general que las diferencias sexo-específicas en la fisiología sexual y reproductora en los roedores, y en otras especies de animales, es debida a la diferenciación sexual de los substratos neuronales, agrupaciones celulares y alargamientos dendríticos, que regulan la actividad hipofisiaria y la conducta sexual. El concepto de la existencia de centros neuronales "reproductores", es decir, específicamente relacionados con la fisiología reproductiva, obedece a la demostración de que ciertas áreas neurales susceptibles a la presencia de hormonas gonadales, son indispensables para la liberación cíclica de hormonas ovulatorias en la hembra y para la expresión de la conducta sexual tanto en las hembras como en los machos

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

El dimorfismo neuro-anatómico ligado al sexo debe ser relacionado con diferencias en la funciones cerebrales relacionadas con el componente neuroendócrino de la actividad sexual en la rata:

El núcleo dimórfico sexual del área preóptica, es significativamente mayor en los machos adultos que en las hembras, reflejando la existencia de un mayor número de neuronas. Este núcleo ha sido claramente relacionado con el dimorfismo sexual en el patrón de

EI DIMORFISMO SEXUAL DEL HIPOTÁLAMO INCLUYE:

- a).- Tamaño del llamado núcleo dimórfico sexual de la región preóptica (SDN-POA) (Gorski, 1980).
- b).- Tamaño nucleolar. Diferencias dimórficas en el núcleo supra-quiasmático (Dorner, 1968; 1973; Robinson, 1986)
- c).- Número celular y tamaño individual de las neuronas (Gleier, 1982; Hammer, 1984)
- d).- Conectividad sináptica en los núcleo ventromedial y arqueado del hipotálamo (Raisman, 1973; 1990; Matsumoto, 1979, 1991; Lustig, 1993)
- e).- Modelos de respuesta funcional en las neuronas (Sakima, 1984)
- f).- Diferencias en el desarrollo dendrítico del área preóptica (Greenough, 1977).
- g).- La distribución de neuronas, fibras nerviosas, receptores y los niveles de recambio de los neurotransmisores, particularmente en su acción sobre los sistemas monoaminérgicos. (Resiert, 1991).
- h).- Diferencias significativas en el número de sinápsis en los núcleos dimórficos (Raisman, 1973).
- i).- Actividad enzimática del hipotálamo (Griffiths, 1976).
- j).- Actividad de las enzimas relacionadas con marcadores colinérgicos (Luine, 1983),
- j).- Diferencias en el papel desempeñado por las neuronas peptidérgicas y los receptores neuropeptídicos en los procesos de diferenciación (Hausler, 1990; Alexander, 1991).
- k).- La presencia de otros núcleos hipotalámicos dimórficos, distintos al señalado por Gorski y su grupo (Rainbow, 1982), a saber, la parte ventrolateral del núcleo ventromedial y el núcleo arqueado.
- l).- La cromatina unida pueden mostrar un importante dimorfismo sexual en las células que constituyen los núcleos mencionados(Olsen, 1980).

secreción de LH y la presencia de la conducta de lordosis en las hembras.

Los machos también poseen un mayor número de conexiones sinápticas en la amígdala media

La corteza del cingulus, así como también la corteza frontal y la corteza visual son mas gruesas en la rata macho que en la hembra. Estas diferencias pueden explicar las diferencias sexuales específicas en la agudeza visual y en la recuperación post-traumática

Otras áreas que muestran dimorfismo sexual en la rata y que pueden relacionarse directamente con la fisiología y la conducta reproductiva, son la parte ventrolateral del núcleo ventromedial y el núcleo arqueado del hipotálamo

Existen fundamentalmente tres sistemas neuronales, estrictamente relacionados con el funcionamiento sexual, en los que se ha demostrado claramente la presencia de dimorfismo sexual, es decir la presencia de claras diferencias relacionadas con el sexo del individuo en el número, tamaño y agrupación de las células, así como en la estructura de sus interrelaciones dendríticas:

- I.- Regiones del control del canto en el cerebro de los pájaros.
- II.- El grupo de núcleos con dimorfismo sexual en el hipotálamo de la rata, es decir el propiamente llamado núcleo dimórfico del área preóptica, el núcleo ventromedial y el núcleo arqueado.
- III.- El núcleo espinal bulbocavernoso en la rata.

Para nosotros es particularmente importante el segundo modelo, en particular el Núcleo dimórfico sexual del área preóptica medial (MPOA) del hipotálamo de la rata. Esta región se ha considerado el sitio donde probablemente reside el mecanismo de regulación diferencial de las características dimórficas relacionadas con el sexo, incluyendo el control de la conducta sexual y la liberación cíclica de gonadotrofinas, mecanismo necesario para la ovulación.

El área preóptica es una área densamente poblada de neuronas. Es notable que la densidad neuronal en esta región es varias veces más grande que en otras regiones cercanas. En base a esto, Gorski y col. en

1980, definieron esta área como un núcleo, el núcleo dimórfico sexual del área preóptica (SDN-POA). La importancia de éste núcleo reside en el hecho de que se ha observado que es 3 a 6 veces más grande en los machos que en las hembras adultos. Los resultados obtenidos mediante la provocación de lesiones, así como también los observados como consecuencia de la acción directa de implantes de esteroides en el área preóptica de neonatos femeninos han demostrado de una manera bastante clara el papel que este núcleo desempeña en el establecimiento de la regulación sexual específica en la rata,

La castración de ratas macho recién nacidas produce una reducción significativa (cerca del 50%) en el volumen del SDN-POA en la edad adulta, este efecto de la castración puede ser completamente prevenido por la administración exógena de andrógenos aplicados un poco después de la realización de la orquidectomía. Por el contrario, la administración exógena, por vía subcutánea, de propionato de testosterona a hembras recién nacidas, incrementa de una manera significativa el volumen del SDN-POA en la rata adulta.

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

El SDN-POA es un modelo importante en el estudio de la diferenciación sexual, porque las diferencias sexuales en el volumen del SDN-POA quedan definitivamente establecidas durante la primera semana de vida postnatal, de manera casi simultánea al período en que también queda establecida la diferenciación sexual funcional del cerebro. Aunque el núcleo es ya claramente demostrable en el día 19 después de la fertilización, no presenta diferencias sexuales significativas en su volumen sino hasta el día del nacimiento (aprox. 3 días más tarde). Aunque al nacimiento el volumen del núcleo SDN-POA es casi el doble en las hembras, durante los siguientes 10 días hay un incremento gradual en el

volumen del SDN-POA en los machos, mientras que no hay cambios estadísticamente significativos en el tamaño del núcleo en la hembra (Jacobson, 1980). Esta diferencia en el patrón de crecimiento es aparentemente debida a las hormonas de origen testicular que actúan en el macho

Como mencionamos arriba, el crecimiento del SDN-POA, inducido inicialmente por la presencia de esteroides, parece realizarse durante los primeros 10 días de vida postnatal. Sin embargo, la maduración neuronal en el área preóptica, en términos de conectividad dendrítica, se prolonga hasta la 3ª semana de desarrollo postnatal. Se ha propuesto que el establecimiento de las conexiones neuronales del SDN-POA deben continuar después de la terminación del período crítico para confirmar la organización funcional definitiva de este núcleo,. Esto es compatible con el hecho de que los esteroides actúan únicamente durante el período crítico promoviendo el desarrollo de un mayor número de neuronas, ya que este aumento en la cantidad de células es necesaria para el establecimiento de las conexiones neuronales que se utilizarán posteriormente para el adecuado funcionamiento neuronal (Lawrence, 1980).

Aunque aún en el momento actual existe la necesidad de un mayor esfuerzo experimental para identificar la(s) función(es) de las neuronas en el SDN-POA, y para identificar sus conexiones y especificidad neuroquímica, este núcleo ha ofrecido a numerosos investigadores un valioso modelo para estudiar la diferenciación sexual hipotalámica.

Es bien conocido que el principal mecanismo de acción de las hormonas estrogénicas, y de otras hormonas esteroides, se realiza mediante su fijación a receptores citoplásmicos específicos que posteriormente son transportados al núcleo celular en donde funcionan como modificadores del proceso de transcripción genética. Los receptores citoplásmicos para las hormonas esteroides, inicialmente descritos por Jensen y Jacobson (1962), están formados por ligandos de alta afinidad ($K_d \approx 10^{-10}$ M) para las hormonas y se encuentran presentes en baja cantidad ($2-6 \times 10^4$ moléculas por célula) específicamente en las células blanco. Después de fijar a los esteroides estos receptores experimentan 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. La fijación del complejo al DNA se realiza con gran afinidad en lugares particulares del genoma localizados relativamente lejos (-222 a -95 pares de bases) de la llamada "caja TATA",

secuencia que se acepta como parte del promotor en las células eucariotas (O'Malley, 1986). 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 la RNA polimerasa II induce la síntesis de moléculas precursoras (RNAhn) de RNA mensajeros específicos, esta estimulación es ya demostrable dentro de los 30 min. siguientes a la penetración del esteroide al citoplasma celular.

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

Así pues, se acepta en el momento actual que la fijación del estradiol a receptores intranucleares, que funcionan como factores reguladores de la transcripción, induce tanto cambios en la expresión del material genético, como un aumento en la estabilidad de los RNAm y de sus precursores (Rainbown, 1988). Hasta el momento actual se han podido identificar un número considerable de proteínas y RNAm que son regulados por la presencia de estrógenos (Romano, 1989; Law, 1994). Algunas de estas proteínas, que dependen de la presencia de estrógenos, participan de una manera directa en el mecanismo de transmisión del impulso nervioso (Romano, 1989; y Law 1994) y pueden seguramente constituir parte importante de los cambios de comunicación inter-neuronal inducidos por la presencia de hormonas esteroides.

Curiosamente se ha demostrado, usando el procedimiento de hibridización in situ, que los receptores estrogénicos son regulados a la baja por la presencia de estradiol en algunos núcleos encefálicos, tales como el segmento ventrolateral del núcleo ventromedial (VLVM), y el núcleo arqueado del hipotálamo. Estos dos agrupamientos celulares contienen, en condiciones basales, concentraciones altas de receptores estrogénicos y participan de una manera muy importante en el control neural de la

conducta de lordosis (VLVM) y en la regulación de la secreción de hormonas esteroides en las hembras (núcleo arqueado) (Döhler, 1984a).

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, tales como el núcleo ventromedial (VMN) del hipotálamo. Los cambios observados incluyen: aumento en la concentración intracelular de RNA y consecuentemente, en el número de ribosomas y en la cantidad de retículo endoplásmico, aumento en el número de vesículas de secreción y en la síntesis de proteínas importantes para la función nerviosa, tales como los receptores para progesterona, algunos neuropéptidos como las encefalinas y la proteína de 70 kDa, llamada por este hecho, dependiente de estrógenos. Esta última proteína, que es sintetizada en el VMN, es posteriormente transportada a los núcleos grises centrales.

Estas observaciones corroboran, a un nivel más molecular, los resultados de estudios anteriores, que habían demostrado que la síntesis de RNA y de proteínas inducida por los estrógenos es indispensable para la inducción de la diferenciación sexual hipotalámica.

Para poder tener una visión adecuada del mecanismo por el cual la presencia de hormonas esteroides es capaz de modular la actividad y la diferenciación neuronal es necesario identificar los productos de la actividad genómica que son modificados por la presencia de las hormonas esteroides y tratar de determinar la funcionalidad de tales productos en la determinación de la diferenciación neuronal, fundamentalmente hipotalámica.

Un gene puede ser definido como una unidad específica de DNA en un cromosoma, que puede ser transcrita y producir RNA que servirá para funciones particulares en tipos determinados de células. Este RNA puede ser de varias clases: ribosomal, de transferencia cuya función es directa, o mensajero, este último es el que puede ser traducido por el mecanismo citoplásmico y dar origen a una proteína. Una de las más importantes observaciones recientes es que la mayoría de los genes de animales eucariotes codifican a las moléculas del RNAm como transcritos primarios de gran tamaño, los cuales deben ser procesados para constituir moléculas maduras de RNAm. Estos productos primarios de la transcripción genética, de gran longitud, se encuentran en el núcleo y se conocen como RNA nuclear heterogéneo (RNAhn) (Korack, 1994)..

Ya que el RNAhn se sintetiza y se modifica en el núcleo, y el RNAm debe ser utilizado y traducido en el citoplasma, el procesamiento del RNAhn va seguido del transporte del RNA resultante a través de los procesos de unión y separación de sitios específicos de la matriz nuclear, envoltura nuclear y del citoesqueleto (Shröder, 1987) poros de la membrana nuclear. La separación compartimentalizada de los procesos de transcripción y traducción en los eucariotes, tiene algunas desventajas puesto que el transporte del RNAm del núcleo al citoplasma aumenta el tiempo durante el cual dichas moléculas de RNAm se encuentran expuestas a la acción de nucleasas degradativas. Sin embargo, la separación es muy ventajosa para la regulación estricta del metabolismo celular en tanto que permite que el procesamiento se complete en el núcleo antes de que el RNAm interactúe con la maquinaria de traducción.

Las modificaciones que debe experimentar el RNAhn eucariótico pueden ser parcialmente explicadas por la necesidad de darle estabilidad al producto final: puesto que gran parte de las nucleasas que degradan el RNA son exonucleasas, una manera de aumentar la estabilidad del RNA es la de modificar químicamente sus extremos, de forma que ya no sean accesibles al ataque por parte de estas enzimas.

La maduración post-transcripcional del RNAhn a RNAm involucra una serie de modificaciones, todas las cuales parecen ser indispensables para que el transporte al citoplasma del producto resultante sea posible (Shöder, 1987; Bruce, 1994.):

- a).- Splicing
- b).- Introducción de la estructura llamada cap
- c).- Metilación interna
- d).- Poliadenilación del extremo 3'.

a).- Splicing

Proceso de corte, eliminación y adición, mas brevemente conocido como splicing (Splicing).

Aunque los transcritos primarios de un gen contienen secuencias tanto de exones como de intrones, los mRNA maduros contienen secuencias derivadas únicamente de la parte exónica del DNA, por lo tanto uno de los

aspectos claves de la maduración del RNA es la eliminación de las secuencias intrónicas por un proceso conocido como "splicing". El orden en que las secuencias intrónicas son removidas, varía de una especie de RNA a otras, pero el proceso es siempre secuencial y la fidelidad con que se realiza el esplaicing de las uniones exón-intrón debe ser considerado de la mayor importancia. La eliminación de intrones y la unión de exones, es catalizada por pequeñas partículas nucleares ribonucleoproteicas (snRNPS) junto con un número variable de factores proteicos que no contienen RNA. La unión de estos factores con el RNAhn forman un complejo molecular que ha sido llamado esplaiceosoma.

Algunos genes son capaces de codificar para más de una proteína, dependiendo de como el producto primario de transcripción es procesado al RNAm maduro. Algunos precursores del RNAm que contiene un gran número de exones pueden sufrir un procesos de "esplaicing" que da como resultado la producción de distintas moléculas de RNAm capaces de codificar moléculas proteicas diferentes. Este fenómeno se conoce como "esplaicing diferencial". Por ejemplo, el gene de la tropomiosina I en la Drosophila codifica para dos proteínas musculares relacionadas, una se expresa durante el desarrollo embrionario y la otra únicamente se encuentra en el músculo torácico de las moscas adultas. Estas proteínas difieren al menos en 27 aminoácidos y el hecho de que se sintetice una u otra proteína depende de que se retire o no el tercer exón durante el proceso de "esplaicing". Otros productos primarios de transcripción que pueden sufrir "esplaicing" diferencial para generar proteínas distintas son, por ejemplo, los de los genes que codifican el mensajero para la síntesis de la fibronectina, la troponina y la cadena ligera de la miosina en la rata. Todavía no se conoce la razón fundamental por la cual ciertos intrones pueden perderse o no durante el procesamiento de los precursores del mRNA (Bruce, 1994; Schroder, 1987),.

b,c).- Estructura Cap (cachucha, gorra). Metilación Interna

Los extremos 5'-terminales de los transcritos primarios del RNAhn eucariótico son modificados covalentemente antes incluso de que la transcripción haya finalizado completamente. El extremo 5'-terminal del producto primario del transcrito contiene un residuo de nucleótido trifosfato (en general purina) que actúa como cebador para que la RNA polimerasa II lleve acabo el proceso de transcripción. Así, la modificación del extremo 5'-terminal comienza con la excisión del grupo fosfato terminal de este

resto trifosfato por acción de una fosfohidrolasa. El grupo 5'-difosfato resultante reacciona entonces con el 5'-5'-trifosfato. Esta reacción está catalizada por la enzima guaniltransferasa, y la estructura resultante recibe el nombre de "cap".

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

Las estructura "cap" intervienen en diferentes procesos. puesto que el enlace 5'-5'-trifosfato deja expuesto un único grupo 3'-hidroxilo, el "cap" protege al RNAm de las actividades 5'-exonucleolíticas al bloquear el extremo 5'-terminal de la molécula. Así mismo, el "cap" convierte a los precursores del RNAm en sustrato de las siguientes etapas nucleares del procesamiento, incluyendo el "splicing". Además las moléculas de RNAm maduro conserva el "cap" ya que sirve de centro de anclaje a los ribosomas durante la síntesis de proteínas (Bruce, 1994; Schröder, 1987),

d).- Poliadenilación del extremo 3'.

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

polimerasa. En este proceso, que requiere ATP, se pueden añadir hasta 250 nucleótidos para formar una cola de poliadenilato conocida como cola de poli A.

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

Existe la evidencia de la presencia en algunos tejidos de RNAm sin la cadena de poli-(A), o con una cadena característicamente pequeña. A este tipo de RNAm se le ha designado, en general, como RNAm poli (A)- (mensajero poli-(A) menos). Este tipo de RNA poli-(A) menos parece ser de la mayor importancia en el funcionamiento del tejido nervioso, ya que se ha encontrado una relación de mensajeros poli-(A)- / poli-(A)+ desusadamente grande en varias regiones del tejido neural, particularmente en aquellos casos en que las células se encuentran en un periodo activo de síntesis de proteínas (Wickens, 1990). Sin embargo, debe reconocerse que, con muy pocas excepciones, toda las moléculas maduras del RNAm contienen colas de poli-(A) cuya longitud es variable.

Cambios en la translación junto con la destrucción de ciertos RNAm, determinan que proteínas son sintetizadas en que células y en que momento. Las colas de poli-(A) de ciertos RNAm son prolongadas, mientras que las colas de otros RNAm son eliminadas. La adición selectiva de poli-(A) es regulada por una secuencia corta en la región 3'-terminal del mensajero que finalmente no se utiliza directamente durante la traducción del mensaje genético. Estos cambios regulados en la longitud de poli-(A) parecen desempeñar un papel importante en la regulación de la traducción (Wickens, 1990).

La adición de colas de poli-A constituye otra etapa de la maduración que el organismo puede utilizar para alterar el destino final del RNAm primario. Por ejemplo: el gen de la calcitonina (una hormona paratiroidea) en la rata, codifica también para una proteína que se encuentra implicada en la percepción del sabor y que se localiza en el cerebro. Esta segunda proteína se denomina proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP) y se distingue de la proteína original no sólo por "esplaiing"

diferencial, sino también porque se emplea un sitio de poliadenilación alternativo (Bruce, 1994).

Como se mencionó anteriormente, la poliadenilación y el esplaicing pueden ocurrir independientemente, y la poliadenilación no es un requisito para el transporte, porque algunos RNAm no poliadenilados se pueden transportar eficientemente. Desde este punto de vista, es importante mencionar que algunos RNAm vírales son sintetizados exclusivamente en el citoplasma y ahí mismo son poliadenilados, lo que indica un mecanismo y un papel extranucleares para el poli (A) (Shröder, 1987).

Se ha llamado PABP a un complejo de proteínas unidas a la cadena terminal de poli (A) del RNAm, El peso molecular del complejo PABP varía según la especie animal de que se trate, en los mamíferos es de aproximadamente 72 000. El PABP interactúa con el poli (A) formando un complejo parecido al nucleosoma cuya afinidad para el poli-(A) es 100% más grande que para otros polinucleótidos. El PABP puede migrar de una molécula de poli (A) a otras, lo cual puede constituir un factor importante, en términos de funcionalidad, como determinante de la selectividad y estabilidad de ciertos mensajeros. La importancia de este complejo PABP ha quedado demostrada por el hecho de que la delección del gen que codifica para el PABP (PAB) es letal, lo que parece indicar que este complejo es esencial para la síntesis de proteínas (Baer, 1983; Sachs, 1987).

Se ha visto, que un aumento en la longitud de la cola de poli (A), se correlaciona con un incremento en la estabilidad de diversos RNAm como los que codifican para la insulina y para la vasopresina. En estos casos la eliminación de residuos de la región 3'-terminal acelera el ataque de las enzimas hidrolíticas. Cuando la longitud de la cola de poli (A) es menor de 20-30 nucleótidos las proteínas protectoras que forman el complejo anteriormente señalado (PABP) no se unen al mensajero, resultando en una rápida degradación de la región 3'-terminal del RNAm (Nielsen, 1990)..

De acuerdo a todo lo mencionado anteriormente podemos concluir que los estrógenos parecen regular el funcionamiento neuroendócrino y consecuentemente la conducta sexual, mediante la modificación de la eficiencia con que se realiza la inter-comunicación entre las neuronas que participan en la regulación de estos procesos. La participación de los estrógenos en estos procesos de diferenciación sexual ha quedado bien

establecida por los siguientes experimentos: la castración neonatal, la administración sistémica de 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD) un inhibidor competitivo de la aromatasa (McEwen, 1979), la aplicación de tamoxifen (TAM) un compuesto antiestrogénico que se fija a los receptores (Döhler, 1984b, 1986) o la administración intracerebral de oligonucleótidos anti-sentido contra el receptor citoplásmico para estrógenos (McCarthy, 1992). Todos estos tratamientos experimentales modifican el número de neuronas y/o la densidad sináptica de los núcleos dimórficos mencionados, así como el desarrollo normal de la conducta y fisiología reproductiva en la rata.

Es evidente que este papel de los estrógenos como reguladores de la intercomunicación neuronal puede realizarse, fundamentalmente, mediante su participación en dos tipos de procesos:

1).- Los esteroides gonadales influyen en la determinación del número de neuronas que componen algunos núcleos dimórficos centrales, particularmente del SDN-APO de la rata adulta.

Seis posibles mecanismos pueden ser sugeridos:

- a) Los esteroides pueden estimular la neurogénesis o prolongar el período en que ocurre la neurogénesis.
- b) Los esteroides pueden modular la migración de neuronas recientemente formadas a la región del SDN-APO.
- c) Los esteroides pueden promover la supervivencia durante el proceso de migración y prevenir la muerte celular programada genéticamente (Apoptosis)
- d) Los esteroides pueden modular el reconocimiento de la superficie celular sobre los sitios de inmovilización migratoria de las neuronas, determinando la agregación de las neuronas en el SDN-APO.
- e) Los esteroides pueden prevenir la muerte celular por necrosis.
- f) Los esteroides pueden influir sobre la localización neuronal, en términos de funcionalidad y/o identificación neuroquímica.

Datos publicados sobre el tiempo en el cual se realiza la neurogénesis del área preóptica medial (APOM), indican que se realiza, fundamentalmente, alrededor del día 16 después de la concepción (Altman, 1978, Anderson, 1978). La administración de Timidina-³H a hembras en diferentes días de la gestación, seguida del sacrificio de sus crías 30 días después del nacimiento, demuestra por medio del análisis autoradiográfico de los cerebros (Jacobson, 1981) que la neurogénesis en el APOM cesa, en general, a los 16 días postconcepción. Sin embargo, la neurogénesis de aquellas neuronas que forman el SDN-APO fue específicamente prolongada, observándose que continúa hasta el día 20 después de la gestación. Jacobson y colaboradores. (1982) encontraron dos diferencias importantes, dependientes del sexo de la cría, en la aparente neurogénesis del SDN-APO: cuando la inyección de Timidina³ H se realiza en el día 14 de la gestación, el índice de la marca del SDN-APO es inicialmente mayor en las hembras que en los machos. Esta diferencia sexual se revierte a los 17 días de la gestación (Jacobson, 1981), momento que coincide con la presentación del primer pico de secreción de testosterona durante el desarrollo embrionario (Weisz, 1980). Sin embargo, estos resultados deben ser considerados con cuidado, ya que en estos trabajos las ratas fueron sacrificadas hasta el día 30 de vida extrauterina, por lo que los resultados pueden ser modificados por otros factores diferentes a la neurogénesis propiamente dicha, tales como la migración y la sobrevivencia.

Para identificar las vías de migración, se inyectó timidina radioactiva a una serie de ratas embarazadas el día 18 de gestación y se sacrificaron sus crías a diferentes edades (Jacobson, 1985). Dos horas después de la inyección, las células marcadas se encontraban en el límite del tercer ventrículo y durante el curso de las dos semanas siguientes las células marcadas parecen emigrar del cerebro medio a la base del tercer ventrículo, y después se lateralizan y se colocan en forma dorsal para alcanzar al SDN-APO. El destino final de estas neuronas es desconocido, ya que se ha observado que ellas pueden continuar su migración hasta más allá de los bordes laterales del APOM. Estos resultados han llevado a la propuesta de que existen sustancias neurotropas específicas capaces de determinar la migración de grupos celulares (Hamburger, 1982; Williams, 1988).

2).- Su participación en la organización del árbol dendrítico de algunas regiones neuronales ha sido también bien demostrada, siendo de particular interés para nosotros el caso del área ventromedial del hipotálamo.

Recientemente se ha demostrado que los estrógenos son capaces de modular la sinaptogénesis en la rata hembra adulta. En efecto se ha encontrado que la ovariectomía disminuye drásticamente (alrededor del 50%) el número y la densidad de las sinápsis, así como la estructura morfológica de las uniones nerviosas en los núcleos del área hipotalámica ventromedial, por el contrario, la aplicación de benzoato de estradiol es capaz de restaurar el número y la densidad sináptica en las áreas afectadas por la ovariectomía. También en la rata adulta se conoce el efecto de los estrógenos sobre la síntesis de RNAm específicos, particularmente aquellos relacionados con la sinaptogénesis (Lustig, 1991; Law, 1994).

Parece evidente aceptar que para realizar las anteriores acciones las hormonas deben participar activamente en la modulación de las actividades que participan en la duplicación del DNA y en la cesión de la información genética almacenada en esta molécula, para terminar en la síntesis de proteínas específicas necesarias para el crecimiento y el metabolismo celular. Basados en los descubrimientos de algunos investigadores que demostraron que la administración de algunos inhibidores específicos de la síntesis de RNA y de proteínas, tales como la actinomicina D o la cicloheximida atenúan o evitan por completo el efecto del TP, puede aceptarse, como era intuitivo hacerlo, que la síntesis de proteínas debe estar involucrada en la generación del dimorfismo sexual neuronal (Gorski, 1971). Sin embargo nuestro avance en el entendimiento cabal de los procesos moleculares que subyacen en la generación ontológica de este proceso ha sido extraordinariamente lenta y solo recientemente ha podido empezarse a conocer su biología. Sin embargo, aún ahora nuestros conocimientos sobre este aspecto particular del dimorfismo sexual distan mucho de ser completamente satisfactorios y fundamentalmente se han basado en extrapolaciones de nuestro conocimiento acerca de la biología molecular del funcionamiento neuronal, hipotalámico, en la rata adulta. Recientemente Lustig y colaboradores (1994) han estudiado la ontogenia de algunos tipos especiales de RNAm, particularmente el relacionado con la proteína de crecimiento llamada GAP-43 (también conocida como B-50, F1, pp46, Neuromodulina) y el mensajero de la enzima gliceraldehido-3-P deshidrogenasa, así como las

modificaciones experimentadas por estos mensajeros durante el tratamiento hormonal de los recién nacidos.

En el presente trabajo nosotros decidimos contribuir al conocimiento de las bases moleculares de la generación del dimorfismo sexual, estudiando, en el hipotálamo de la rata, las modificaciones experimentadas por la concentración total de RNAm, así como su distribución en RNAm-Poli-A menos y RNAm-Poli-A más, a diferentes tiempos (1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas) después del nacimiento, tanto en las ratas normales, como en las hembras tratadas con propionato de testosterona y los machos sometidos a tratamiento con tamoxifen.

HIPOTESIS

EL Patrón de RNAm es importante en la diferenciación sexual hipotalámica en la rata recién nacida.

OBJETIVOS

Estudiar el patrón de RNAm Poli A+ y Poli A- durante la diferenciación sexual hipotalámica.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

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

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

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

MADRES

- 1).- Se seleccionaron ratas hembras de 60 días de edad. Para obtener la certeza de su normalidad endócrino-reproductiva, se realizó en cada una de ellas el estudio de la regularidad del ciclo estral mediante la determinación diaria de citología vaginal durante un mínimo de tres ciclos.
- 2).- Las ratas cuyo ciclo estral presentó características normales fueron colocadas en presencia de machos para permitir una primera gestación. Esta primera camada no fue utilizada y se permitió la gestación solo para demostrar la capacidad reproductiva de las ratas seleccionadas, así como para realizar una segunda selección de

acuerdo al comportamiento maternal observado. De acuerdo a estas observaciones se seleccionaron finalmente solo aquellas ratas con apropiada ciclicidad estral, con gestación y camadas normales y que presentaron un comportamiento maternal adecuado.

- 3).- Dos semanas después de este primer parto se realizó nuevamente el seguimiento del ciclo estral y durante la fase de estro del tercer ciclo, se colocaron en una jaula, un macho por cada dos hembras, durante 6 horas.
- 4).- Cada dos horas, se verificó la presencia de espermatozoides por la aparición del tapón vaginal y/o por frotis vaginal, considerándose como inicio de la gestación el momento en que se detecta un tapón vaginal claro o la presencia de espermatozoides en la cavidad vaginal.
- 5).- Es importante mencionar que bajo estas condiciones de observación se encontró que el tiempo de gestación es de 502 ± 3 horas.

CRIAS

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

Hembras

Controles: 20 μ l de aceite de girasol
 Tratadas: Propionato de Testosterona 30 μ g en 20 μ l de aceite de girasol

Machos

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

- c).- La vía de administración que se utilizó fue la subcutánea, aplicándose el tratamiento en la zona dorsal. Una vez realizada la inyección la parte afectada del animal se cubre con vaselina.

d).- Las ratas se sacrificaron después del tratamiento a los siguientes tiempos:

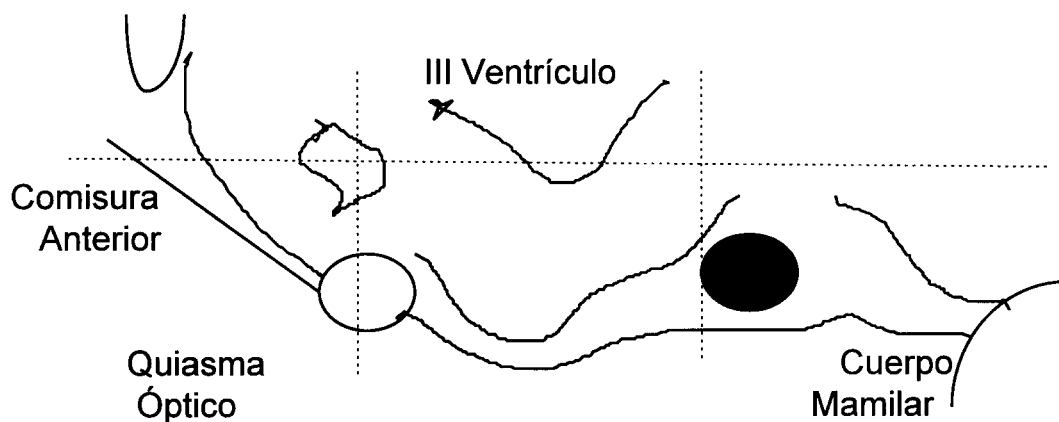
- 1 Hora
- 3 Horas
- 6 Horas
- 12 Horas
- 24 Horas
- 48 Horas.

e).- Inmediatamente después del sacrificio se realiza la obtención del tejido hipotálamo.

OBTENCIÓN DE LOS HIPOTÁLAMOS

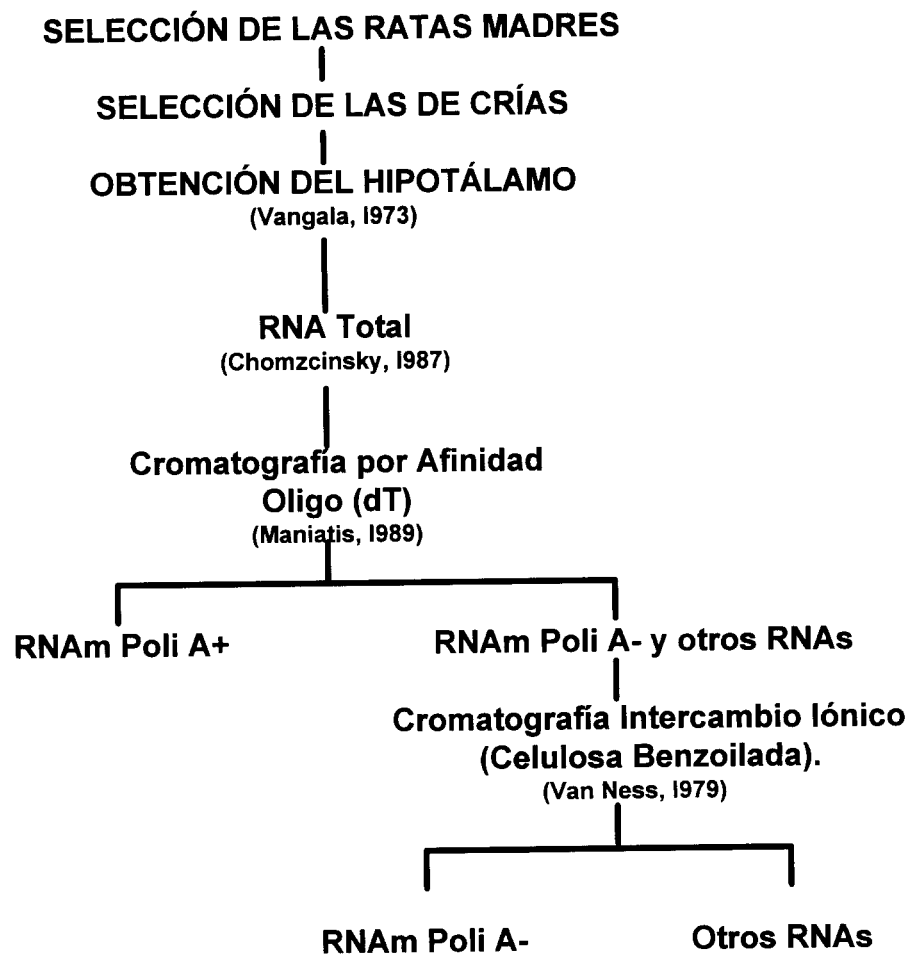
El aislamiento de los hipotálamos se efectúa a 4°C, realizando cortes a los siguientes niveles (Vangala, 1973):

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



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

**ESQUEMA DEL PROCESO METODOLOGICO PARA LA
EXTRACCIÓN DE RNAm POLI A⁺ Y POLI A⁻**



EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

(Chomczynski, 1987)

Tejido hipotalámico (100 mg) suspendido en 1ml. de Solución D
Homogeneizar y adicionar
0.1 ml. Acetato de Sodio
1.0 ml. Fenol
2.0 ml. de cloroformo-Alcohol Isoamílico

Agitar 15" vortex
Agitar 15' agitador de columpio, 4°C
Centrifugar 10 000g 20 min, 4°C

Fase Orgánica
1.0 ml. Sol. D
0.1 ml. Acetato de Sodio

Fase Acuosa*

Agitar 15" vortex
Agitar 15' agitador de columpio, 4°C
Centrifugar 10 000g 20 min, 4°C

Fase Orgánica

Fase Acuosa*

Mezclar las dos Fases Acuosas*
Agregar 1 vol. Isopropanol

Centrifugar 10 000g 20 min, 4°C

Precipitado
Disolver en 1.0 ml. Sol. D
1 vol. isopropanol

Sobrenadante

Centrifugar 10 000g 20 min, 4°C

Precipitado
ETOH 75% 2.5 vol.
(Dos veces)

Sobrenadante

METODOLOGÍA.
EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL
 (Chomczynsky, P. (1987)162:156-159.)

Reactivos

-Solución D, contiene:

Tiocianato de Guanidina 4M (Sigma Chemical Co.)
 Citrato de Sodio 25 mM pH 7.5 (Merck-Schuchardt)
 Sarcosil 0.5% (Sigma)
 2-Mercapto Etanol 0.1 M (Merck-Schuchardt)

Acetato de sodio 3M pH4 (Merck-Schuchardt)
 Fenol Saturado con agua estéril (Sigma Chemical Co.)
 (99% pureza. Se destila cada 30 días)
 Cloroformo:alcohol isoamílico 49:1 (Merck, grado analítico)

Material**Equipo**

Centrífuga Beckman Damon IEC B-204.
 Vortex
 Agitador de Columpio
 Espectrofotómetro Beckman DU 640
 Potenciómetro Beckman Expandomatic SS-2.

Cristalería

Pipetas, Tubos de 3ml. de polipropileno, puntas para pipetas de 200 y 1000 µl. matraces 250 ml. con tapón de rosca, puntas pasteur con punta roma, todo este material esta estéril, (20 min. a 15 lbs).

Los hipotálamos aislados, según la técnica descrita, se almacenan a -70°C los cuales son homogenizados. Se homogenizan en **Solución D** (Relación 1:10 p/v), en un homogenizador Potter-Elvehjem (vidrio -teflón). Los homogenizados son transferidos a tubos de polipropileno estériles y enseguida se les adicionó, en forma secuencial, los siguientes reactivos (relación a 100 mg de tejido), agitando después de cada adición:

0.1 ml. de Acetato de Sodio 3M pH4,
 1.0 ml. de fenol Saturado con agua, y
 0.2 de Cloroformo-Acohol Isoamílico.(49:1).

La suspensión final se mezcló perfectamente por 15 seg en un agitador vortex, y después se colocó en un agitador de columpio durante 15 min en la cámara fría a 4 °C. Las suspensiones se centrifugan a 10 000 g/20 min a -4°C. Después de la centrifugación, el RNA estuvo presente en la fase acuosa, mientras que el DNA y las proteínas se localizaron tanto en la interfase como en la fase orgánica, que contiene el RNA se extrajo cuidadosamente usando pipetas pasteur.

La fase orgánica es extrajo una segunda vez adicionando en forma secuencial los siguientes reactivos y agitando después de cada adición:

1.0 ml. de Solución D,
0.1 ml. de Acetato de sodio 3M pH 4.

Se agitó finalmente en vortex durante 15 seg y después 15 min en agitador de columpio en cámara fría a 4 °C . Se centrifugó a 10 000 g/20 min. a -4°C. Se extrae la fase acuosa que contiene el RNA residual que no fue extraído en la primera extracción.

Las dos fase acuosas obtenidas se reunieron, se transfirieron a un tubo estéril y se les añadió un volumen de isopropanol. La suspensión se incubo a -20 °C durante una hora. Posteriormente se centrifugo bajo las condiciones mencionadas anteriormente, y el paquete se disolvió con Solución D, y se re-precipitó con un volumen igual de Isopropanol durante 1 hora, a -20°C.

El precipitado se recuperó por centrifugación y se lavó dos o tres veces con 2.5 volúmenes de etanol al 75% recuperando el precipitado en cada ocasión por centrifugación bajo las condiciones mencionadas. El precipitado final que contiene el RNA se conservó a -70 °C hasta su utilización para el aislamiento de los diversos tipos de mensajeros.

<p style="text-align: center;">SEPARACIÓN DE RNAm Poli-A+ (Maniatis, 1989)</p>

Reactivos

Agua Estéril
Etanol (Merck)
Oligo (dT) (Sigma)

Bófer de Cargado 1X

Tris HCl 20 mM (Sigma)
NaCl 0.5M (Baker)
EDTA 1mM. (Sigma)
Sarcosil 0.1% (Sigma)

Bófer de cargado 2X

Tris HCl 40 mM (Sigma)
NaCl 1.0M (Baker)
EDTA 2mM. (Sigma)
Sarcosil 0.2% (Sigma)

Bófer de Elusión

Tris HCl 10 mM (Sigma)
EDTA 1 mM (Sigma)
Sarcosil 0.05% (Sigma)

Preparación de la Columna:

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

La columna se lava con H₂O hasta que el filtrado tenga un pH de 7.0 y se estabilizó con bófer de cargado 1X.

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

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

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

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

SEPARACIÓN DE RNAm POLI A- (Van Ness, 1979)
--

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

Preparación de la columna.

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

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS

En la fig. 1, se observa un incremento paulatino del peso corporal en las ratas controles, tanto machos como hembras. El crecimiento durante las primeras 48 horas es del 30.4% de peso a una hora. En relación con los animales tratados se observa un incremento alrededor del 35.5% en las hembras y del 34.8% en los machos.

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

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

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

En el caso de los machos tratados con tamoxifen (pseudohembras) (Fig. 3b) se observa, en primer lugar, que la concentración de RNA total es

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

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

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

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

En la figura 5 se indican las variaciones observadas en la concentración de uno de los componentes del RNAm, el RNAm poliadenilado (Poli A+). En este parámetro es posible observar una impresionante diferencia entre hembras y machos controles a las dos horas después del nacimiento,

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

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

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

machos controles es semejante a la observada a las dos horas después del nacimiento (Fig. 6a).

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

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

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

HEMBRAS CONTROL

Hora	RNA Total mg/g tej.	RNAm Total %	Poli A ⁺ ug/g Tej.	Poli A ⁻ ug/g Tej.	Poli A ⁺ /Poli A ⁻
1	3.33+/-0.8	10.7+/-1.0	299.2+/-170.0	93.9+/-39.3	3.6+/-0.9
3	3.84+/-1.1	6.8+/- 0.9	150.3+/-21.5	9.7 +/- 4.7	1.5+/-0.3
6	2.07+/-1.0	10.3+/-1.3	155.7+/-106.3	60.9+/-24.6	2.2+/-1.2
12	1.34+/-0.4	15.7+/-2.3	32.7+/-2.6	65.1+/-18.1	0.5+/-0.2
24	1.61+/-0.4	8.8+/-0.9	28.5+/-9.2	86.8+/-42.8	0.3+/-0.1
48	2.86+/-1.0	6.6+/-0.6	57.5+/-9.3	86.3+/-19.3	0.7+/-0.3

HEMBRAS TRATADAS

Hora	RNA Total mg/g tej.	RNAm Total %	Poli A ⁺ ug/g Tej.	Poli A ⁻ ug/g Tej.	Poli A ⁺ /Poli A ⁻
1	3.10 +/- 0.8	6.8+/-0.9	126.8 +/- 38.8	35.3 +/- 8.3	3.9+/-2.4
3	2.31 +/- 0.9	7.3+/-1.0	100.5 +/- 27.7	98.9 +/- 12.7	1.0+/-0.2
6	2.40 +/- 0.6	15.8+/-1.2	194.6 +/- 44.5	151.2 +/- 35.3	1.3+/-0.4
12	2.73 +/- 0.3	18.4+/-1.4	104.1 +/- 22.8	100.8 +/- 37.0	1.1+/-0.6
24	2.37 +/- 0.4	6.0+/-0.5	67.3 +/- 21.9	87.9 +/- 9.7	0.8+/-0.3
48	1.96 +/- 0.7	8.7+/-0.7	41.6 +/- 9.4	62.1 +/- 19.6	0.7+/-0.3

MACHOS CONTROL

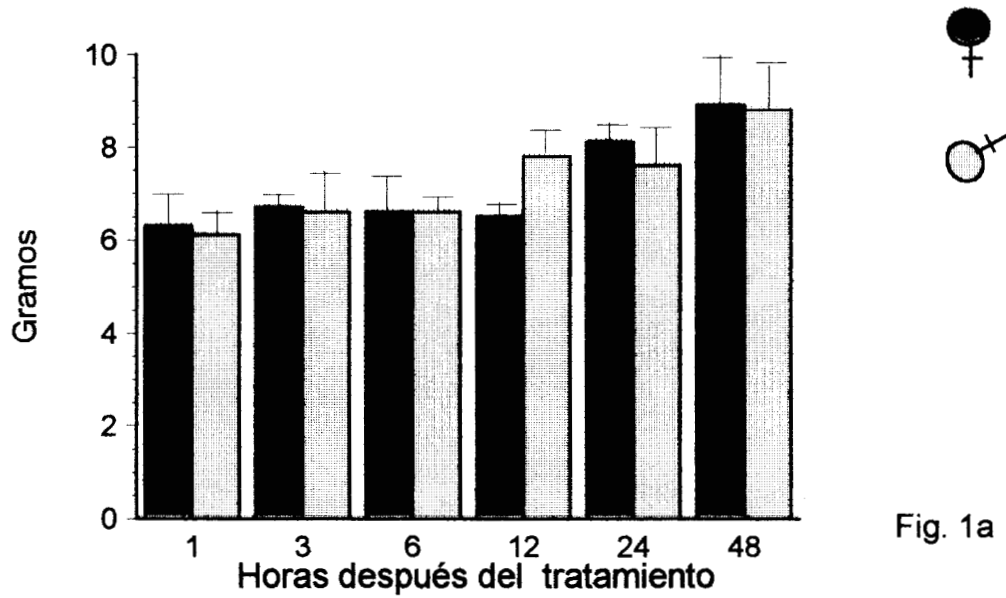
Hora	RNA Total mg/g tej.	RNAm Total %	Poli A ⁺ ug/g Tej.	Poli A ⁻ ug/g Tej.	Poli A ⁺ /Poli A ⁻
1	1.42 +/- 1.4	10.1+/-0.1	47.8 +/- 19.8	50.1 +/- 27.8	0.8+/-0.3
3	2.22 +/- 0.5	7.3+/-0.4	90.7 +/- 22.6	80.5 +/- 38.8	1.2+/-0.6
6	2.31 +/-0.3	4.9+/-0.8	77.6 +/- 6.5	67.3 +/- 23.2	1.2+/-0.5
12	2.89 +/- 1.8	6.9+/-0.4	140.0 +/- 82.0	97.4 +/- 1.4	1.4+/-0.8
24	1.79 +/- 0.8	6.9+/-0.6	26.5 +/- 9.2	45.9 +/- 15.2	0.6+/-0.1
48	3.68 +/- 0.9	8.4+/-1.0	119.2 +/- 42.5	108.0 +/- 23.4	1.2+/-0.5

MACHOS TRATADOS

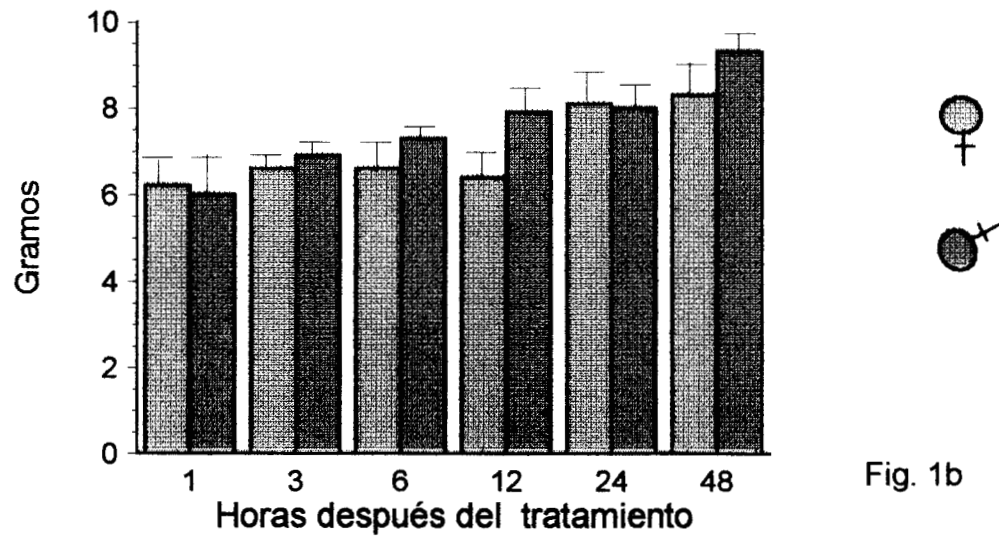
Hora	RNA Total mg/g tej.	RNAm Total %	Poli A ⁺ ug/g Tej.	Poli A ⁻ ug/g Tej.	Poli A ⁺ /Poli A ⁻
1	2.95 +/- 0.6	13.1+/-1.0	202.9 +/- 106.3	105.8 +/- 10.7	2.6+/-0.7
3	2.44 +/- 1.6	6.3+/-0.6	73.6 +/- 23.0	67.7 +/- 17.1	1.0+/-0.2
6	2.20 +/- 0.4	9.5+/-0.8	158.2 +/- 33.4	87.1 +/- 17.2	1.8+/-0.3
12	2.27 +/- 0.8	9.1+/-0.9	103.4 +/- 12.0	68.6 +/- 47.9	1.5+/-0.5
24	1.64 +/- 0.7	7.4+/-0.7	42.9 +/- 5.2	99.0 +/- 29.8	0.5+/-0.2
48	2.77 +/- 0.6	9.4+/-0.9	96.7 +/- 2.5	111.8 +/- 26.2	0.9+/-0.2

PESO CORPORAL

Control



Tratados



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

PESO DE LOS HIPOTALAMOS

Controles

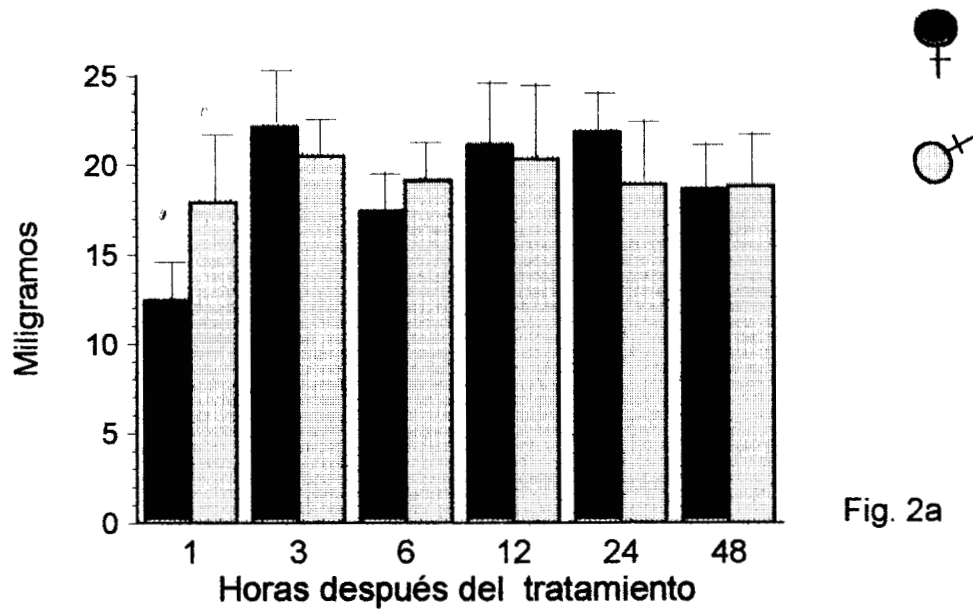


Fig. 2a

Tratados

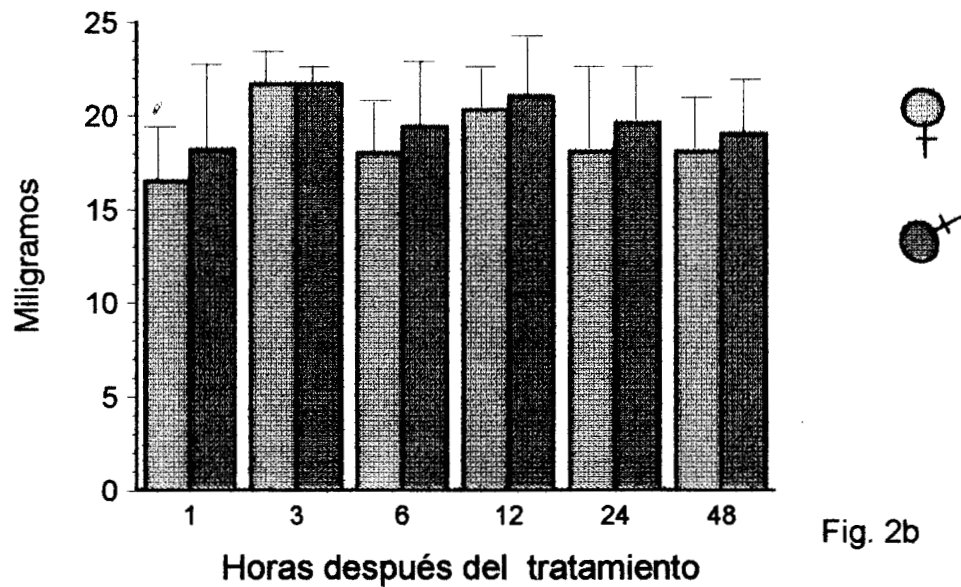
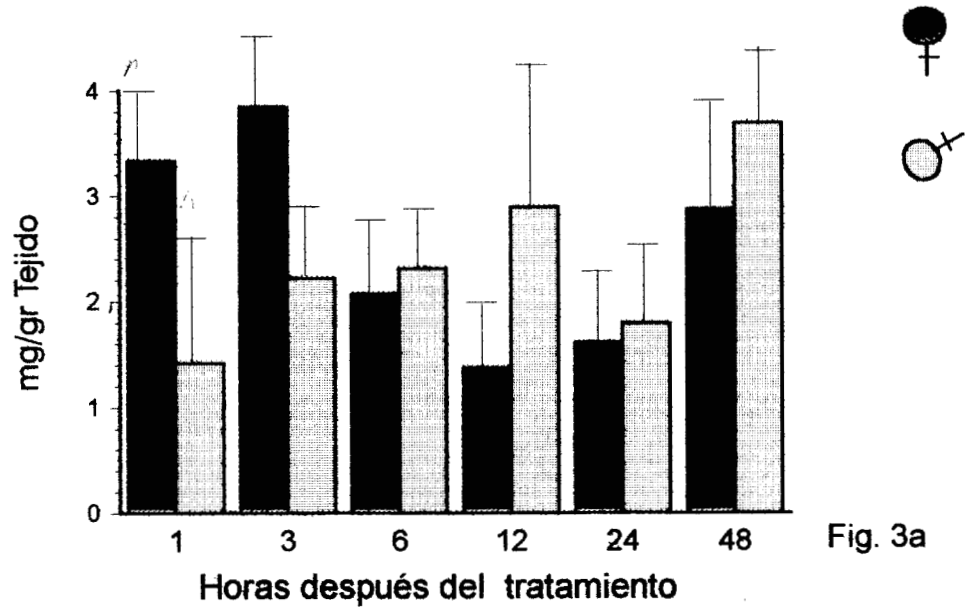


Fig. 2b

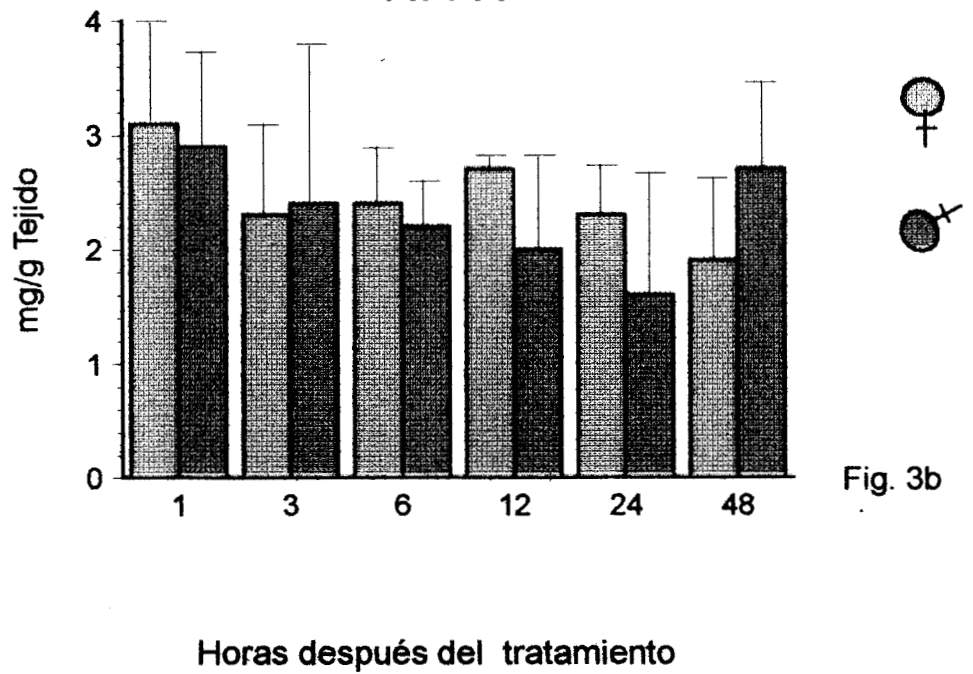
Cada barra representa el promedio de 4 determinaciones.
Cada determinación consta de 4-10 hipotálamos en cada poza.

RNA TOTAL

Controles



Tratados



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

RNAm TOTAL

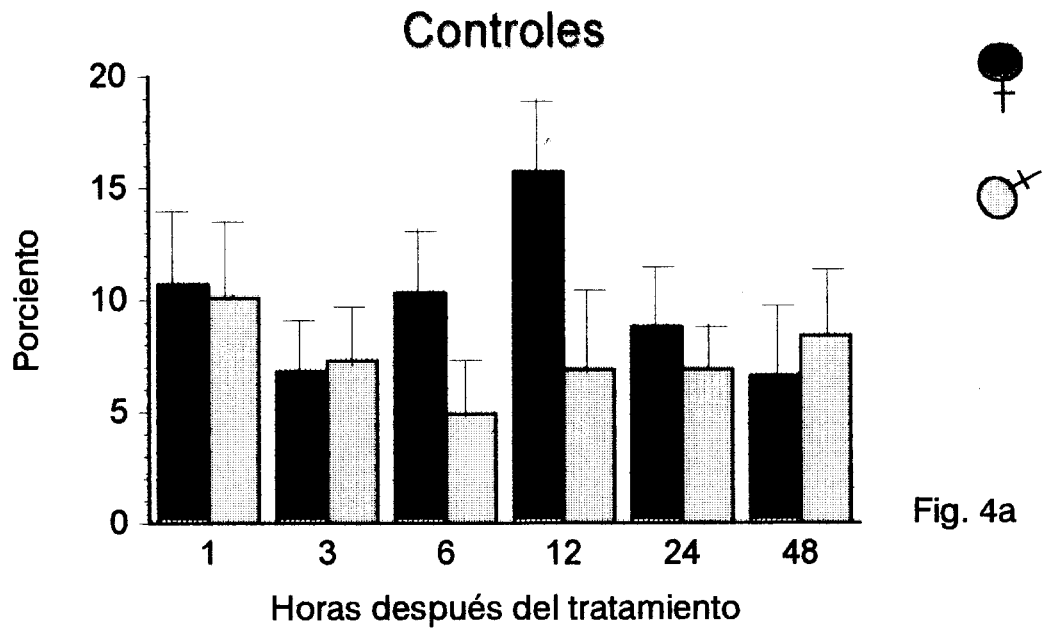


Fig. 4a

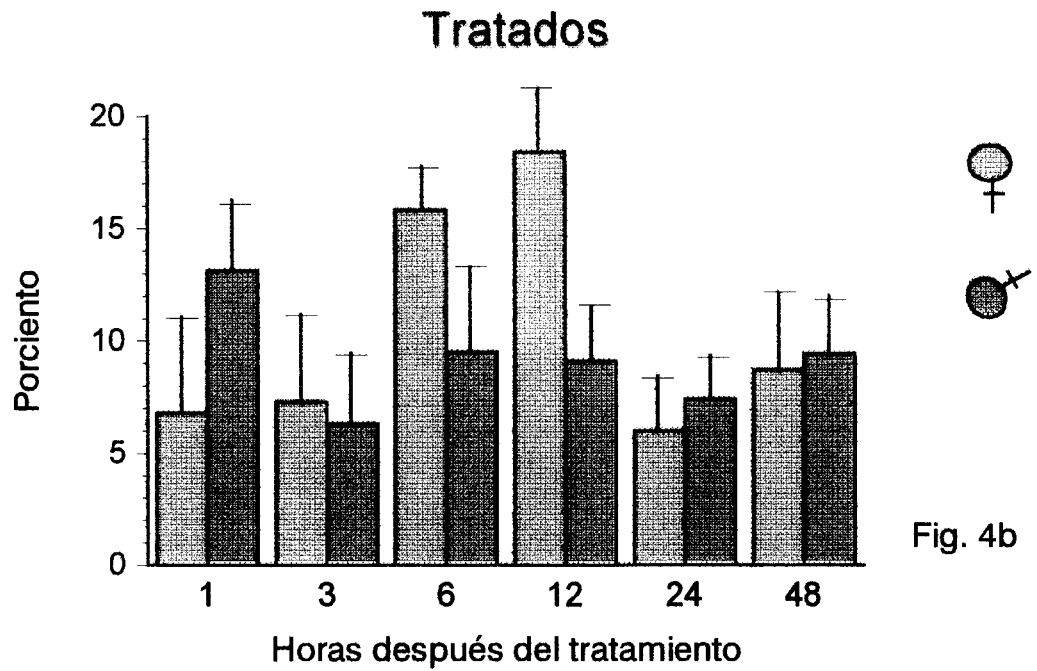


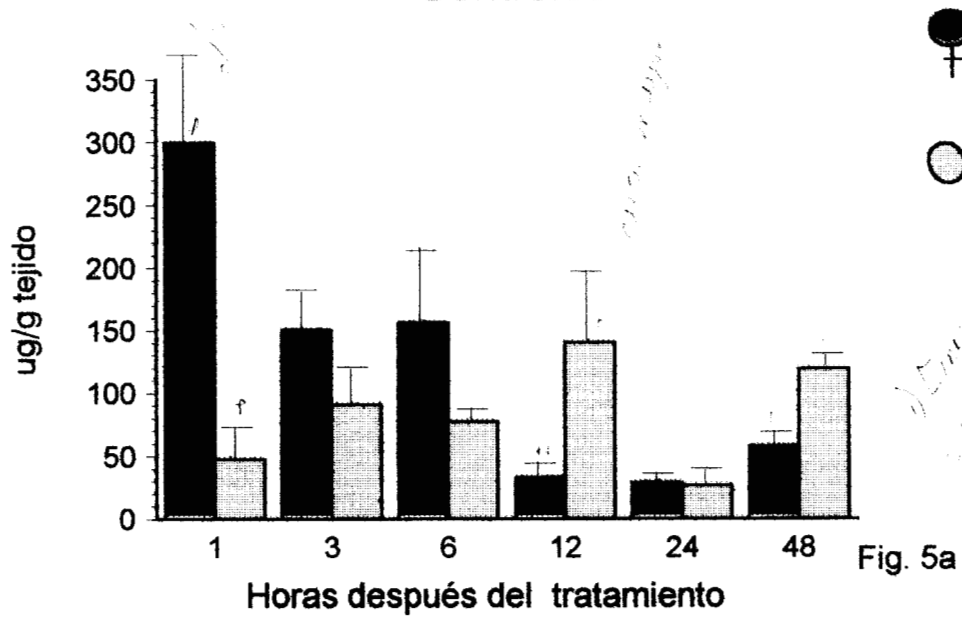
Fig. 4b

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

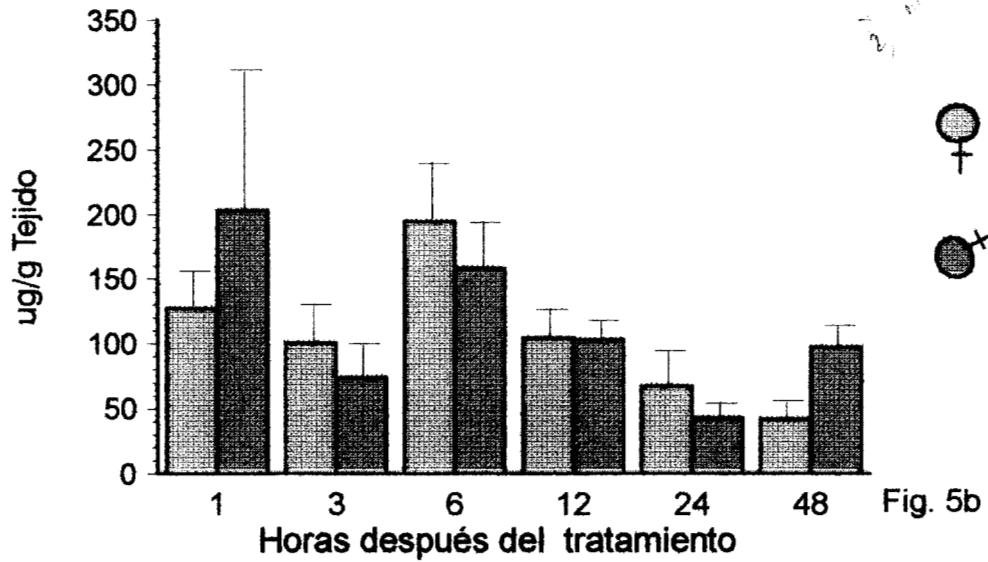
Poli A+

Controles

222269



Tratados



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

Poli A-

Controles

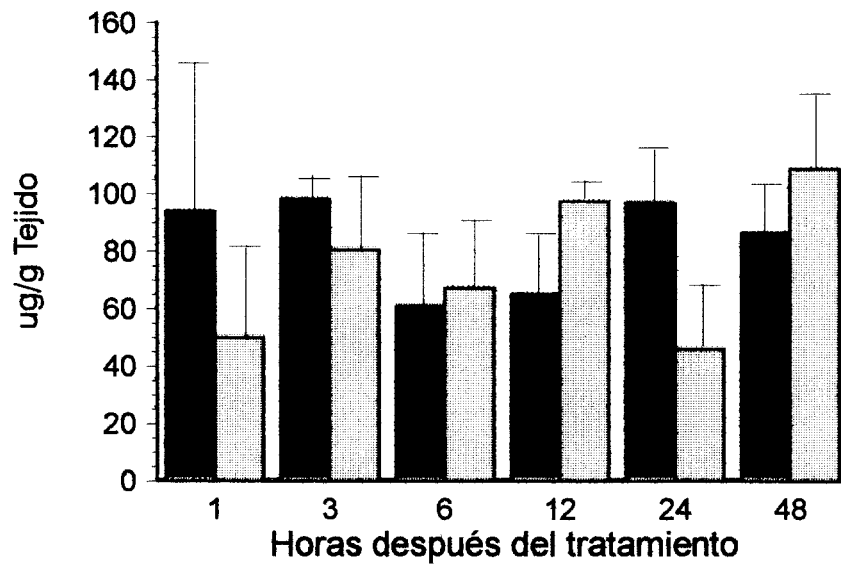


Fig. 6a

Tratados

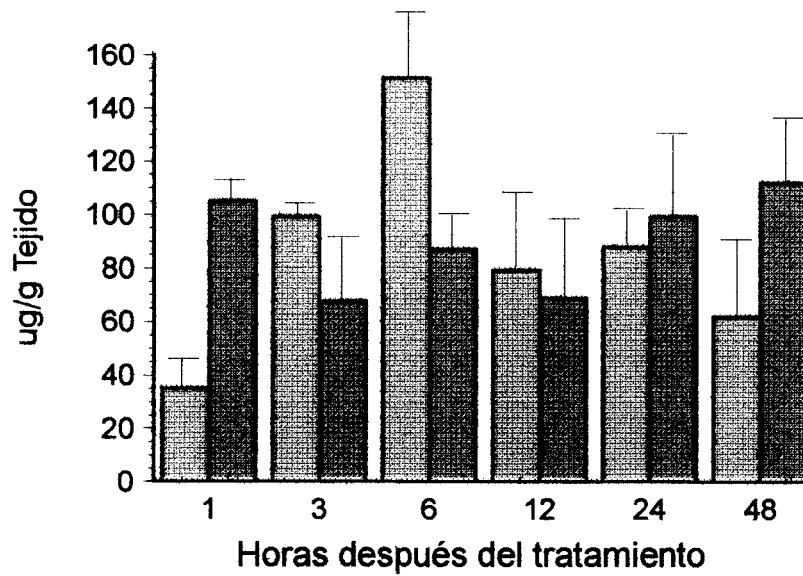


Fig. 6b

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

Poli A+ y Poli A-

CONTROLES

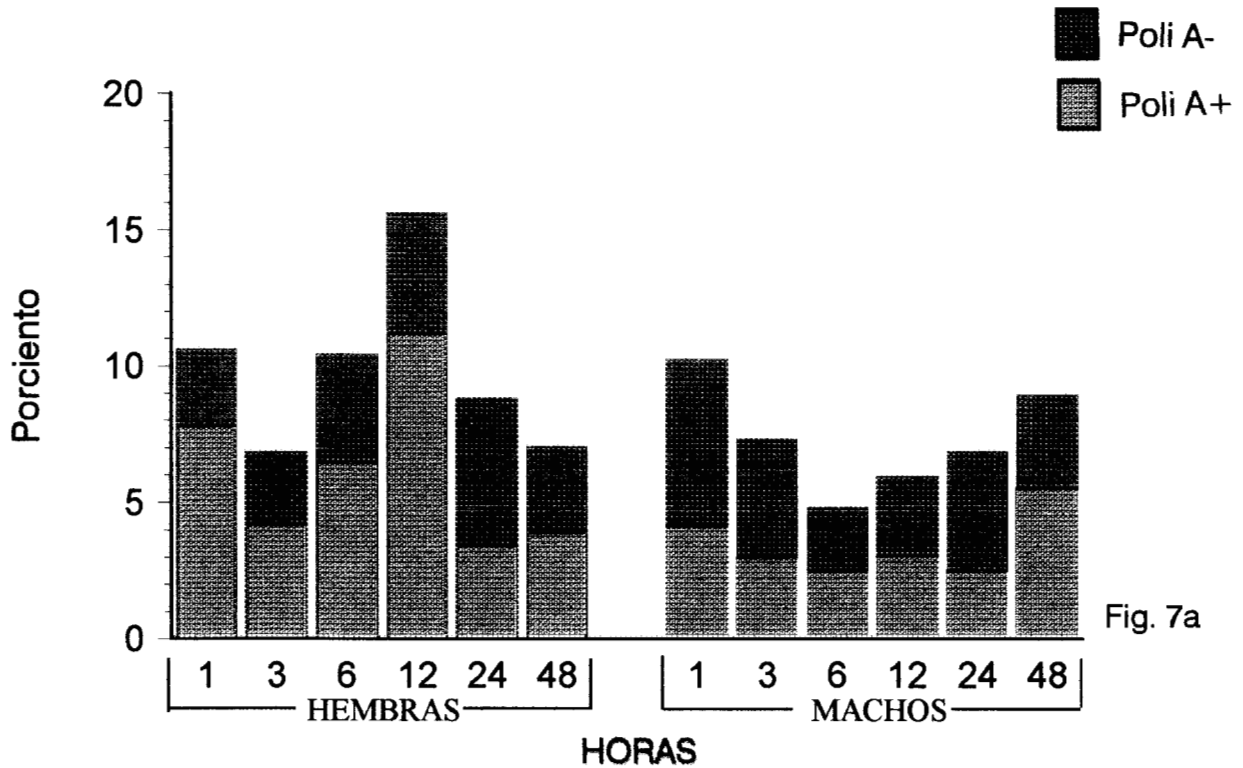


Fig. 7a

TRATADOS

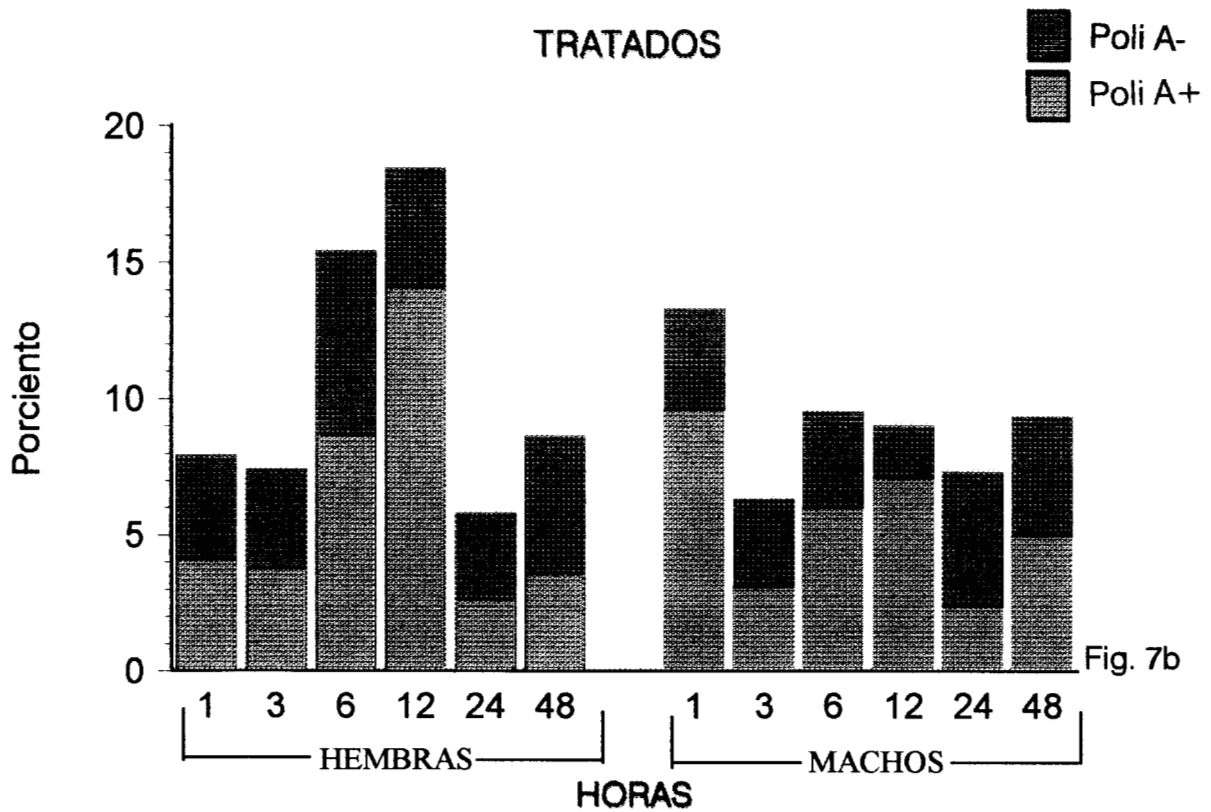


Fig. 7b

DISCUSION

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

El tratamiento postnatal con tamoxifen interfiere con el crecimiento y diferenciación del SDN-POA. Se ha observado que la aplicación de 10 - 100 μg de tamoxifen reduce el volumen del SDN-POA de un 26 a un 40% en la rata macho. Pero no sólo se ve afectado el macho, sino también la hembra. Se ha visto que el tratamiento postnatal con tamoxifen induce esterilidad anovulatoria en forma permanente, en la hembra, además de la reducción en el volumen del SDN-POA.

Ha sido demostrado que el tamoxifen en el organismo adulto se une a receptores estrogénicos intracelulares, previniendo que estos sean ocupados por el estradiol. El tamoxifen actúa en forma similar en el organismo en desarrollo (Döhler, 1984). Después de la aromatización de andrógenos testiculares a estrógenos, el tamoxifen impide que se forme el complejo receptor estrógenos, de esta manera, en presencia de tamoxifen, los estrógenos no serían capaces de interaccionar con sus receptores específicos intracelulares y consecuentemente no podrían tener ninguna actividad sobre la síntesis de macromoléculas en el núcleo de las células que componen el SDN-POA. El efecto inhibitorio del tamoxifen en la vida postnatal sobre el desarrollo y diferenciación del SDN-POA en ratas macho parece efectuarse por su actividad sobre dos puntos claves del metabolismo hormonal en el hipotálamo: se realiza mediante un efecto inhibitorio sobre la aromatasa, impidiendo la aromatización de los andrógenos testiculares a estrógenos y fundamentalmente, interfiriendo

con la subsecuente interacción de estos estrógenos con el material nuclear (Döhler, 1984).

El efecto desfeminizante de la acción de los antagonistas estrogénicos sobre la diferenciación de las funciones sexuales cerebrales, podría atribuirse a una posible actividad estrogénica de estos compuesto (Arnold y Gorski, 1984). Sin embargo, se ha visto, que los estrógenos perinatales estimulan la diferenciación del SDN-POA en ratas hembras, mientras que el tamoxifen inhibe su diferenciación (Döhler, 1984), por lo cual parece claro que el tamoxifen no actúa como estrogénico sobre la diferenciación del SDN-POA. Así mismo se ha demostrado que el tratamiento postnatal de ratas hembras con tamoxifen, inhibe la diferenciación de los modelos de conducta sexual femenina, pero sin inducir la aparición de los modelos conductuales sexuales del macho.

El tamoxifen, puede tener influencia sobre el desarrollo y la diferenciación del SDN-POA, vía una acción directa sobre el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, no se ha podido demostrar que el tamoxifen tenga un efecto tóxico. En estudios realizados por Döhler (1984) para tratar de demostrar el posible efecto tóxico general del tamoxifen sobre el sistema nervioso, se tomaron como control los núcleos supraquiasmáticos, los cuales no se ve afectado por el tratamiento con este agente. Así, la influencia inhibitoria de este antagonista sobre el SDN-POA en áreas cerebrales en donde se conoce la sensibilidad a estrógenos, parece deberse a una interferencia local con la actividad estrogénica (Döhler, 1984 b).

Según estudios realizados por Döhler (1986), en los cuales ratas hembras embarazadas fueron tratados con tamoxifen a dosis de 200 μg diarios a partir del día 16 de gestación, y al finalizar el embarazo las crías se tratan con 10 μg de tamoxifen durante diez días, el tratamiento pre y postnatal de ratas machos con tamoxifen, reduce el peso corporal y el peso testicular, pero no influye sobre el peso del cerebro en general. Los testículos de estos animales fueron pequeños y flácidos, y en la edad adulta, no mostraban la presencia de espermatozoides. Nuestros resultados, con respecto al peso corporal, muestran que una sola dosis de tamoxifen es capaz de provocar un retardo pequeño, pero evidente, en el crecimiento ponderal de los machos observable ya después de 48 horas de la aplicación del fármaco. Este efecto no es encontrado en las hembras, en donde se observa un crecimiento que no es estadísticamente diferente del registrado en el caso de las hembras controles (Fig. 1a y b). Con respecto

al peso de los hipotálamo en los animales de 48 horas de edad, no se encontraron diferencias significativas en ningún de los grupos estudiados.

Los esteroides gonadales, principalmente los estrógenos, participan activamente en la regulación de muchas funciones cerebrales y se ha descrito la presencia de células con receptores estrogénicos específicos en numerosas regiones del encéfalo (Pelletier y col, 1988). Particularmente en el hipotálamo se ha descrito la eficiente capacidad de los estrógenos para inducir la síntesis de varias especies de proteínas importantes, entre ellas las llamadas proteínas reguladoras PR y c-fos, algunas enzimas que son pasos limitantes en caminos metabólicos indispensables para el buen funcionamiento del hipotálamo, como la tirosina hidroxilasa, la síntesis de algunos otros neurotransmisores como la neurotensina y la neuromedina, la somatostatina, la hormona liberadora de la GnRH (proGnRH-GAP), la proencefalina, así como la síntesis de varios receptores, entre ellos del receptor a la oxitocina, a la progesterona y, probablemente, a los andrógenos (Law y col, 1994).

Morfológicamente, 30% de las neuronas pertenecientes al núcleo ventromedial del hipotálamo respondieron a la estimulación con estrógenos mostrando un aumento significativo en todos los componentes celulares, núcleo, nucleolo y soma celular, un incremento notable en la cantidad de retículo endoplásmico y en el número de polirribosomas, indicadores de una aceleración en el metabolismo celular y particularmente en la síntesis de proteínas (Carrer y Aoki, 1982). Las hormonas sexuales parecen participar en el crecimiento neurítico y en la sinaptogénesis de las regiones cerebrales que muestran receptores específicos para estas hormonas, sobre todo en la etapa prenatal, aunque también se ha referido esta actividad remodeladora de la sinápsis en algunas regiones del cerebro adulto, tales como el núcleo arqueado y el ventro-medial del hipotálamo (Milner, 1988; Lustig, 1993; Law, 1994).

Algunas proteínas que se han asociado con la modulación del crecimiento neuronal y con la sinaptogénesis (GAP-43, SCG-10 y SNAP-25) muestran dimorfismo sexual en la rata recién nacida siendo más activas en el macho que en la hembra (Relación M/H= 1.76 para GAP-43, 1.46 para SCG-10 y 1.44 para SNAP-25). En el macho recién nacido que es tratado con inhibidores de la aromatasa o con antagonistas de los estrógenos, como el tamoxifen, se encontró una disminución del 30% en los niveles de RNA mensajero que codifican para la síntesis de estas tres proteínas reguladoras del crecimiento dando niveles intracelulares semejantes a los

al peso de los hipotálamo en los animales de 48 horas de edad, no se encontraron diferencias significativas en ningún de los grupos estudiados.

Los esteroides gonadales, principalmente los estrógenos, participan activamente en la regulación de muchas funciones cerebrales y se ha descrito la presencia de células con receptores estrogénicos específicos en numerosas regiones del encéfalo (Pelletier y col, 1988). Particularmente en el hipotálamo se ha descrito la eficiente capacidad de los estrógenos para inducir la síntesis de varias especies de proteínas importantes, entre ellas las llamadas proteínas reguladoras PR y c-fos, algunas enzimas que son pasos limitantes en caminos metabólicos indispensables para el buen funcionamiento del hipotálamo, como la tirosina hidroxilasa, la síntesis de algunos otros neurotransmisores como la neurotensina y la neuromedina, la somatostatina, la hormona liberadora de la GnRH (proGnRH-GAP), la proencefalina, así como la síntesis de varios receptores, entre ellos del receptor a la oxitocina, a la progesterona y, probablemente, a los andrógenos (Law y col, 1994).

Morfológicamente, 30% de las neuronas pertenecientes al núcleo ventromedial del hipotálamo respondieron a la estimulación con estrógenos mostrando un aumento significativo en todos los componentes celulares, núcleo, nucleolo y soma celular, un incremento notable en la cantidad de retículo endoplásmico y en el número de polirribosomas, indicadores de una aceleración en el metabolismo celular y particularmente en la síntesis de proteínas (Carrer y Aoki, 1982). Las hormonas sexuales parecen participar en el crecimiento neurítico y en la sinaptogénesis de las regiones cerebrales que muestran receptores específicos para estas hormonas, sobre todo en la etapa prenatal, aunque también se ha referido esta actividad remodeladora de la sinápsis en algunas regiones del cerebro adulto, tales como el núcleo arqueado y el ventromedial del hipotálamo (Milner, 1988; Lustig, 1993; Law, 1994).

Algunas proteínas que se han asociado con la modulación del crecimiento neuronal y con la sinaptogénesis (GAP-43, SCG-10 y SNAP-25) muestran dimorfismo sexual en la rata recién nacida siendo más activas en el macho que en la hembra (Relación M/H= 1.76 para GAP-43, 1.46 para SCG-10 y 1.44 para SNAP-25). En el macho recién nacido que es tratado con inhibidores de la aromatasa o con antagonistas de los estrógenos, como el tamoxifen, se encontró una disminución del 30% en los niveles de RNA mensajero que codifican para la síntesis de estas tres proteínas reguladoras del crecimiento dando niveles intracelulares semejantes a los

observados en las ratas hembras controles. El descenso en la concentración de estos mensajeros fue notable sobre todo alrededor del día 2 después del nacimiento. Estos resultados están de acuerdo con los nuestros en mostrar dimorfismo sexual en los niveles de RNA mensajero, susceptibles de ser modificados por el tratamiento hormonal adecuado.

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

Se han descrito cambios en la distribución de mRNA del cerebro de rata en especial en el área preóptica e hipotalámica (Mouri-Yamada, 1994). Según este investigador, los niveles aumentan en dos ocasiones: el primer aumento claro ocurre en la etapa post-embionaria (18-20 días del embarazo) y el segundo después del nacimiento, alcanzado en este caso el máximo nivel a los 2 días, a este último aumento sigue una notable disminución en los niveles de RNAm que comprende 4 a 8 días postnacimiento en las ratas hembras (Mouri-Yamada, 1994). En nuestros experimentos (Fig 4) la máxima concentración de RNAm ocurre en las hembras alrededor de las 12 horas después del nacimiento y es seguido de una notable disminución que continúa hasta las 48 horas. La conducta es totalmente diferente en el macho. En este caso la concentración de RNAm es prácticamente invariable desde una hora post-nacimiento hasta 48 horas después, existiendo una concentración significativamente mayor, desde el punto de vista estadístico, inmediatamente después del nacimiento (Fig.4).

A este respecto es importante mencionar los resultados obtenidos por Law y col. (1994) quienes encontraron que la activación de genes hipotalámicos por estradiol en la rata hembra alcanzó la cifra récord de 21 nuevos RNA mensajeros. Esta cantidad de nuevos RNAm inducidos constituye una cifra récord para cualquier otro tipo de tejido o cualquier otro tipo de hormona. Muchos de estos mensajeros mostraron una sorprendente magnitud de inducción y sus niveles inducidos se mantuvieron estables durante un tiempo prolongado. Entre los genes activados, varios correspondieron a la producción de enzimas importantes en el metabolismo celular y pueden fácilmente explicar algunos de los

cambios morfológicos observados en las neuronas hipotalámicas estimuladas por esta hormona.

Es notable mencionar que en el caso de las hembras tratadas con testosterona el patrón de modificación de las concentraciones de RNAm únicamente sufre modificaciones importantes una hora post-tratamiento, en cuyo caso la concentración de RNAm es prácticamente la mitad de la concentración encontrada en este tiempo en las hembras controles. En los machos, por el contrario, el tratamiento con tamoxifen muestra aumentos en la concentración de RNAm a las 6 y a las 12 horas post-tratamiento tendiendo a simular el patrón encontrado en las hembras control, sin llegar en ningún caso a mostrar incrementos tan notables en la concentración de mensajeros. Sería posible concluir, de estos resultados, que, en el caso de los machos normales, las principales modificaciones en la síntesis de proteínas específicas deben ocurrir de manera muy temprana después del nacimiento, mientras que en las hembras estos cambios ocurren un poco más tardíamente, entre las 7 y las 12 horas post-nacimiento.

Los cambios observados en nuestro trabajo en la concentración de mensajeros pueden también ser correlacionados con las observaciones de Lustig y col (1993) y Law y col (1994) que muestran que la presencia de diferentes RNAm específicos muestra modificaciones especiales para cada una de las proteínas, así por ejemplo, Lustig y col (1993) señalan que los niveles de RNAm del núcleo ventro-medial que codifican para la GAP43 muestran un aumento notable alrededor del tiempo señalado como el periodo crítico de la diferenciación sexual y después disminuyen rápidamente con la edad, mientras que los que codifican para la SNAP-25 disminuyen primero y luego aumentan. El RNAm que sirve como templado para la síntesis de la SCG-10 permanece relativamente constante a través de todo el desarrollo postnatal.

Algunos de nuestros resultados parecen apoyar la idea de que el sexo que se diferencia podría ser el femenino. Estos resultados parecen estar en contradicción con la idea, sostenida por varios de los grupos que se ocuparon inicialmente del estudio de la diferenciación sexual hipotalámica, de que el sexo que se diferencia es el masculino, mientras que si el organismo no experimental ninguna influencia exterior tiende a permanecer inminentemente femenino.

Sin embargo, recientemente algunas evidencias parecen apoyar la idea de que el individuo que se diferencia activamente es el femenino, o bien que,

por lo menos, los dos sexos deben ser susceptibles a efectores característicos. Por ejemplo, DonCarlos y Handa (1994) estudiaron el patrón de desarrollo del RNA mensajero que codifica para el receptor estrogénico en el área preóptica de la rata recién nacida encontrando que: a) el gene que codifica para la síntesis del mensajero es transcrito activamente durante todo el periodo neonatal. b) existe un evidente dimorfismo sexual en la expresión del mensajero el cual presenta las siguientes características: la cantidad de RNAm para el receptor estrogénico es significativamente mayor en las hembras que en los machos en los días 2, 4 y 7 después del nacimiento. La densidad de hibridización fue 2 a 3 veces mayor en las hembras que en los machos. Mientras que la cantidad de este mensajero en el área preóptica se mantuvo constante durante el periodo estudiado en los machos, las hembras presentaron una elevación significativa e importante de la expresión del gene en el día 2 de la vida extrauterina, seguida de un descenso hasta su nivel más bajo en el día 10.

Anteriormente, estudiando la fijación de estrógenos en bloques del hipotálamo y del área preóptica, se había encontrado un rápido aumento en la fijación del esteroide entre los días 2 y 4 después del nacimiento, que era, aparentemente, de la misma magnitud en ambos sexos o mayor en el macho que en la hembra (Vito y Fox, 1982). Nuestros resultados (Fig. 4) se encuentran más de acuerdo con la evidencia presentada por DonCarlos y Handa (1994).

Las moléculas de RNA transcritas directamente del DNA por la actividad de la RNA polimerasa II, deben sufrir una serie de transformaciones importantes antes de ser transportadas del núcleo al citoplasma de la célula. En el caso del RNA mensajero, se ha descrito que la gran mayoría de los pre-mensajeros inmediatamente después de su síntesis deben experimentar un proceso de maduración que comprende el bloqueo del extremo 5' (capping), el corte y supresión de las regiones que provienen de las regiones sin código del DNA (intrones) y la unión de las secuencias resultantes, proceso que en conjunto recibe el nombre de edición ("splicing") y finalmente la adición de numerosas moléculas de adenosina, poliadenilación, en el extremo 5'-terminal de la molécula.

Se ha establecido que la importancia de la cola de poli A de los RNAm de células eucarióticas, radica en:

a).- Transporte del mensajero del núcleo al citoplasma

- b).- Control de la estabilidad del RNAm
- c).- Compartimentalización del RNAm en el citoplasma y su asociación con el citoesqueleto.
- d).- Como posible mecanismos de regulación de la traducción del mensajero

Durante el transporte del mensajero al citoplasma, la cola de poli-A parece sufrir un ligero acortamiento pero todavía muestra una pequeña distribución en tamaño. Así, la longitud, llega a ser más corta y mas heterogénea, probablemente porque el porcentaje de los diferentes cortes, difiere por las especies de RNAm. Se han observados algunos casos de RNAm que sufre alargamiento de su cadena de poli A, en algunas células somáticas, en el citoplasma (readenilación).

Las colas de poli (A) de ciertos mRNAs son prolongados mientras que las colas de otros mRNA son eliminadas. La adición selectiva de poli (A) es regulada por una secuencia corta en la región 3' sin traducir (Pandey, 1987), mientras que la eliminación de poli (A) de mRNAs específicos es un "estado de falla" en la que se encuentran ausentes estas secuencias específicas. Se ha postulado que estos cambios regulados en la longitud del poli(A) juegan un papel importante en la regulación de la traducción del mensajero (Wickens, 1990).

El mecanismo de transporte de los Poli A+, es modulado por la actividad de la NTPasa, asociada al complejo nuclear, sin embargo, el RNA poli A-, no esta asociado a dicho complejo, por lo que inicialmente, se sugirió que los Poli A- estaban restringidos exclusivamente al núcleo. Sin embargo, la demostración de que en el cerebro las poblaciones de Poli A- corresponden alrededor de un 50% del total de RNAm o aún más, dependiendo del sexo y el día del desarrollo (Fig.7), no apoya esta idea y, por el contrario, requiere de una explicación acerca del mecanismo por el cual este tipo de mensajeros sufren su exportación fuera del núcleo. Se ha sugerido, que el transporte de los mensajeros no poliadenilados, sea un mecanismo específico del tejido neural, ya que la actividad de la NTPasa, disminuye significativamente en la etapa postnatal, tan pronto como aumentan los RNA Poli A-. Además se ha demostrado que la estabilidad de estos mensajeros no se encuentra drásticamente afectada, ya que muchos de ellos pueden estar presentes en el citoplasma por varios días (Schröder, 1987).

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

Aún ahora, veinticinco años después de su descripción inicial, todavía no se tiene una idea cierta acerca de la importancia *in vivo* de la cola de Poli(A) que se añade a los mensajeros como parte de su proceso de maduración. Se ha sugerido que la riqueza en Poli(A) es crítica durante el mecanismo de transporte núcleo-citoplásmico, o bien como un mecanismo de estabilización de la molécula (Bernstein, 1989) o, aún, que es indispensable durante el mecanismo de traducción del mensajero (Wickens,1990). Sin embargo todo esto tiene que ser comprendido en presencia de la evidencia de que RNAm no poliadenilados, funcionales, parecen ser importantes para el metabolismo de algunos tejidos.

El RNA mensajero poliadenilado parece formar un complejo específico con la proteína llamada por este hecho proteína fijadora del Poli-A PABP (Poly-A binding protein), cuya presencia es esencial para la viabilidad de algunos organismos como la levadura de cerveza (*S. cerevisiae*). La importancia de esta interacción ha sido señalada en varios aspectos del metabolismo del RNAm, incluyendo su estabilidad, la biogénesis del ribosoma y el proceso mismo de biosíntesis de proteínas (Görlach,1994). Se ha descrito, sin embargo, que la PABP posee cuatro regiones de fijación de RNA, de las cuales solo dos muestran alta afinidad por la cola de Poli(A) del mensajero, por lo cual es posible que las otras dos regiones de fijación puedan interactuar con otras secuencias del mensajero diferentes de la

región de poli(A), sugiriéndose (Görlach et al, 1994), que esta proteína pueda ejercer, in vivo, funciones de regulación de la transcripción hasta ahora desconocidas mediante su interacción con moléculas de mensajero desprovistas de la cola de Poli(A).

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

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

Se sabe que la mayor cantidad de RNAm Poli(A)- aparece en el tejido cerebral de manera post-natal y que el número, variedad y complejidad de esta población de mensajeros aumenta con la edad, alcanzando un máximo a los 30-45 días después del nacimiento (Chaudhari y Hahn, 1983). A pesar de que este tipo de mensajeros ha sido utilizado en la generación de cDNA (Hahn, 1983; Brilliant et al, 1984) su función específica es todavía desconocida (Milner, 1987) y las proteínas que son codificadas por este importante material genético no han podido ser caracterizadas en su totalidad.

En relación a estos puntos es importante discutir la evidencia reciente de que algunas hormonas esteroides no solo funcionan como inductoras de mensajeros específicos a nivel nuclear, sino que también tienen una función como reguladoras de la estabilidad y la degradación de un número importante de RNA mensajeros. La administración de estrógenos induce la estabilización del mensajero que codifica para la vitelogenina en las aves. La supresión de la hormona conduce a la rápida degradación del mensajero. Se ha demostrado que la presencia de corticoides es indispensable para la estabilidad del mensajero que codifica para la hormona de crecimiento en el humano, y se ha descrito que esta estabilización se debe a un aumento en la longitud de la cola de Poli(A) del RNAm (Nielsen y Shapiro, 1990). También es importante mencionar que el mensajero que codifica para la síntesis de albúmina en el *Xenopus* y que es desestabilizado por la presencia de estrógenos, posee una cadena terminal muy corta de Poli(A) (Reigel et al, 1986).

Estos hallazgos hacen particularmente importantes las diferencias en la proporción de RNA mensajero Poli(A)+ / Poli(A)- (Fig.), que parece ser característica de hembras y machos durante las horas iniciales, 2 a 13, después del nacimiento, sobre todo porque el patrón característico de cada sexo tiende a ser modificado por el tratamiento hormonal, de manera de semejar el del sexo contrario (Fig.), siendo esta una evidencia clara del papel del ambiente hormonal sobre la constitución macromolecular de las células hipotalámicas.

En suma, el dimorfismo sexual en los parámetros cuantificados por nosotros en este trabajo y sus modificaciones con el tratamiento hormonal son consistentes con la hipótesis de desfeminización y masculinización y constituyen una de las primeras evidencias de alteraciones moleculares relacionadas con el fenómeno de diferenciación sexual hipotalámica. La relación mostrada por nuestros datos y la encontrada por Lustig y col (1993) en relación a la síntesis de las proteínas llamadas GAP-43 y SNAP-25 muestran que algunos de los parámetros señalados en este trabajo son de la mayor importancia en la determinación de la organización neuronal y en la remodelación del patrón sináptico que forma la base de este proceso dimórfico de diferenciación hipotalámica.

BIBLIOGRAFIA

Alexander, M. J., Koraly, Z. J., Leeman, S. E. Sexually dimorphic distribution of neurotensin/neuromedin N mRNA in the rat preoptic area. *J. Comp. Neurol.* (1991)311:84-96.

Altman, J., and Bayer, S. Development of the diencephalo of the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* (1978a) 182:945-972.

Altman, J. and Bayer, S. Development of the diencephalo in the rat: II. correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J. Comp. Neurol.* (1978b) 182:973-994.

Ani, M., Butterworth P., and Thomas, P.T. Effect of estradiol on neurotransmitter Sensitive adenilate cyclase, its possible role in "Sexual Differentiation". *Brain Res.* (1980)183:341-353.

Arnold, A. P. and Gorski, R. A. , Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, (1984)7:413-442.

Arnold, A. and Breedlove M. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a Reanalyzes. *Horm. and Behav.* (1985)19:469-498.

Baer, B. W., and Jornberg, R. D. The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poli (A)-ribonucleic protein. *J. Cell. Biol.* (1983)96:717-721.

Barr , G. A., Gibbons, J. L. and Moyer, K. E. Male-female differences and the influence of neonatal and adult testosterone on intraspecies aggressions in rats. *J. Comp. Physiol.*(1976)90:1169-1183.

Barraclogh, C. A. (1967). Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. in Neuroendocrinology, L. Martini, W. F. Ganong (Eds) Vol. II *Academic Press. New York and London, 61-99*

Barraclogh, C. A. and Gorski, R. A. Evidence that the hypothalamuses responsible for androgen-induced sterility the female rat. *Endocrinology.*(1961)68:68-79.

Beach F. A. Hormonal modification of sexually dimorphic behavior. *Psychoneuroendocrinol.* (1974)1:3-23

Beach, F. A. (1976) Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in the female mammals. *Horm. Behav.* (1976)7:105-138.

Beatty, W. W., Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and activational influences. ***Horm. Behav.* (1979)12:112-118.**

Bernstein, P., Peltz, S. W. and Ross, J. The poli (A)-poli (A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. ***Molec. Cel. Biol.*(1989)9:659-670**

Booth, J. E. Sexual behaviour of male rats injected with the anti-oestrogens MER-25 during infancy. ***Physiol. Behav.* (1977)19:35-39.**

Brawer. J. The role of the arcuate nucleus in the brain-pituitari-gonadal axis. ***Comp. Neurol.* (1974)143:411-446.**

Breedlove, S. and Arnold, A. P. Conference on Reproductive Behavior, ***New York. abstr. No. 3. ibid. Abstr. No. 40 pp 213-245.***

Breedlove, S. and Arnold, A. Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. ***Science* (1980)210:5564-566.**

Brillant, M. H., Sueoka, N. and Chikaraishi, D. M. ***Mol. Cell. Biol.* (1994)4:2187-2197.**

Brown, T. J., Hochberg, R. B., Zielinski, J. E. and MacLusky, N. J. Regional Sex Differences in Cell Nuclear Estrogen-Binding Capacity in the Rat Hypothalamus and Preoptic Area. ***Endocrinology* (1988)123:1761-1770**

Carrer, H. F. and Aoki, A. Ultrastructural changes in the hypothalamic MVN of ovariectomized rats after estrogen treatment, ***Brain. Res.* (1982)240:221-233.**

Crews, D. Neuroendocrinology of lizard reproduction. ***Biol. Reprod.* (1979)20:1-29**

Cunningham, T. J. Naturally Ocurring Neuron Death and its Regulation by Developing Neural Pathways. ***Int. Rev. Cytol.* (1982)74:163-186.**

Chaudhari, N. and Hahn, E. W. Changes in the brain, of ovariectomized rats. ***Science* (1983)220:924-928.**

Chikaraishi, D. M. Complexity of cytoplasmic poliadenilated and Non-Poliadenilatedrat brain ribonucleic acids. ***Biochem.* (1979)18:3249-3256.**

Christensen, L.W. and Gorski, R. A. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. ***Brain Res.*(1978)146:325-340.**

Chomczynski, P., and Sacchi, N. Singel-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. ***Anal. Bioch.* (1987) 162:156-159.**

Dawson, J. L., Cheung, Y. M. and Lau, R.T. S. Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. ***Biol. Psychol.* (1975)3:213-229.**

DeVito, W. J., Stone, S. and Avakian, C. Stimulation of hypothalamic prolactin release by veratridine and agiotensin II in the female rat effect of ovariectomy and estradiol administration. **Neuroendocrinology (1991)54:391-398.**

Döhler, K. D. Serum LH, FSH, prolactin and progesterona from birth to puberty in female and male rats. **Endocrinology (1974)94:1003-1010.**

Döhler, K. D. and Wuttke, W., Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. **Endocrinology (1975)97:898-907.**

Dohler , K, D.A., Hines M, Coquelin A, Davis, F, Shryne J. E. and Gorski, R. A. Pre-and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. **Brain Res. (1984a)302:291-295.**

Döhler, K. D., Srivastava, S. S., Shryne, J. E., Jarzab, B., Sipos, A., Gorski, R. A. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. **Neuroendocrinology (1984b)38:297-301.**

Döhler, K.D., c., Hancke, J. L., Srivastava, S. S., Hofmann, C. C. Shryne, J. E., Gorski, R. A. Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain: neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidences. **Progr. Brain. Res. (1984c)**

Döhler, K. D., Coquelin, A., Davis, F., Hines, M., Shryne, J. E., Sickmöler, P. M., Jarzab, B. and Gorski, R. A. Pre-And Postnatal Influence of an Estrogen Antagonist and an Androgen Antagonist on Differentiation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in Male and Female Rats. **Neuroendocrinology (1986)42:443-448.**

Dokas, L. A. Analyses of brain and pituitary RNA metabolism: A review. **Brain Res. Rev.(1983)5:177-218.**

DonCarlos, L. L. and Handa, R. J. Developmental profile of estrogen receptor mRNA in the preoptic area of male and female neonatals rats. **Dev. Brain. Res (1994)79:283-289.**

Dorfman, R. I. The antiestrogenic and antiadrogenic activities of progesterone in the defense if a brink fetus. **Anat. Rec. (1967)157:547-557.**

Dorner, G., Docke, F. and Moustafa L. Differential localization of a male and a female hypothalamic mating center. **J. Reprod. Fertil. (1968)17:583-586.**

Dörner, G. and Staudt, J. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. **Neuroendocrinology (1968)3:136-140.**

Dörner, G. and Fastschel, J. Wirkingen Neonatal verabreicheter androgens und antiadrogens aussexualverhalten un fertilitat von Rattenweibchen. **Endocrinology (1970)56:29-48.**

Dörner, G and Hinz, G. Androgen-dependent brain differentiation and life span. **Endocrinology (1975)65:378-380.**

Ehrhardt, A. A. and Baker, S. W. Sex Differences in Behavior, r. c. Friedman, R. M. Richart, R. L. Vanderwiele, Eds. (Wiley, New York, 1974)(1978)

Ehrhardt, A. A. and Meyer-Bahlburg, F. L. Effects of prenatal sex hormones on Gender-related behavior. **Science (1981)211:1312-1318.**

Etgen, A. M. Progesterone receptors and the activation of female reproduction behavior: A critical review. **Horm. Behav.(1984)18:411-430.**

Everett, J. W. Brain, pituitary gland and the variant cycle. **Biol. Reprod. (1972)6:3-12**

Feder H. H. Hormones and sexual behavior. **Ann. Rev. Psychol.(1984)35:165-200.**

Gorlach, M. Burd, C. G., Dreyfuss, G. The mRNA Poli (A) binding protein: localization, abundance and RNA-binding specificity. **Exp. Cell. (1994)211:400-407.**

Gorski, R. and Warner, J. Gonadal Activity and sexual differentiation of the hypothalamus. **Endocrinology (1965)76:226-239.**

Gorski, R. A. Influence of age on the response to prenatal administration of a low dose of androgen. **Endocrinology (1968)82:1001-1004.**

Gorski, R. A. Gonadal hormones and the perinatal development of neuroendocrine function. In: **Frontier in Neuroendocrinology** (L. Martini and W. F. Ganong, eds.) Oxford University Press, New York, (1974))237-290.

Gorski, R. A. Gonadal hormones and the perinatal development of neuroendocrine function. In: **Frontier in Neuroendocrinology** (L. Martini, and W. F. Ganong, Eds.) Oxford University Press, New York, **(1971)237-290**

Gorski, R. A. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area for the rat brain. **Brain. Res.(1978) 148,333-346.**

Gorski, R. A. The neuroendocrinology of reproduction: An Overview. **Biol. Reprod.(1979)20:111-127.**

Gorski, R. A., Harlan, R. E. Jacobson, C.D., J. E. and Southam. A. M. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **J. Comp. Neurol. (1980)193:529-539.**

Gorski, R. A. , Jacobson, C. D. Sexual Differentiation of the brain. In **Clinics In Andrology:pediatric andrology. Vol. III.** Edited by Kogan, S. J. Hafez, E.S. E. (1981).pp 109-134.

Gorski, R. A. Sexual differentiation of the brain. possible mechanisms and implications. ✓
Can. J. Physiol. Pharmacol. (1985a)63:577-594.

Gorski, R. A. Sexual dimorphism of the brain. **J. Anim. Sci.(1985b)61:1001-1004.**

Gorski, R. A. Hormone-induced sex differences in hypothalamic structure. **Bull. TMIN (1988)16(3)67-90.**

Goy, R. W. and McEwen, B. S. 1980. Eds. Sexual differentiation of the brain (Mit press, Cambridge, Mass) pp 256-310.

Greenough, W. t., Carter, c. S., Steerman, c., and DeVoogd, T. J. Sex differences in dendritic patterns in hamster proptic area. **Brain Res. (1977)126:63-72.**

GriffithsE. C. Hooper, K, C. Effect of neonatal androgen on the activity of peptidases in the rat brain inactivating luteinizing hormone-releasing hormone. **Horm. Res.(1976)7:218-226.**

Gulder, F. H. Sexual dimorphism of axo-spine synapses and postsynaptic density material in the supraquiasmatic nucleus of the rat. **Neurosci. Lett (1982)145-150.**

Hamme, Jr. R. P., Jacobson, C. D. Sex difference in dentritic development of the sexually dimprphic nucleus of thepreoptic are in the rat. **Int. J. Devl. Neurosci. (1984)2:77-85.**

Handa, R.J., Roselli, C. E., Horton, L., and Resko, J. A.. The quantitative distribution of cytosolic androgen receptors in microdissected areas of the male rat brain: effects of estrogen treatment. **Endocrinology (1987)121:233-240.**

Hanke, J. L., Döhler, K. D. Comparison of estrogenic versus antiestrogenic influences on postnatal defeminization and masculinization of the rat brain. **Exp. Brain. Res. (1981) suppl.3 :352-353.**

Harburgen V, and Openheim R.W. Naturally-occurring neuronal death in vertebrates. **Neuroscien. Comm. (1982)1:39-55.**

Harlan R. E. and Gorski, R. A. Steroid regulation of luteinizing hormone secretion in normal and androgenized rats at different ages. **Endocrinology (1977)101-741-749.**

Häussler, H. U., Jirikowski, G. f., Caldwell, J. D. Sex differences among oxytocin immunoreactive neuronal systems in the mouse hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* (1990)3:271-276.

Hines M. Prenatal gonadal hormones and sex differences in human behavior. **Psychol. Bull (1982)92:56-80.**

Hornung, J. P., Koppel, H., and Clarke, P. G. H. Endocytosis and Autophagy in dying Neurons: An Ultrastructural Study in Chick Embryos. **J. Comp. Neurol.(1989)283:425-429.**

Hutchison, J. B. Hormonal control of behavior: Steroid action in the brain. **Curr. Opinion Neurobiol. (1991)1:562-570.**

Jacobson, C.D., Shryne, J. E., Shapiro, F. and Gorski, R. A. Ontogeny of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. **J. Comp. Neurol. (1980)193:541-548.**

Jacobson, C. D., and Gorski, R. A. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. **J. Comp. Neurol. (1981)196:519-529.**

Jacobson, C. D., Davis, F. C. and Gorski, R. A. Formation of sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: Neuronal-growths migration and changes in cell number. **Dev. Brain. Res. (1985)21:7-18.**

Kaufmann, Y, Milcarek, C. Berissi, H. and Penman, S. Sexual differentiation in different areas of the brain. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1977)74:4801-4805.**

Kelly, M. J. (1984) Identification for Estrogen-responsive LHRH neurons in the Guinea pig hypothalamus. **Brain. Res. Bull. 12,399-407.**

Law S.W., Apostolakis E.M., Samora P.J., O'Malley B.W. y Clark J.H. Hormonal regulation of hypothalamic gene expression: Identification of multiple novel estrogen induced genes. **J Steroid. Biochem. Molec. Biol. (1994)51:131-136.**

Lawrence, J. M. Raisman, G. Ontogeny of synapses in a sexually dimorphic part of the preoptic area in the rat. **Brain. Res. (1980)183:466-471.**

Luine, V. N., McEwen, B. S. Sex differences in cholinergic enzymes of diagonal band nucleus in the rat preoptic area. *Neuroendocrinology* (1983)36:475-482.

Lumia, A. R. Raskin, L A. Effects of androgen on marking and aggressive behavior of neonatally and prepubertally bulbectomized and castrated male gerbils. **J. Comp. Physiol. Psychol.(1977)91:1377-1389.**

Lustig, R. H., Ping, Hua, Wilson, M. C. and Federoff, H. J. Ontogeny sex dimorphism, and neonatal sex determination of synapse-associated messenger RNAs in rat brain. **Molec. Brain. Res. (1993)20:101-110.**

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989. . 726..

Matsumoto, A. and Arai, Y. Sexual dimorphism in "Wiring Pattern" in the Hypothalamic Arcuate Nucleus and its Modification by Neonatal Hormonal Environment. **Brain Res. (1980)190:238-242.**

Matsumoto, A. and Arai, Y. Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. **Neuroendocrinol.(1986)42:232-236**

McEwen, B. S., Lieberburg, I. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal brain rat. **Horm. Behav. (1977)9:249-263.**

McEwen, B. S., Davis, P. G., Parson, B. and Pfaff, D. W. The brain as a target for steroid hormone action. Annu. Rev. Neurosci. (1979)2:65-112.

McEwen, B. S. Neural gonadal steroid action. **Science (1981)211:1303-1311.**

McLaren, A. Reproduction in Mammals. Austin, C. R. Eds. Cambridge Univ. Press. New York, 1972 Vol. II: 235-290

McLusky, N. J. and Naftolin, F. Sexual differentiation for the central nervous system. **Science (1981) 211,1294-1303.**

Milner, R. J., Blomm, F. E. and Sutcliffe, J. G. Brain-specific genes. Strategies and Tissues. in: Current topics in developmental biology, Academic Press, 1987, Vol. 21 pp. 117-150.

Naftolin, F. A. Ryan, J., Davier, V. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. **Recent. Prog. Horm. Res. (1975)31:295-319.**

Naftolin, F., MacLusky, N. J., Leranth, C. Z., Sakamoto, H. S. and Garcia-Segura, L. M., The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues. **J. Steroid. Biochem.(1988)30:195-207.**

Nance D. M. Gorski R. A. Facilitation of female sexual behavior in male rats by septal lesions: an interaction with estrogen. **Horm. Behav. (1975)6:289-299.**

Nance, D. M., Phelps, C., Shryne, J., and Gorski, R. A. Alterations by estrogen and hypothyroidism in the effects of septal lesion on lordosis behavior of male rats. **Brain Res. bull (1977)2:49-53.**

Nielsen, D. A. and Shapiro, D. J. Insights into hormonal control of the stability of the mRNA. **Molec. Endocrinol. (1990)4(7):953-957.**

Ojeda, S. R. Further studies on the maturation for the estrogen negative feedback on gonadotropin release in the female rat. **Neuroendocrinol. (1975)18:242-255.**

Pandey, N. B. and Marzluff, W. F. The Stem-Loop Structure at the 3' End of Histone mRNA Is Necessary and Sufficient for Regulation of Histone mRNA Stability. **Molec. Cell. Biol.(1987)7:4557-4559.**

Paplinger, L. and McEwen, B. S. Gonadal steroid-brain interaction in sexual differentiation. In: J. Hutchison (Ed). Biological Determination of Sexual Behavior. Wiley, New York. (1973) pp 153-218

Pelletier, G., Liao, N., Follea, N. and Govindan, M. V. Mapping of estrogen receptor-producing cells in the rat brain by in vitro hybridization. **Neurosci. Lett. (1988)94:23-38.**

Pfaff, D. W. Estrogens and Brain Function. Neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior. Springer-Verlag. New York, Heidelberg, Berlin. (1980) 123-268.

Pfaff, D. W. In situ hybridization technique to localize rRNA and mRNA in mammalian neurons. **J. Histochem. Cytochem (1986)34: 45-50.**

Pfeiffer, C. Sexual Differences of the hypophysis and their determination by the gonad. **Am. J. Anat. (1936)58:195-225.**

Phoenix C., Goy, R. and Young, W. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. **Endocrinol. (1959)65:369-382.**

Rainbow, t., Parson, D., and McEwen, B. S. Sex differences in rat brain oestrogen and progesterin receptors. **Nature (Lon.). (1982) 300:648-649.**

Raisman, G. and Field, P. M. Sexual dimorphism in the neuropil area of the rat and its dependence on neonatal androgen. **Brain. Res. (1973) 54:1-29.**

Raynaud, J. P., Mercier-Bodard, C. and Baulieu, E. E. Rat estradiol binding plasma protein (EBP), **Steroids (1971)18:767-789.**

Reigel, A. T., Matin, M. B., Schoenberg, D. r. Transcriptional and post transcriptional inhibition of albumin gene expression by estrogen in Xenopus liver. **Mol. Cell. Endocrinol. (1986)44:201-209.**

Reinisch, J. M., Sanders, S. A. Prenatal gonadal steroidal influences on gender-related behavior. **Prog. Brain. Res. (1984)61:407-416.**

Resiert, J, and Pilgrim Ch. sexual differentiation of monoaminergic neuron-genetic or epigenetic? **Trends Neurosci (1991)14:468-473.**

Reuben, W., Rhjees, J, Shrine E., and Gorski, R. A. Onset, perinatal period hormone-sensitivity to sexual differentiation of dimorphic nucleus of preoptic area in female rats. **J. Neurobiol. (1990)21:781-786.**

Rhoda, J., Corbier, P. and Roffi, J., Hypothalamic testosterone increase in the male rat at birth. **Int. J. Dev. Neurosci, (1983)1:187-190.**

Rhoda, J., Corbier, P. and Roffi, J. Gonadal steroid concentration in serum and hypothalamus of the rat at birth aromatization of testosterone or 17- β Estradiol. **Edocrinol. (1984)114:1754-1760.**

Robinson, S. M. Fos, T. O., Dikkes, P., Pearlstein, R. A. Sex differences on the shape of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and supra-chiasmatic nucleus of the rat: 3-D computer reconstructions and morphometrics. **Brain. Res. (1986)371:380-384.**

Roselli, C. E., Horton, L. E., and Resko, J. A. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. **Endocrinol.(1985)117:2471-2477.**

Sachs, A. B., Davis, R. W., and Kornberg, R. D. A single domains of yeast poly (A) binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. **Cell. Biol. (1987)7:3268-3276.**

Sakuma, Y. Influences of neonatal gonadectomy or androgen exposure on the sexual differentiation of the rat ventromedial hypothalamus. *J. Physiol.* (1984)349:273-286.

Schröder, H. C., Bachmann, M., Diehl-Seifert, B. Müller, W.E. Transport of mRNA from Nucleus to Cytoplasm. **Prog. Nucleic Acid Res. Molec. Biol. 34(1987)89-142.**

Selmanoff, M. K., Brodtkin, L. D. Aromatization and 5 alpha reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. **Endocrinol. (1977)101:841-848.**

Steiner R. A. Clifton, D. K. Spies, H. G. Sexual differentiation and feedback control of luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. **Biol. Reprod. (1976)15:206-212.**

Steimer, T. H. and Hutchison, J. B. Is Androgen-Dependent aromatase activity sexually differentiated in rat and Dove preoptic Area? **J. Neurobiol. (1990)21(5)787-795.**

Sudo, K., Monsma, F. J., Katzenellenbogen, F.S. Anti-estrogen-binding sites distinct from the estrogen receptor: subcellular localization, ligand specificity, and distribution in tissues of the rat. **Endocrinol. (1983)112:425-434.**

Sutherland, S. D. and Gorski, R. A. An evaluation of the inhibition of androgenization of the neonatal female rat brain by barbiturate. **Neuroendocrinol.(1972)10, 94-108.**

Swanson, H. H. and Van der Werff then Bosch, J. J. The "early-androgen" syndrome, differences in response to prenatal and postnatal administration of various doses of testosterone propionate in female rats. **Acta Endocr. (1964)47:37-50.**

Swanson, H. H. and Van Der Werff then Bosch, J. J. The "early-androgen" syndrome: differences in response to prenatal and postnatal administration of various doses of testosterone propionate in female and male rats. **Acta Endocrinol. (1965)47:37-50.**

Ulibarri, C. Popper, P and Micevych, P. E. Role of postnatal androgens in sexual differentiation of the lordosis-inhibiting effect of central injections of cholecystokinin. **J. Neurobiol. (1990)21(5):796-807.**

Van Ness, J. I. , Maxwell, H. and Hahn, W. E. Complex population of nonpolyadenylated messenger, RNA in mouse brain. **Cell, (1979)18:1341-1349.**

Vangala, V., Naftolin, R. and Ryan, K. Aromatization in the central nervous system of rabbits: Effects of castration and hormone treatment. *Endocrinology* (1973)92:589-596.

Vito, C., Fox, T. Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain. **Dev. Brain. Res. (1982)2:97-110.**

Vreeburg, J. T. M. and Van der Vaart. Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition of oestrogen biosynthesis. **J. Endocrinol.(1977)375-382.**

Walsh, R. J. and Brawer, J. r., Cytology of the arcuate nucleus in the newborn male and female rats. **J. Anat. (1989)128:121-133.**

Weisz, J. and Ward, I.L. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetus, and neonatal offspring. **Endocrinol. (1980)106:306-316.**

Whalen R.E. Rezek Inhibition of lordosis in female rats by subcutaneous implant of testosterone, androstendione or dihydrotestosterone in infancy **Horm. Behav. (1974)5:125-128.**
119.

Wickens, M. In the beginning is the end: Regulation of Poly (A) addition and removal during early development. **TIBS (1990)15:320-324.**

Williams, R.W. and Herrup, H. The control of neuron number, **Ann. Rev. Neurosci. (1988)11:423-453.**