

00346

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“Expresión Región Específica y Sexo Dependiente del *Cyp11A1*  
en Cerebro anterior de *Gallus gallus* en Etapa Preeclósión”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS: BIOLOGÍA CELULAR

P R E S E N T A:

PABLO GERARDO HOFMANN SALCEDO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA



MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/0388/04  
ASUNTO: Asignación de jurado

**DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA**

Presente

Por este conducto me permito comunicarle como Director(a) de Tesis respectivamente del(a) alumno(a) **BIOL. PABLO GERARDO HOFMANN SALCEDO**, quién desarrolló el trabajo de tesis titulado: "**Expresión región específica y sexo dependiente del Cyp11A1 en cerebro anterior de *Gallus gallus* en etapa preeclósión**", que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 24 de mayo del año en curso, asignó el jurado para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias Biología (Biología Celular).

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO	
PRESIDENTE	DRA.	ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA	<i>Ro Penaloza</i>
VOCAL	DR.	PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ	<i>Pedro Nicolas Velazquez</i>
SECRETARIO	DRA.	MARTA CATALINA ROMANO PARDO	<i>Marta Catalina Romano Pardo</i>
SUPLENTE	DR.	MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA	<i>Marco Antonio Juárez Oropeza</i>
SUPLENTE	DRA.	MARGARITA VIRGINIA GONZÁLEZ DEL PLIEGO OLIVARES	<i>Margarita Virginia González del Pliego Olivares</i>

Vo Bo

En espera de su pronta respuesta, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd.. Universitaria, D.F., a 26 de mayo de 2004

JEFE DE LA DIVISIÓN

DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS

DCRV/ASR/mnm

**Expresión Región Específica y Sexo Dependiente del *Cyp11A1*  
en Cerebro anterior de *Gallus gallus* en Etapa Preeclusión.**

***MAESTRIA EN CIENCIAS: Biología Celular***

***FACULTAD DE CIENCIAS, U.N.A.M.***

***PABLO G. HOFMANN SALCEDO***

**Dedico el presente trabajo a las personas que contribuyeron con apoyo económico y moral, con paciencia y fé para su realización. Agradezco a aquellos que participaron, compartiendo su experiencia y conocimiento, en mi desarrollo personal, académico y profesional. Con gratitud muy especial . . .**

... a mi madre, por el ser el soporte incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

## RESUMEN

Es ampliamente aceptado que el complemento cromosómico sexual del cigoto es responsable del inicio del desarrollo sexual de aves y mamíferos. Una vez que se ha establecido el sexo gonadal, los andrógenos producidos en los testículos de los mamíferos juegan un papel importante en el fenotipo y la conducta. En aves, se piensa que los estrógenos ováricos son responsables de la diferenciación somática y neural típicamente femenina.

Los esteroides son producidos *de novo* en el SNC y la primera enzima en la ruta de biosíntesis de esteroides es el citocromo P450<sub>scc</sub>, que ha sido detectado en tejido neural de diferentes especies de vertebrados.

La regulación de la expresión del gen *Cyp11A1*, que codifica al citocromo P450<sub>scc</sub>, se ha descrito en órganos esteroidogénicos como placenta, gónadas, suprarrenales y células adiposas en una gran variedad de organismos. Además de los esteroides gonadales, la regulación de la secreción y la función de los neuroesteroides durante el desarrollo del SNC permanece poco clara. El presente trabajo documenta la expresión regional específica y sexualmente dimórfica del *Cyp11A1* por RT-PCR y el análisis por RIA de la biosíntesis de esteroides en dos regiones del cerebro anterior del embrión de pollo. Este dimorfismo se hizo evidente por un transcrito adicional del gen, de mayor tamaño al esperado, en el telencéfalo masculino y una mayor conversión de colesterol a pregnenolona en el diencefalo femenino. En cuanto a la biosíntesis esteroidea, en el cerebro masculino se observó una mayor producción de pregnenolona en el telencéfalo que en el diencefalo ( $p < 0.05$ ), mientras que en los cerebros femeninos la esteroidogénesis fue mayor en el diencefalo que en el telencéfalo ( $p < 0.05$ ). No se detectó una diferencia sexual en la producción de esteroides en la región telencefálica, a diferencia de la región diencefálica, en la que el tejido femenino produjo una cantidad 4 veces mayor a la producida por el diencefalo masculino ( $p < 0.01$ ).

## ABSTRACT

It is widely accepted that the sex-chromosome complement of the zygote is responsible for the initiation of sexual development in birds and mammals. Once gonadal sex is established, the androgens produced in the mammalian testes, play an important role in phenotype and behavior. In birds, ovarian estrogens are thought to be responsible for typically female somatic and neural differentiation.

Steroids can be synthesized *de novo* in the CNS, and the first and rate-limiting enzyme in the steroidogenic pathway is cytochrome P450<sub>scc</sub>, which has been detected in neural tissue of different vertebrate species.

Expression regulation of the *Cyp11A1* gene, encoding cytochrome P450<sub>scc</sub>, has been described for steroidogenic organs like placenta, gonads, adrenals and adipose cells in a variety of organisms. Aside from gonadal steroids, neurosteroid secretion regulation and function during development of the CNS, remains unclear. The present study reports the sexually-dimorphic expression of the *Cyp11A1* by RT-PCR and RIA analysis of steroid biosynthesis in two forebrain regions of the pre-hatching chick. The sexual dimorphism was made evident by an additional gene transcript, of greater molecular weight than the expected, in the male telencephalon and an increased conversion of cholesterol to pregnenolone in the female diencephalon. According to our results, pregnenolone biosynthesis in the male brain, was greater in the telencephalon than the diencephalon ( $p < 0.05$ ), while in the female brain, there was a more active steroid biosynthesis in the diencephalon than in the telencephalon ( $p < 0.05$ ). We were not able to detect a sexual difference in steroid production in the telencephalic region, contrasting with the diencephalic region, where the female neural tissue produced 4 times more pregnenolone than the male neural tissue ( $p < 0.01$ ).



## **INDICE**

<b>Contenido:</b>	<b>Página</b>
Introducción	1
Generalidades	1
Determinación y Diferenciación Sexual	2
Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)	4
Diferenciación Sexual del SNC	10
Conducta Sexual y Esteroides	13
Neuroesteroides	18
Expresión del Citocromo P450scc	19
Planteamiento del Problema	23
Hipótesis	23
Objetivo general	24
Objetivos Específicos	24
Material y Método	25
Modelo experimental	25
Estudio de la expresión del Citocromo P450scc	25
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
Síntesis de DNA complementario y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	26
Secuenciación del producto de amplificación	27
Fracción mitocondrial y síntesis de pregnenolona	28
Medición de la síntesis de Pregnenolona	29
Análisis estadístico de la biosíntesis de Pregnenolona	29
Resultados	30
Determinación de la zona de estudio del mensajero para el citocromo P450scc	30
Amplificación del mRNA del CYP11A1 por RT-PCR	33
Análisis de la biosíntesis de esteroides en la fracción mitocondrial	40
Discusión	43
Conclusión	48
Referencias	51

## INTRODUCCION

### Generalidades

Dado que todos los que pertenecemos a la especie humana, fuimos concebidos por medio de un acto sexual, tendemos a igualar "sexo" con reproducción, pero como Lynn Margulis y Dorian Sagan definen en su libro "What is Sex?" (1997), el sexo es la combinación de material genético de distintas fuentes que resulta en un nuevo individuo. Esta mezcla no necesariamente significa reproducción, de tal manera que existen organismos que se pueden deleitar en la recepción, transmisión y/o recombinación de dicho material genético sin producir mas individuos similares. Por el contrario, la gemación de los vegetales, la división mitótica de una *amoeba* o la proliferación de las células de nuestro cuerpo, son formas de reproducción que no requieren de intercambio génico o actividad sexual.

De la misma manera que un gran número de seres vivos, prácticamente todos los vertebrados se reproducen de manera sexual. En este último grupo de animales, cada uno de los dos sexos se encuentra en individuos distintos, por lo que se les llama especies dioicas (*di* = dos y *oikos* = casa) y cada uno de ellos produce un solo tipo de gametos. Debido a la existencia de individuos con una sola de las dos modalidades de gametogénesis, es necesaria toda una serie de procesos que faciliten la reproducción, mediante la unión de esos dos gametos. Una parte importante de esos procesos son patrones conductuales que se consideran "comportamiento sexual". Los vertebrados poseen los sistemas nerviosos mas complejos en toda la escala filogénica y esta característica les ha dado una gran ventaja conductual y adaptativa a los distintos medios que han colonizado a lo largo de la evolución, así como una ventaja reproductiva innegable.

En las especies de vertebrados, la conducta sexual es propia y característica de cada uno de los sexos, cuyo control maestro se encuentra en el sistema nervioso central de

cada uno de los individuos. Ejemplos de dichas diferencias sexuales del comportamiento son, entre otras, la ingesta de alimentos, juego e interacción social, agresividad y territorialidad, conducta sexual proceptiva o receptiva, actitud copulatoria y finalmente, comportamiento parental.

Para que estas diferencias conductuales se presenten, el sistema nervioso se desarrolla de manera distinta en cada uno de los sexos y funciona gracias, en gran medida, a la influencia de los esteroides sexuales.

### **Determinación y Diferenciación Sexual**

Es conocimiento común que el complejo cromosómico del cigoto es el factor inicial en la determinación de las características sexuales de aves y mamíferos. En estos últimos, el complemento cromosómico XY ó XX define el tipo de gónada que se forma a partir de la cresta genital del mesodermo intermedio del embrión. En el caso de un individuo homocromosómico se desarrollan ovarios, mientras que en uno heterocromosómico se forman testículos. En las aves el patrón de determinación cromosómica es el inverso, dado que el individuo homocromosómico es el macho y el heterocromosómico es la hembra.

La diferenciación de un testículo o un ovario a partir de una gónada bipotencial, es un proceso ontológico común entre todos los vertebrados. Desde el momento en que se anunció la existencia del gen *Sry*<sup>1</sup>, el factor determinante de testículo (*Tdf*<sup>2</sup>) presente en el cromosoma "Y" de los mamíferos, se ha intentado encontrar el gen con la función homóloga en otras clases del *phylum*. Hasta ahora no se ha encontrado un gen

---

<sup>1</sup> Las iniciales de los nombres de genes se han escrito con letra cursiva para distinguirlos de los factores peptídicos que codifican. Sólo la primera letra del nombre del gen es mayúscula, ya que se trata de la descripción de los genes involucrados en el desarrollo de especies animales, a diferencia de la nomenclatura genómica humana, donde todas las letras del nombre del gen deben ser mayúsculas.

<sup>2</sup> Las iniciales de los nombres de factores protéicos se han escrito "no cursivas" para hacer clara la diferencia entre el producto peptídico y el gen que lo codifica. De la misma manera que en la nomenclatura genómica, la primera letra es mayúscula y las subsecuentes minúsculas debido a que se refieren a proteínas en especies animales homólogas a las proteínas en humanos, que se escriben con todas las letras mayúsculas.

ortólogo en la determinación sexual de reptiles y aves, lo que significa una diversificación evolutiva en cuanto a los elementos que disparan la diferenciación sexual de estos organismos. A través de estudios de disgenesia gonadal en humanos, otros genes considerados como importantes en este proceso son el *Sox9*, *Amh*, *Wt1*, *Sf1*, *Dax1* y *Dmrt*, cuya expresión, tejido específica durante etapas críticas en la diferenciación sexual de la gónada, se ha podido observar en el desarrollo de otras clases de vertebrados como reptiles y aves. Un aspecto interesante de la expresión de estos genes en la gónada indiferenciada, es que existe una gran variabilidad entre especies con respecto a la especificidad sexual, el momento y la secuencia con la que se expresan, además de que en algunas especies de reptiles, el patrón de expresión de estos genes se modifica de acuerdo a la temperatura de incubación en las etapas críticas. Sin embargo, los pasos en la histogénesis de testículos y ovarios son extraordinariamente similares en todos los grupos de vertebrados (Morrish y Sinclair, 2002; Torres Maldonado et al, 2002).

De acuerdo a lo que se ha descrito hasta ahora, después de la determinación y diferenciación sexual de la gónada, son factores epigenéticos los que se encargan de definir la constitución morfológica, fisiológica y de comportamiento que caracterizan la conducta sexual del individuo. Es entonces que la sexualidad depende del sexo y no debe confundirse sexo con sexualidad, como lo informa Crews con su trabajo publicado en 2003.

Son los andrógenos producidos por las células intersticiales del testículo de los mamíferos, incluida la especie humana, durante el progreso del periodo embrionario y fetal del individuo, que tienen un papel fundamental en el control del desarrollo fenotípico y en la adquisición de conductas sexualmente dimórficas en etapas posteriores al nacimiento. De manera directa, o por la aromatización de estos andrógenos, las estructuras y algunas de las funciones y conductas típicas masculinas

se hacen evidentes (Casto y Ball, 1996; Elbrecht y Smith, 1992; Grisham et al., 1997), aunque todavía existe evidencia contradictoria en cuanto a la función de los esteroides gonadales durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Arnold, 1996 y 1997).

### **Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)**

Los primeros indicios de la formación del sistema nervioso central se hacen evidentes a partir de que se ha iniciado el proceso de gastrulación, que es cuando la membrana precordial y el proceso notocordal se constituyen. En esta etapa, los embriones de reptiles, aves y mamíferos, son discos ovoides con un eje longitudinal claramente distinguible, en el que se aprecian los extremos cefálico y caudal del embrión. De manera subsecuente y por efecto de los factores inductores de la notocorda, se forma la placa neural a lo largo del eje longitudinal, como un engrosamiento epitelial, a partir del ectodermo suprayacente a la notocorda. Aunque la naturaleza de la inducción notocordal sobre el ectodermo no se encuentra completamente conocida, se sabe que es de crucial importancia para la determinación de la placa neural y el establecimiento de un patrón espacial cefalo-caudal y dorso-ventral del tubo neural. Los inductores, hasta ahora propuestos para la regulación de la expresión de genes y transformación de las células del neuroectodermo, son Nogina (Smith et al, 1995; Lamb et al, 1993), folistatina (Hemmati-Brivanlou et al, 1994), Cordina (Sasai et al, 1994 y 1995), Xnr3 (Lamb et al, 1993; Hansen et al, 1997) y Cerebrus (Bouwmeester et al, 1992). Todos estos factores tienen la capacidad en común, de inhibir la producción de factores secretados como el Bmp-4, que se produce en células ectodérmicas e impide la diferenciación neuroepitelial de las células ectodérmicas adyacentes. No obstante, se ha observado que las células ectodérmicas pueden adquirir características neuroepiteliales en ausencia de factores extrínsecos. Los factores de crecimiento

fibroblástico se han propuesto también como participantes iniciales de la determinación neural y de ahí que la supresión de la señalización vía BMP por los factores antes mencionados mantenga, mas que iniciar, la neurogénesis a partir de la gastrulación (Jessell y Sanes, 2000). En general, la evidencia existente sugiere que las señales inductoras de mesodermo deben ser reprimidas para que la inducción neural pueda tener efecto (Harland, 2000).

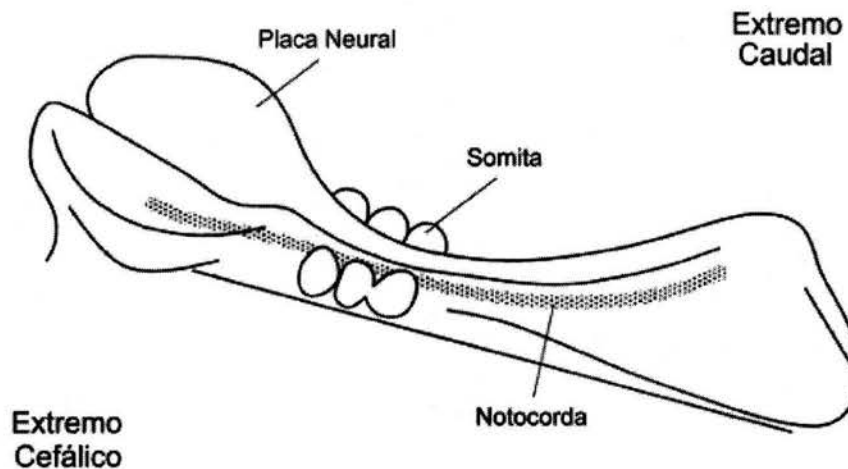


Fig. I-1. Representación esquemática de la relación que existe entre el surco neural, la línea media ventral del surco (placa del piso) y la notocorda. Se muestra en la región anterior (cefálica) el ensanchamiento de los bordes de la placa neural, correspondiente a la formación de las estructuras encefálicas (adaptado de Lacbawan y Muenke, 2002).

Una vez formada la placa neural, ésta sufre un hundimiento en la línea media a todo lo largo, proceso por el que se transforma en surco neural. La parte central del surco queda definida para ser la futura placa del piso del tubo neural, cuando el surco se ha cerrado en la línea media dorsal. Aún antes de su cierre, en la porción cefálica comienzan a notarse unos ensanchamientos en los bordes del surco neural, que una vez cerrado se convierten en las tres vesículas encefálicas primarias (Fig. I-1). Estas tres subdivisiones del tubo neural son el prosencéfalo, el diencéfalo y el rombencéfalo, nombradas desde la parte más anterior hacia región caudal. A partir del prosencéfalo se forman las vesículas telencefálicas (hemisferios cerebrales y los ganglios basales), las

vesículas ópticas. El prosencéfalo propiamente dicho queda formando el diencefalo (epífisis, epitalamo, tálamo, hipotálamo e hipófisis). Todos los derivados del prosencéfalo se conocen como cerebro anterior, mientras que las otras dos vesículas, mesencéfalo y rombencéfalo se conocen como cerebro medio y posterior respectivamente. Este último se regionaliza cefálicamente en metencéfalo (puente y cerebelo) y caudalmente en mielencéfalo (médula oblonga o bulbo raquídeo).

Las subdivisiones del tubo neural aparentes poco después de su formación, se producen mediante la expresión de genes reguladores que definen fronteras dorso-ventrales y cefalo-caudales discretas. Para esta regionalización suceda, se requiere de la interacción de varios tejidos (mesodermo precordial, notocorda, endodermo y ectodermo) para la activación de programas específicos de histogénesis y diferenciación (Fig. I-2). Con base en los patrones de expresión génica, se define una base molecular de las propiedades moleculares del ectodermo suprayacente al mesodermo axial. Las familias de genes *Otx*, *Emx*, *Dlx*, *Nkx* y *Wnt* son de suma importancia para la definición de regiones del prosencéfalo. En especial, los genes *Otx* y *Emx* se expresan en el cerebro anterior y medio del ratón (Boncinelli, 1997; Rubenstein y Rakic, 1999).

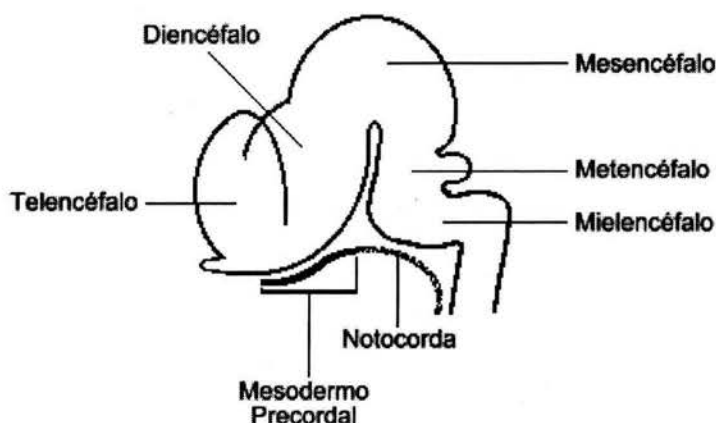


Fig. I-2. Esquemización de la subdivisión de las regiones encefálicas del tubo neural y la relación que guardan con la notocorda y el mesodermo precordial.

*Otx2* es necesario para la definición de la placa neural anterior y la organización de la línea primitiva y se transcribe en células que se cree producen señales que determinan la placa neural (endodermo cefálico y mesodermo axial), así como las células que responden a esas señales (epiblasto y neuroectodermo). Los ratones que no expresan una forma funcional del *Otx2* mueren tempranamente y no presentan neuroectodermo (Acampora et al., 2000).

La producción de la proteína de señalización codificada por el gen *Shh* (sonic hedgehog) que se expresa a todo lo largo del mesodermo axial y mesodermo precordial, tiene una actividad fundamental en la determinación de la línea media de la placa neural y posteriormente en la ventralización del tubo neural. Seguida de la expresión inicial en mesodermo axial y precordial, esta proteína se produce también en la región ventral del tubo neural y es importante para el desarrollo de las estructuras ventrales del cerebro anterior (Echelard et al., 1993; Tanabe y Jessell, 1996; Hammerschmidt et al., 1997). La presencia de este factor en el neuroepitelio posiblemente controla aspectos posteriores de la organización y ventralización del SNC.

Por otro lado, las interacciones entre miembros de las familias génicas de *Engrailed* (*En*) y *Wingless* (*Wnt*), que se expresan en el tubo neural, están relacionadas con la determinación del mesencéfalo y la porción anterior del metencéfalo (cerebelo) (Joyner, 1996).

El grupo de genes del tipo *Hox* (homeobox) codifican para proteínas de asociación a DNA, que actúan como factores de transcripción. De la misma manera en la que participan en la regionalización segmentaria del cuerpo del embrión (Hunt et al., 1991; McGinnis y Krumlauf, 1992). Estas proteínas regulan la formación de un patrón segmentario tanto en el cerebro anterior como en el cerebro posterior (Puelles y Rubenstein, 1993). La forma de expresión de estos genes ha aportado evidencia en la



metamerización del rombencéfalo, formando como consecuencia las rombómeras (McGinnis y Krumlauf, 1992).

De manera similar a los genes de las distintas familias *Hox*, los genes *Pax* (paired-rule-box) también codifican para factores de transcripción cuyo patrón de expresión restringido regional y temporalmente (con excepción de los genes *Pax1* y *Pax9*) durante el desarrollo del SNC, define la dorso-ventralización del tubo neural (Gruss y Walter, 1992) (Fig. I-3). Se cree que las proteínas resultantes de la expresión de estos genes juegan un papel permisivo, mas que instructivo, ejerciendo su efecto por medio de interacción célula-célula.

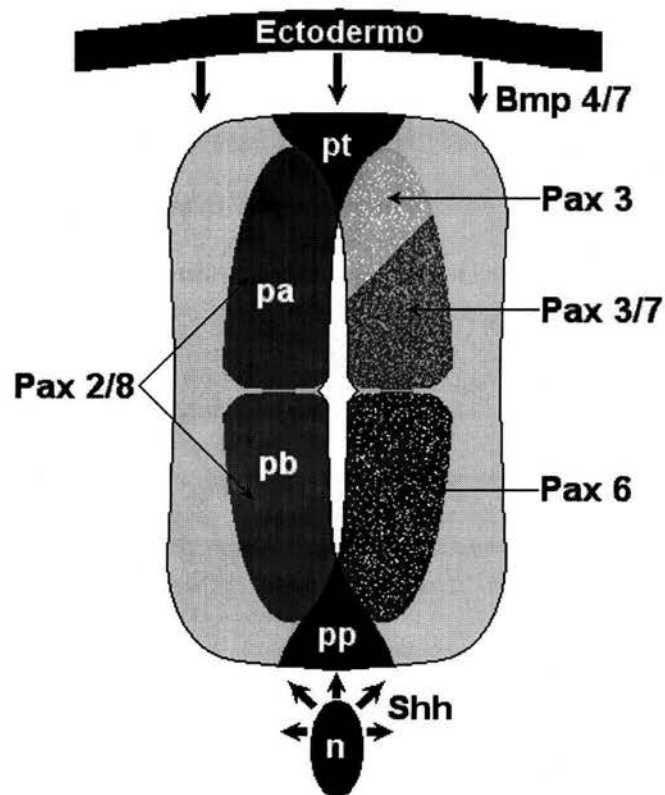


Fig. I-3. Patrón de expresión de los genes de la familia *Pax* que juegan un papel importante en la estratificación del epitelio neural, así como en la regionalización dorso-ventral del tubo neural (*Pax 2* y *8*; *6*, *7* y *3*). La expresión de estos factores de transcripción se encuentra regulada por los inductores secretados por la notocorda y el ectodermo superficial, entre los que encontramos a Sonic Hedgehog (*Shh*) y las proteínas morfogénicas de hueso (*Bmp*) respectivamente. pt = placa del techo; pa = placas alares; pb = placas basales; pp = placa del piso; n = notocorda.

Durante el desarrollo del SNC, cuando se han formado aproximadamente ocho pares de somitas, el diencefalo consiste en la futura región talámica y las vesículas ópticas, que se encuentran conectadas por la placa quiasmática. En la parte anterior del diencefalo se encuentran los esbozos de las vesículas del telencefalo y se vislumbran algunos componentes regionales derivados de las células de la cresta neural. En esta etapa se cierra el neuroporo anterior (lamina terminal), entre las porciones laterales del diencefalo y el tubo neural, desde el quinto par de somitas hacia la región caudal se define como la medula espinal.

Durante el proceso de cierre del neuroporo posterior, se inicia la neurulación secundaria y se pueden observar los esbozos de los primeros nervios. Cuando el neuroporo posterior ha quedado cerrado, comienza la formación del cerebelo y se distinguen los primordios de los ganglios, los núcleos aferentes y eferentes de los pares nerviosos craneales.

Mientras se desarrollan los hemisferios cerebrales, es posible identificar las estructuras basales del cerebro anterior y existe una regionalización del diencefalo en epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral, subtálamo e hipotálamo. Un poco después, se forma el *infundibulum*, que dará origen a la porción neural de la hipófisis y se determina la organización definitiva de la corteza cerebral. Mas tarde, se hace evidente el bulbo olfatorio, mientras se forman los núcleos en el área amigdalóidea y la placa comisural establece las conexiones entre los hemisferios cerebrales.

Las neuronas, al igual que las células gliales, se derivan del epitelio neural. Dicho epitelio se convierte en el estrato endimario o ventricular, cuando se ha estratificado formando las capas del SNC definitivo. Aún en etapas adultas, el estrato ventricular y subventricular hacen las funciones del estrato germinativo, a partir del cual se siguen formando tanto neuronas como células gliales. Existe evidencia experimental de que la diferenciación neuronal sucede mientras ocurre la migración seguida de las

interacciones sinápticas que se establezcan en el destino del neuroblasto. Uno de los genes que determina el destino de algunos sublinajes neuronales es el *Mash-1*, que codifica para una proteína con un dominio básico hélice-asa-hélice típico de los factores de transcripción. Este factor de transcripción, descrito en ratón y homólogo de Achaete-scute de *D. melanogaster*, se expresa en el cerebro anterior al igual que en regiones posteriores del SNC murino (Lo et al, 1991; Rubenstein y Rakic, 1999).

En mamíferos, la proteína Notch-1 se distribuye asimétricamente en el citoplasma celular, ubicándose en la región basal de las células del estrato ventricular (germinativo), que están comprometidas para dividirse y al migrar convertirse en neuronas. De manera similar, la proteína Numb se encuentra en la región apical de las células del estrato germinativo y está relacionada con las capacidades proliferativas de las células neuroepiteliales, pero es detectable únicamente en células del estrato proliferativo del neuroepitelio (Wolpert et al., 1998). Estudios más recientes han aportado evidencia en cuanto a la unión de Numb con Notch, que resulta en la inactivación de la última y por lo tanto marca el destino de diferenciación a partir de una división celular asimétrica. La determinación de línea glial ó endimaria depende de la actividad de Notch, mientras que su inhibición tiene como consecuencia una determinación de tipo neuronal. Aunque la forma en la que estos factores interactúan se conoce poco, parece que la interacción lateral entre las células del estrato proliferativo (ventricular ó endimario) se desarrolla por la presencia de las proteínas de membrana Delta y Serrate y el receptor transmembranal Notch (Marnellos et al., 2000).

### **Diferenciación Sexual del SNC**

Existen evidencia del efecto que los esteroides gonadales tienen sobre el desarrollo y organización sexo-específica del sistema nervioso central de los vertebrados superiores, así como el impacto que tienen en muy distintas conductas reproductivas y

no reproductivas, en etapas posteriores de la vida. Presumiblemente, los esteroides gonadales también determinan profundas diferencias sexuales ontológicas y estructurales del sistema nervioso central de los humanos. Las teorías clásicas de la diferenciación sexual del cerebro y del comportamiento de mamíferos, sustentan que la secreción de testosterona por los testículos fetales estimula un patrón masculino de desarrollo neural, mientras que en ausencia de la esteroidogénesis testicular, la diferenciación es femenina. En algunas especies de aves, sin embargo, se ha encontrado que los estrógenos producidos por el ovario determinan una organización femenina del SNC, a diferencia del desarrollo neural masculino, que se lleva a cabo en ausencia de estrógenos ováricos (Arnold, 1997a). Mientras que la mayor parte de los estudios de la relación entre los esteroides sexuales y la diferenciación sexual del SNC se han centrado en mamíferos, en las aves, en una especie de gorriones particularmente (zebra finch en inglés), se ha podido encontrar una correlación entre las características anatómicas y la función del sistema que controla el canto, que es una conducta sexualmente dimórfica existente, de manera normal, únicamente en machos. Estas estructuras, representadas desde regiones en la corteza telencefálica hasta el tallo cerebral (núcleo motor de la musculatura vocal), se encuentran significativamente más desarrolladas en los machos, con respecto a las hembras. Hasta ahora, el papel que juega el  $17\beta$ -estradiol en la masculinización morfológica y funcional del sistema neural del canto de la especie de gorriones antes mencionada, ha sido el más ampliamente estudiado en la diferenciación sexual del sistema nervioso de las aves. Otros aspectos de la reproducción de esta especie de aves, como el comportamiento copulatorio y selección de pareja, no se encuentran asociados a diferencias anatómicas conocidas del SNC entre los dos sexos (Wade, 2001).

En muchas otras especies de vertebrados las diferencias sexuales de estructuras corporales, sistema nervioso central y periférico, así como de conducta, se encuentran

determinados principalmente por la esteroidogénesis gonadal, sin embargo, no está claro si los esteroides sexuales participan de manera directa en todos estos niveles de organización del sistema neural. Aunque la mayoría de las relaciones anatómicas entre las estructuras sexualmente dimórficas y la conducta se han estudiado en organismos adultos, se sabe que los mecanismos hormonales que determinan las diferencias estructurales actúan durante etapas críticas perinatales. Se ha estudiado escasamente la relación que tiene el sexo genético con los genes que determinan la organización y desarrollo de núcleos del SNC. La identificación de las diferencias sexuales en la expresión de algunos de estos genes contribuiría al conocimiento de los sucesos moleculares transitorios, que por interacción con el ambiente hormonal en el ó los periodos críticos, dejan establecida la sensibilidad de las funciones neurales para ser moduladas por los esteroides sexuales en etapa adulta. El dimorfismo sexual en cuanto a la forma y posición de las células del hipotálamo en desarrollo, sugiere que la migración celular es un proceso temprano controlado por genes y que tiene como resultado la sensibilización de las regiones dimórficas para la futura regulación del comportamiento (Tobet, 2002).

Núñez y colaboradores (2002) han encontrado diferencias en la densidad neuronal en la región binocular de la corteza visual primaria entre ratas machos y hembras, en donde el número de neuronas es 19% mayor en ratas macho con respecto a las hembras 20 días después de nacidas. Al parecer son las secreciones esteroideas ováricas que, posterior al día 20 de edad, causan un decremento en el número neuronal de la corteza visual de las hembras.

Al administrar benzoato de  $17\beta$ -estradiol a ratas hembra en etapa neonatal, se han podido identificar algunos genes de expresión específica neural, cuya transcripción aumenta cuando las ratas tratadas llegan a la pubertad. Algunos de éstos muestran un patrón de expresión diferencial entre los dos sexos. La importancia de la expresión

estrógeno-dependiente de genes del desarrollo hipotalámico, en la diferenciación sexual del cerebro, se podrá determinar a futuro con más estudios al respecto (Choi et al., 2001).

Los mecanismos por los que la testosterona (T) y el estradiol (E) modifican el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, específicamente la neurogénesis, migración, diferenciación y muerte celular y sinaptogénesis en las regiones sexualmente distintas del SNC, permanecen prácticamente desconocidos hasta el momento. Sin embargo, en estudios recientes se ha observado un aumento perinatal en la expresión del receptor a progesterona (PR), dependiente de la aromatización de la T a E, en los núcleos preóptico medio y periventricular-anteroventral del área preóptica de la rata, que son sexualmente dimórficos (Quadros et al., 2002).

Recientemente, utilizando ratones en los que el sexo genético cerebral (XY o XX) era independiente del sexo genético gonadal, se encontró que las células cerebrales "XX" o "XY" diferían en fenotipo, por lo que se concluyó que el complemento cromosómico sexual puede contribuir a la diferenciación sexual del SNC (Carruth LL et al., 2002). Es posible que las células cerebrales "XY" expresen genes exclusivos del cromosoma "Y" no presentes en las células "XX", mientras que las células femeninas posean una dosis mayor de algunos genes del cromosoma "X". Por lo tanto, es posible que no solamente los esteroides sexuales sean el único factor responsable de la morfología de las regiones sexualmente dimórficas del sistema nervioso central, sino que también la regulación de la expresión génica diferencial se encuentre determinada en parte por el complemento cromosómico y los genes que en estos cromosomas se encuentren.

### **Conducta Sexual y Esteroides**

Como James D. Watson admitió durante su entrevista con Scientific American (Abril, 2003) que si ahora, en la era del genoma humano a cincuenta años de la publicación de

la estructura del DNA, se le presentara la oportunidad de empezar su carrera en investigación, el se dedicaría al estudio de la relación que existe entre la expresión génica y la conducta.

Por algunas décadas ya, la conducta sexual ha sido un fenómeno de interés para los estudiosos de las bases neuroanatómicas y neurofisiológicas del comportamiento. Un ejemplo interesante es la motivación temporal en la receptividad sexual de algunas hembras durante el periodo de ovulación. Este interés ha llevado a estudiar y entender los circuitos neurales y los mecanismos básicos, por los cuales los esteroides modifican funciones que redundan en cambios de comportamiento. El interés científico y los distintos modelos de estudio de las interrelaciones entre estructuras, hormonas y comportamiento, dieron origen a la disciplina llamada "Neuroendocrinología".

Durante el proceso del desarrollo de mamíferos y aves, un individuo adquiere características morfológicas y conductuales típicas de macho o hembra. El dogma de la diferenciación sexual sostiene que es la esteroidogénesis gonadal la que determina la evolución ontológica en un sentido u otro. Sin embargo, esta bimodalidad no se encuentra representada en todos los rasgos característicos de uno de los dos géneros en conductas no reproductivas. Como ejemplo de lo anterior, es la agresividad que se presenta durante la temporada reproductiva en la que tanto hembras como machos pueden presentar la conducta agresiva. Mas aun, este comportamiento de agresión reproductiva es altamente variable entre los individuos de una misma especie, sin importar su sexo (Kendrick y Schlinger, 1996). Ellos proponen que algunos rasgos de conducta social asociada con la reproducción, se establecen de manera independiente a las rutas del desarrollo sexual primario.

En el caso del control de la conducta por las hormonas esteroideas, es importante mencionar el origen, almacenamiento y distribución, además de la forma dual en que los esteroides tienen su acción sobre las células del sistema nervioso. Las hormonas de

origen esteroideo, se sintetizan a partir del colesterol por modificaciones mediadas enzimáticamente. Estas enzimas son denominadas esteroideogénicas y entre ellas figuran algunas de la super familia de los citocromos P450. Los esteroides sintetizados por las distintas reacciones bioquímicas, se clasifican en grupos de acuerdo a su origen, función y estructura. Estos grupos son los progestágenos, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides.

Todas estas moléculas son pequeñas y lipofílicas, por lo que deben ser transportadas por proteínas acarreadoras dentro del torrente circulatorio y la matriz extracelular de los tejidos de los organismos. Una vez disociadas de la proteína acarreadora, pueden atravesar fácilmente la membrana celular, debido a su naturaleza liposoluble y provocan los cambios en el metabolismo de la célula blanco por la interacción que tienen con un receptor intracelular. Al formarse el complejo hormona receptor, éste último cambia en su configuración tridimensional, exponiendo así el dominio de asociación a DNA, normalmente constituido por dedos de zinc. La asociación del complejo receptor-ligando a secuencias específicas del DNA, llamadas elementos de respuesta a esteroides (ARE = androgen response element, ERE = estrogen response element, etc...), promueve la transcripción de los genes que poseen estas secuencias en regiones "enhancer" que flanquean la porción codificante (Brown, 2001). La función de estos receptores a esteroides se encuentra modulada a su vez, por coactivadores de receptores nucleares, cuya expresión en tejido cerebral presenta un patrón dimórfico sexual (Auger et al., 2002).

Mediante la represión o la activación de la transcripción de genes por el mecanismo antes descrito, es que las células neurales de las regiones dimórficas sexuales del SNC son determinadas para formar los núcleos típicamente masculinos o femeninos en los centros de control conductual del cerebro. De la misma manera, es que las neuronas



de estas regiones pueden ser sensibilizadas en etapas tempranas del desarrollo para responder de manera distinta a los esteroides sexuales en etapas posteriores de la vida. La forma en que los esteroides modifican la actividad fisiológica del tejido neural, es por medio de la modulación de la actividad de los canales iónicos involucrados en la transmisión de los impulsos neurales. Un tipo de estos canales iónicos es el receptor tipo A (GABAA-r) para el ácido gama-amino-butírico (GABA), que posee una subunidad de asociación a esteroides y es activado por la asociación con el GABA, neurotransmisor de origen aminoacídico como su nombre lo indica.

En múltiples especies de mamíferos y aves, se ha comprobado que los andrógenos testiculares o sus metabolitos promueven la conducta de cortejo y copulatoria en individuos masculinos adultos tanto en aves como en mamíferos (McEwen, 1988; Segovia y Guillamon, 1993; Panzica et al., 1996).

Tomando en cuenta la acción dual de los esteroides sexuales, se ha podido demostrar que tratamientos con inhibidores de la aromatasa (P450arom) en etapa perinatal, se obtienen efectos a largo plazo sobre la conducta reproductiva de las ratas macho. Los cambios conductuales observados fueron que un 25% de los neonatos tratados no tuvieron una conducta sexual masculina sino un comportamiento femenino cuando se les administró una dosis de estrógenos. Los efectos conductuales obtenidos por la inhibición de la aromatasa y la administración de estrógenos indica que existe una etapa crítica en la diferenciación sexual del cerebro masculino que depende de la aromatización de andrógenos (Gerardin y Pereira, 2002).

En el caso de los estudios en aves, este tipo de tratamientos ha dado resultados aparentemente contradictorios, dado que las dosis de estradiol inmediatamente después de la eclosión, puede masculinizar los circuitos neurales del canto y la conducta de cortejo en hembras, además de inhibir el desarrollo del comportamiento copulatorio de los machos. Este tipo de observaciones ha llevado a la hipótesis de que

la conversión de andrógenos testiculares a estrógenos tiene la función de masculinizar las estructuras involucradas en el canto y cortejo de los machos, mientras que el estradiol ovárico favorece el desarrollo de conducta copulatoria femenina en lugar de masculina (Wade, 2001).

El tratamiento de los gorriones cebra, en etapa embrionaria (día 5 de incubación), con el inhibidor de síntesis de estrógenos fadrozole, tiene como consecuencia el desarrollo de tejido testicular en lugar de ovárico en hembras genéticas. El efecto del tratamiento anterior sobre el desarrollo de conductas copulatorias y de cortejo, además de la estructura anatómica de la región de control del canto en machos y hembras, hizo evidente que el tratamiento con testosterona en machos adultos favorece la exhibición de conductas masculinas, mientras que el tejido testicular en las hembras genéticas, no tiene ningún efecto sobre el cortejo ni actividad copulatoria. Los núcleos cerebrales del canto tampoco fueron masculinizados por el tratamiento *in ovo*, aún en individuos que carecen de tejido ovárico, sin embargo, la inhibición de la biosíntesis de estrógenos en machos, favorece significativamente la actividad de canto. Todos estos resultados sugieren que aunque los tratamientos hormonales influyen en la diferenciación sexual del SNC y el desarrollo de conductas sexuales, la esteroidogénesis gonadal no sea requisito indispensable para la diferenciación del sistema de canto en los gorriones cebra (Springer y Wade, 1997). Al tratar embriones de la misma especie de gorriones con benzoato de estradiol, se obtuvieron machos con tejido testicular alterado y se favoreció la persistencia de oviductos en 6 de siete animales, mientras que no se obtuvo ningún efecto sobre el circuito neural del canto (Wade et al., 1997).

Estudios de la región media del núcleo preóptico, que muestra un dimorfismo sexual y sensibilidad a los andrógenos en el SNC de la codorniz, han revelado que la interacción mediada por fibras vasotocinérgicas, entre la parte media del núcleo basal de la estría

terminal y el área media del núcleo preóptico del cerebro masculino, puede jugar un papel importante en la determinación de conducta típica masculina (Absil et al., 2002).

### **Neuroesteroides**

A finales de la década de los 80's, se observó que la cantidad de dehidroepiandrosterona, esteroide precursor de andrógenos, en tejido cerebral, se sintetiza de una manera independiente a la actividad esteroideogénica de las gónadas y glándulas suprarrenales. Desde entonces, los esteroides que se sintetizan *de novo* en el SNC a partir del colesterol reciben el nombre de "neuroesteroides" (Baulieu, 1990). Su acción sobre los componentes celulares del tejido neural se pueden dividir en dos categorías, la primera de estas modalidades de acción es la regulación de la expresión génica en las células blanco, que se considera la acción típica esteroidea sobre un gran número de tipos celulares en muchos tejidos corporales y la segunda forma de acción de los esteroides, por lo que se les considera también esteroides neuroactivos (independientemente del órgano donde se sinteticen), es la regulación de la función neuronal, mediada en muchos de los casos, por una subunidad del receptor A para el neurotransmisor ácido gama-amino-butírico (receptor GABA-A) (Fig. I-4).

Específicamente, el nombre de neuroesteroide lo reciben aquellos que son sintetizados a partir del colesterol en tejido neural. La primera enzima en la cadena de biosíntesis de esteroides es el citocromo P450<sub>scc</sub> (side chain cleavage), misma que se ha detectado en el tejido cerebral de diferentes especies (Mellon y Deschepper, 1993; Ukena et al., 1998). Este citocromo se encuentra codificado por el gen *Cyp11A1* y es una oxigenasa terminal presente en la membrana mitocondrial interna que forma un complejo enzimático en asociación con la ferredoxina y la ferredoxin-reductasa. Estas últimas dos, transfieren los electrones desde el NADPH al citocromo y por una reducción del oxígeno molecular, corta la cadena lateral del colesterol entre los carbonos 20 y 22 (Miller, 1988).

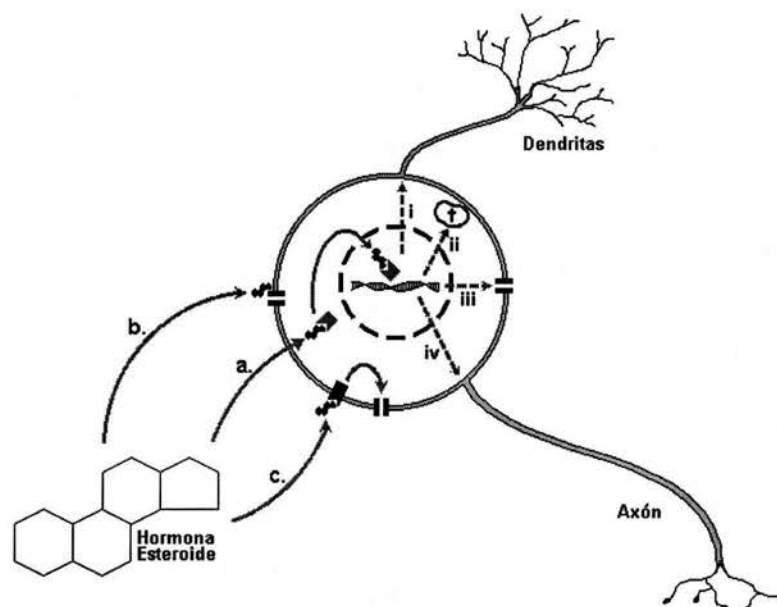


Fig. I-4. Esquemización de algunos de los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas sobre células neurales excitables. (a.) Las hormonas esteroideas se unen a los receptores intracelulares y modifican la expresión de genes que incluyen (i) crecimiento o regresión dendrítica, (ii) apoptosis, (iii) expresión y/o modulación de canales iónicos y (iv) cambios en la actividad sináptica axonal. Los dos tipos de acción neuroactiva de los esteroides es (b.) por la asociación directa a canales iónicos para modular su función y (c.) la asociación de los esteroides a receptores membranales y la modulación de los canales iónicos vía segundos mensajeros. Las estructuras de los receptores intracelulares y los membranales no es la misma. (Adaptado de Weeks y Levine, 1995.).

La regulación de la expresión del *Cyp11A1*, en tejido neural no se conoce completamente, aunque se ha descrito en otros órganos esteroideogénicos como placenta, gónadas y adipocitos en diferentes especies de vertebrados (Lin et al., 1994; Beaudoin et al, 1997; Mamluk et al., 1998; Monte et al., 1998).

### Expresión del Citocromo P450<sub>scc</sub>.

Las enzimas P450 constituyen una gran superfamilia de proteínas que contienen grupo prostético hemo-tiolato y se encuentran involucradas en diversas funciones metabólicas de compuestos tanto endógenos como exógenos. Generalmente, funcionan como una oxigenasa terminal en cadenas de transferencia de electrones. El nombre de P450 lo reciben por la características físicas de mayor absorción de luz en la longitud ultravioleta de 450nm. (Fig. I-5).

Además del mismo P-450, estos sistemas están constituidos por componentes proteicos fundamentalmente distintos, que son utilizados por otros complejos multienzimáticos con diferentes funciones. FAD (adrenodoxin-reductasa), adrenodoxina Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, adrenodoxina Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> y el citocromo b<sub>5</sub>. Todos los sistemas enzimáticos con actividad de monooxigenasa, que contienen un elemento P-450, comparten una arquitectura estructural y de dominios funcionales muy similares, aunque en la escala evolutiva no se presenten en una relación filogénica lineal con los organismos a los que pertenecen. Estos sistemas se encuentran clasificados en dos categorías, los bacterianos ó mitocondriales (tipo I) y los microsomales (tipo II). Los sistemas con P450 mitocondriales, se encuentran constituidos por una flavoproteína (reductasa dependiente de NADH o NADPH) con un dominio FAD, una proteína con hierro y azufre y el propio citocromo P450 (Fig. I-6) (Degtyarenko, 1995).

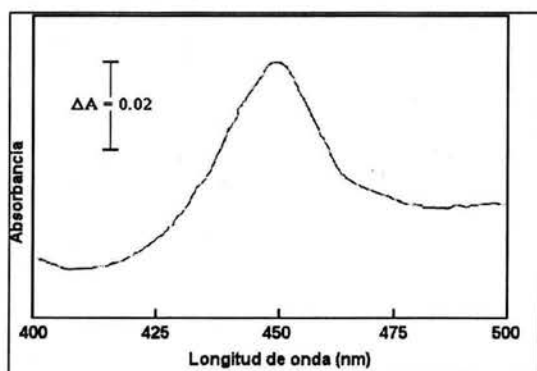


Fig. I-5 Representación gráfica de la curva de absorbancia de luz ultravioleta de los citocromos de la superfamilia P450, característica, por la cual reciben el nombre.

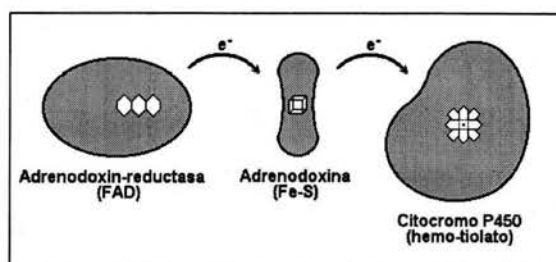


Fig. I-6. Esquematización de los componentes proteicos de un sistema monooxigenasa tipo I, en donde se destaca el grupo prostético de cada uno, que participa en la transferencia de electrones hasta el oxígeno, pasando por el grupo hemo-tiolato del P450.

La conversión del colesterol a pregnenolona, el primero de los pasos enzimáticos en la biosíntesis de esteroides, está dada por el citocromo mitocondrial P450 de corte de cadena lateral del colesterol (P450<sub>sc</sub>, side chain cleavage). A partir de la pregnenolona se produce el resto de los esteroides (mineralocorticoides, glucocorticoides,

progestágenos, andrógenos y estrógenos). El P450<sub>scc</sub> está codificado en el gen *Cyp11A1* cuya función está regulada a nivel transcripcional principalmente, por distintos factores y hormonas. Aunque la expresión de este citocromo se ha detectado en regiones del sistema nervioso central de vertebrados superiores (Chung et al., 1991), los tejidos mas estudiados con respecto a la regulación de su expresión han sido las glándulas suprarrenales, gónadas y placenta. En estos tejidos, entre los elementos que promueven la expresión del *Cyp11A1* que primero se pudieron identificar, se encuentran la ACTH (adrenocorticotropin hormone), la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo-estimulante (FSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Simpson y Waterman, 1988; Richards y Hedin, 1988; Voutilainen y Miller, 1987), que actúan promoviendo la transcripción del los citocromos de la superfamilia por medio de segundos mensajeros, como el Adenosin-monofosfato cíclico (cAMP), además de los ácidos *trans*-retinóicos que promueven también el incremento de la esteroidogénesis (Parker y Schimmer, 1993; Richards, 1994). La regulación hormonal y el patrón de expresión del *Cyp11A1* durante el desarrollo son procesos característicos de cada especie y se efectúan de una manera tejido específica (Waterman et al., 1986). Se tiene evidencia de que los elementos de regulación de la transcripción dependiente de cAMP, en la región no transcrita 5' del gen *Cyp11A1*, se utilizan en una forma diferencial programada durante el desarrollo y de manera célula y tejido específica. Como ejemplo de lo anterior, es la secuencia promotora utilizada para la expresión basal del gen en tejido suprarrenal, que se encuentra dentro de los 79 pares de bases anteriores al inicio de transcripción, mientras que para la expresión en células de placenta humana la región importante en la promoción de la trascrición se encuentra entre los -89 y -108 pares de bases (Moore et al., 1992; Hum et al., 1995).

El factor esteroidogénico-1 (SF-1), que determina la capacidad endocrina y de biosíntesis esteroidea en células pluripotenciales desde etapas embrionarias

relativamente tempranas (Ikeda et al., 1994; Crawford et al., 1997) y es esencial para la formación de gónadas, suprarrenales (Luo et al., 1994) y para la diferenciación de hipotálamo e hipófisis (Ikeda et al., 1995; Sadovsky et al., 1995).

A diferencia de los mamíferos, en quienes la expresión del SF-1 se encuentra disminuida durante la diferenciación del ovario y aumentada en el testículo en formación, en las aves, este factor se encuentra aumentado en el ovario embrionario durante la diferenciación sexual (Smith et al., 1999).

El SF-1 es un factor de transcripción que reconoce una secuencia compartida de los genes de todas las enzimas esteroideogénicas, PyCAAGGTCA necesaria para la activación de la expresión de los citocromos P450 esteroide-hidroxilasas y lleva a cabo su función por la interacción de un dominio LXXLL en su porción amino terminal con CBP/p300 y TReP-132 (proteína de regulación de transcripción de 132 kDa) (Gizard, et al., 2002).

En ratones, se han encontrado dos transcritos (de 4.4 y 7.5 kb's) del gen del TReP-132 principalmente en timo, testículo y varias regiones cerebrales. Las regiones del SNC donde se ha detectado con gran especificidad por hibridación *in situ*, son los ganglios basales, el hipocampo, la corteza piriforme, la corteza cerebral, el núcleo ventromedial del hipotálamo, los núcleos dorsales y superiores del rafe, por lo que se tiene evidencia anatómica clara de las estructuras neurales involucradas en desórdenes psiquiátricos y conductuales, aunque los mecanismos de regulación de la neuroesteroideogénesis aún están en vías de clarificación. La coexpresión de SF-1, TReP-132 y el citocromo P450<sub>scc</sub> en estas regiones cerebrales, aportan evidencia de la importancia de la neuroesteroideogénesis durante el desarrollo neural y en la adquisición de funciones (Duguay et al., 2003).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En los vertebrados superiores, los esteroides gonadales tienen una gran importancia en el desarrollo, determinación sexual y sensibilización del sistema nervioso central. Además de la capacidad que presentan de modificar la organización de distintas regiones cerebrales en los estadios del desarrollo específicos, cumplen con la función de participar en la regulación del comportamiento a lo largo de la vida de un individuo (Crews, 2003). Estas funciones esteroideas se realizan de una manera dual, la primera, es por la regulación de la expresión de genes en las células sensibles a estas moléculas y la segunda, es por la capacidad moduladora del flujo iónico a través de las membranas neuronales (Baulieu y Robel, 1990). Gran parte de los experimentos hechos en la modificación de la organización y sensibilización del SNC de las aves y los mamíferos se han realizado en etapas tempranas del desarrollo post-eclosión y postnatales respectivamente, mediante la administración de esteroides sexuales y/o bloqueadores de su función ó metabolismo (Arnold, 1997). Hasta la fecha no se han hecho estudios sobre el papel directo de los esteroides sexuales producidos en tejido neural sobre el mismo tejido neural durante el desarrollo. Es de gran interés para nosotros estudiar la expresión del *Cyp11A1*, que codifica el citocromo P450<sub>scc</sub>, así como analizar la actividad esteroideogénica de este último por medio de la medición de la síntesis de pregnenolona a partir del colesterol.

### **Hipótesis**

Debido a que los esteroides sexuales juegan un papel importante en la determinación sexual de las regiones cerebrales dimórficas entre los dos sexos en etapas ontogénicas críticas, los neuroesteroides deben ser producidos diferencialmente, de manera sexo específica, entre las distintas regiones del cerebro anterior. Por lo tanto, las enzimas



esteroidogénicas deben presentar variaciones en su expresión y biosíntesis a lo largo del desarrollo. Estas diferencias podrían estar relacionadas con los periodos específicos del establecimiento de las diferencias sexuales entre los tejidos cerebrales de los dos generos.

### **Objetivo General**

El objetivo global de este trabajo se centra en el estudio de la expresión del gen *Cyp11A1* que codifica al citocromo P450<sub>scc</sub> en el tejido cerebral de ambos sexos de *Gallus gallus*, durante el desarrollo *in ovo*, así como análisis de la biosíntesis de pregnenolona en incubaciones de la fracción mitocondrial obtenida de las mismas regiones del SNC utilizadas para el estudio de la expresión del *Cyp11A1*.

### **Objetivos Específicos**

- i) Estudiar la expresión del *Cyp11A1* por RT-PCR a partir del RNA total de cada una de las regiones del cerebro anterior por separado, telencéfalo (hemisferios cerebrales) y diencefalo (regiones talámicas e hipófisis), de uno y otro sexo.
- ii) De la misma manera, a partir de la fracción mitocondrial analizar la biosíntesis de pregnenolona en ambos sexos y en cada una de las regiones del cerebro anterior por separado, midiendo el producto de la conversión del 25-hidroxi-colesterol por el citocromo P450<sub>scc</sub>.
- iii) Analizar la relación que existe entre la expresión, a nivel molecular, la tasa biosintética de pregnenolona en cada una de las regiones cerebrales estudiadas y la diferencia que se presente entre los dos sexos.

## **MATERIAL Y METODO**

### **Modelo experimental**

Se obtuvo el tejido del cerebro anterior de embriones de pollo (White Leghorn, Babcock-300) en estadio 45 del desarrollo (Hamburger y Hamilton, 1951), procesando por separado la región telencefálica (hemisferios cerebrales) de la región diencefálica. Así mismo, se obtuvieron las gónadas de cada uno de los embriones para hacer el estudio comparativo de la transcripción del gen *Cyp11A1* (citocromo P450scc) y la síntesis de pregnenolona en tejido neural y gonadal en ambos sexos. Los ovarios de pollo recién nacido se utilizaron como tejido control y en todos los casos el sexo fue determinado por la asimetría gonadal de las hembras.

### **Estudio de la expresión del Citocromo P450scc**

La determinación de la región del citocromo P450scc para realizar los estudios de su expresión, se hizo mediante la alineación comparativa de las secuencias aminoacídicas referidas para pollo, rata y humano, utilizando el programa Macaw para Windows® (Figuras R-1 y R-2). La región conservada en el tercio medio de la proteína se consideró como adecuada, ya que no contiene las secuencias de asociación al esteroide (SR), ni la de unión al grupo prostético hemo (HR), además de no ser la porción inicial del péptido que determina la localización mitocondrial de la enzima. En la secuencia de DNA complementario (cDNA para el mRNA del *Cyp11A1*) disponible en Genbank se pudo determinar también, la región media del mensajero conservada entre las tres especies, dentro de la que se encuentra el exón 4 y los intrones 3 y 4 y que permite discriminar entre el producto de amplificación a partir de cDNA y el producto de amplificación a partir de DNA genómico.

Una vez definida la región de alta similitud entre los cDNA de las distintas especies, se diseñaron los iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos

fueron: Sentido 5'- GAC CGC CTG ACC CTG AAC -3' y antisentido 5'- CAA GGA GGC TGA AGA GGA TG -3', esperando un producto de amplificación de 472 pares de bases. Se procedió a hacer el estudio de expresión en ovario izquierdo de pollo recién nacido, para comprobar la especificidad de los iniciadores de reacción de PCR y la comprobación del diseño experimental.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se purificó el DNA genómico del tejido cerebelar de embriones de pollo, estadio 45 por el método de Kempter (1992) y se hizo la amplificación por PCR de la región del gen CYP11A1 con 1.0µg de DNA en un volumen total de reacción de 25.0µl, constituido por 20pM de iniciadores de reacción específicos (anteriormente mencionados), 1.5 unidades de Taq Polimerasa (Gibco-BRL, U.S.A.), buffer de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, y dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfatados) 1.0mM. La amplificación se realizó con 35 ciclos (95.0°C/60seg, 61.0°C/60seg, 72.0°C/60seg) precedidos por una desnaturalización a 95.0°C durante 5.0min y seguidos por una extensión final a 72°C durante 7min.

### **Síntesis de DNA complementario y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

La purificación del RNA total se hizo a partir de un homogenizado del tejido en Trizol (Gibco-BRL., U.S.A.), según la técnica establecida por el fabricante. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con 0.5µg de RNA total, utilizando 20 unidades de transcriptasa inversa de AMV (cDNA First Strand Synthesis Kit, Boehringer-Mannheim, U.S.A.) a 42.0°C durante 60min en un volumen total de 20.0µl. La mezcla consistió en buffer de reacción 1X, 50 unidades de inhibidor de RNasa, 5.0mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.0mM de dNTP's, 1.6µg de oligo dT (desoxirribotimina) como iniciador de reacción y 10ng/µl de gelatina. A partir de 2.5µl del cDNA obtenido por transcripción inversa, se hizo la amplificación de la región conservada del transcrito del gen CYP11A1 por PCR, utilizando 20pM de los

iniciadores de reacción con las secuencias antes mencionadas, en buffer de reacción 1X con 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> y 1.5 unidades de Taq Polimerasa (Gibco-BRL, U.S.A.), para un volumen total de 25.0µl. La amplificación se realizó con 35 ciclos (95.0°C/45seg, 61.0°C/45seg, 72.0°C/45seg) precedidos por una desnaturalización a 95.0°C durante 5.0 minutos y seguidos de una extensión final a 72.0°C durante 7.0 minutos.

De manera simultanea se realizó la amplificación de la región traducida del transcrito del gen de la β-actina bajo las mismas condiciones de reacción, con excepción de la temperatura de alineación de los iniciadores, que fue de 55.0°C.

Las secuencias de los iniciadores para la amplificación del transcrito de la β-actina fueron: Sentido 5' - CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C - 3' y Antisentido 5' - AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C - 3' con un producto esperado de 587 pares de bases.

Todos los productos de amplificación fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%/TAE (tris-acetato-EDTA) teñidos con bromuro de etidio 5.0µg/ml y visualizados sobre un transiluminador de luz ultravioleta (λ=250nm).

### **Secuenciación del producto de amplificación**

El aislamiento del fragmento amplificado a partir del tejido control, se hizo por electroforesis de 15µl de reacción de PCR en gel un de agarosa 1.0% con TAE 1X. Posteriormente, se cortó la banda contenida en el gel y la extracción se hizo congelando el fragmento de gel en Nitrógeno líquido durante 5min, seguido de una centrifugación a través de una columna de fibra de vidrio, para obtener la muestra en la solución de electroforesis.

La purificación de la banda obtenida por electroforesis, se hizo por el método modificado de Kempter (1992), lavando la muestra de cDNA 2 veces en etanol 70%. Se eliminó el

etanol residual por evaporación, se resuspendió la muestra en 30µl de H<sub>2</sub>O y se cuantificó por el método de PicoGreen (Molecular Probes, U.S.A.).

La reacción de secuenciación se realizó en ambos sentidos por separado, utilizando 7.03ng de muestra de DNA, 1.0pM de iniciador de reacción (PCR), 4.0µl de BigDye (Perkin Elmer, U.S.A) en un volumen total de 20µl, mediante 30 ciclos de amplificación en las mismas condiciones que la amplificación del cDNA por PCR (95.0°C/45seg, 61.0°C/45seg, 72.0°C/45seg).

Se eliminaron los restos de la mezcla de reacción pasando la muestra por una columna de sephadex G-50 (fino), centrifugando a 3000rpm durante 3.0min. Se dejó secar la muestra toda la noche en una cámara hermética con silica-gel, para posteriormente resuspenderla en el buffer de electroforesis de secuenciación. Finalmente, la secuenciación se realizó en un secuenciador automático Perkin Elmer 377 (U.S.A), según el protocolo del fabricante.

La secuencia obtenida del secuenciador automático se procesó y editó con el programa Chromas<sup>®</sup>, versión 1.62 (Technelysium, Australia).

### **Fracción mitocondrial y síntesis de pregnenolona**

Se homogenizaron por separado las regiones de tejido cerebral y las gónadas en buffer de sacarosa 0.2M (KCl 20mM; MgCl<sub>2</sub> 5mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 10mM; EDTA 0.2mM; Tris HCl 25mM; pH 7.4) y se separó la fracción mitocondrial del homogenizado por centrifugación diferencial a 3300rpm durante 15.0min a 4.0°C y se obtuvo la fracción mitocondrial a partir del sobrenadante por centrifugación a 13000rpm, durante 12.0min a 4.0°C (Tanaka et al., 1982).

Se resuspendió la fracción mitocondrial en 400µl de buffer de sacarosa 0.2M (KCl 20mM; MgCl<sub>2</sub> 5mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 10mM; EDTA 0.2mM; Tris HCl 25mM; pH 7.4), con 1mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos. Se separó la muestra en dos alícuotas de 200µl en

viales de RIA y se les agregó 2.5µl de 25-OH-colesterol 10mM en etanol absoluto y 10µl de isocitrato 1M.

### **Medición de la síntesis de Pregnenolona**

La fracción mitocondrial se incubó a 37 °C en baño maría en agitación (90 ciclos/min) durante 20 min, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, en un volumen total de 1.0 ml de medio. El medio de cultivo para la fracción mitocondrial consiste en sacarosa 0.2 M , KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5.0 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, EDTA 0.2 mM, Tris-HCl 25 mM, Isocitrato 10 mM, 1.0 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos y ajustado todo a un pH de 7.4. Se detuvo la síntesis de pregnenolona en el medio con la fracción mitocondrial al agregar un volumen igual de NaOH 0.3N y posteriormente 10 volúmenes dietil-éter a 4.0°C. Se hizo la extracción esteroidea tres veces con 10 vol. de dietil-éter. Los extractos se cristalizaron por evaporación y fueron reconstituidos con 100µl de buffer isotónico para RIA. Se realizó la medición directa de la concentración de pregnenolona en 200µl del buffer con el contenido esteroideo (Pedernera et al., 1988).

La cantidad de proteína mitocondrial se determinó por absorbancia a 750 nm, utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como control (Lowry et al., 1951).

### **Análisis estadístico de la biosíntesis de Pregnenolona**

El análisis estadístico se realizó por ANOVA, seguido de la prueba de Scheffe (no paramétrica) para las concentraciones de pregnenolona obtenidas por RIA. Las diferencias significativas se consideraron cuando  $p < 0.05$  (\*) y  $p < 0.01$  (\*\*) (GB-STAT).

## RESULTADOS

### **Determinación de la zona de estudio del mensajero para el citocromo P450<sub>scc</sub> (colesterol desmolasa).**

De acuerdo a las secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de la secuencia nucleotídica del cDNA y reportadas anteriormente para el citocromo P450<sub>scc</sub> (colesterol desmolasa) humano, de rata y de pollo (Morohashi et al., 1987; Matteson et al., 1986; Nomura et al., 1997, respectivamente), las regiones de unión al grupo hemo (HR) y el sitio de asociación al esteroide (SR) se encuentran localizados hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína. Las secuencias de estos dominios del péptido se encuentran altamente conservadas en todos los citocromos de la misma superfamilia y en las distintas especies animales que los poseen (Figura R-1).

En la comparación gráfica de las secuencias aminoacídicas para los citocromos P450<sub>scc</sub> de las tres especies, es posible observar las porciones de la proteína que contienen los dominios SR y HR, además de hacerse evidente el alto grado de homología de secuencias, entre las distintas especies comparadas, en estas regiones (Figura R-2).

A partir de la alineación de la secuencia genómica y las secuencias publicadas en cDNA de los mensajeros del *Cyp11A1* de humano, rata, y pollo (Morohashi et al., 1987; Oonk et al., 1989; Nomura et al., 1997, respectivamente), se pudo determinar, como adecuada para el estudio de la expresión del gen, la región de alta homología entre los exones 3 y 5. Esta zona no contiene las secuencias codificantes para las regiones de asociación a esteroides o de unión al grupo hemo de los citocromos P450 y además incluye a dos intrones (3 y 4). Las regiones altamente conservadas del *Cyp11A1* entre diferentes especies y la inclusión de intrones en la región de estudio del mensajero, nos permiten discriminar entre otros citocromos de la misma superfamilia y la amplificación que podría ser resultante del DNA genómico, en caso de que éste último se encontrara

Human	mlakglpprsvlvkgyqtflsapreglrlrvptgegagi--strsprpfneipspgdng	58
Rat	mlakglclrsvlvkscqpflspvwqggp---latgngagi-sstnsprsfneipspgdng	56
Chick	mlsraapiagsfqacrcaggipalagvhyp-----lpsssgarpdfqvpgevrwg	50
Human	wlnlyhfwretgthkvhllhvnqnfqkygpiyreklgnvesvyvidpedvallfksegpnp	118
Rat	winlyhflrengthrihyhmqnfqkygpiyreklgnmesvyildpkdaatlfscegpnp	116
Chick	wlnlyhfwkeggfhvnhnimaskfrfgpiyreklgvyesvniisprdaatlfsksegmlp	110
Human	erflippwvayhqqyqrpigvllkksaawkkdrvalnqevmapeatknflplldavsrdf	178
Rat	erylvpwvayhqqyqrpigvlfkssdawrkdrivlnqevmapdsiknfvpllegvaqdf	176
Chick	erfsvppwvayrdyrnkpygvllktgeawrsdrlltnkevlspqvvsfvplldqvsqdf	170
Human	vsvlhrrikkagsngysgdisddlfrfafesitnvifgerqgmleeivnpeaqrifidaiy	238
Rat	ikvlhrrikkqngskfsgdisddlfrfafesitvsvfgerlglmlleeivdpesqrifidavy	236
Chick	lrraraqvqsggrerwtadshelfrfalesvchvlygerlgllqdfvdpeaqqfidavt	230
Human	qmfhtsvpmlnlppdlfrlfrtktkwdhvaawdvifskadiytqnfywelr-qkgsvhhd	297
Rat	qmfhtsvpmlnmppdlfrlfrtktkwdhaaawdvifskadeytqnfywdlr-qkrdfs-k	294
Chick	lmfhttspmlyvppallrhlntktwrhvhawdaiftqadkciqnvyrdirlqrkste-e	289
Human	yrgmlyrllgdsksmfedikanvtemlaggvdttsmtlqwhlyemarnlkvqdmraevl	357
Rat	ypgvlyslggknlpfkniqanitemlaggvdttsmtlqwnlyemahnlkvqemraevl	354
Chick	htgilfsllvqdklplddikasvtemmaggvdttsmtlqwamlelarspgiqerlraevl	349
Human	aarhqagqdmamlqlVPLLKASIKETLRLHPISvtlqrylvndlvldymipaktlvqv	417
Rat	aarrqagqdmakmvqlVPLLKASIKETLRLHPISvtlqrylvndlvlnrykipaktlvqv	414
Chick	aakqeaqgdrvkmlksIRLLKAAIKETLRLHPVavtlqryttqevilqdyrippktlvqv	409
SR	----- <u>IRLLKAAIKETLRLHPV</u> -----	
Human	aiyalgreptfffdpenfdptrwlskdknityfrnlqFGWGVQRQCLGRRIAELEMTIFli	477
Rat	asyamgressffpnpnkfdptrwleqsntthfrylgFGWGVQRQCLGRRIAELEMTIFli	474
Chick	glyamgrdpevfpkpeqfnperwlv--mgskhfkglSFGFGPRQCLGRRIAELEMQLFlm	467
HR	----- <u>FGFGPRQCLGRRIAELEMQLF</u> -----	
Human	nmlenfrveiqhlsdvgttnlilmpekpisftfwfnqeatqq-----	521
Rat	nvlenfrieqvgsirdvgtkfnlilmpekpiffnfqplkqdlgstmpkrgdtv	526
Chick	hilenfkietkravevgtkfdlilvpekpiylrlrlqpqe-----	508

Figura R-1. Alineación comparativa de las secuencias de amino ácidos determinadas para los citocromos P450scc de humano, rata y pollo (Morohashi et al., Oonk et al. y Nomura et al., respectivamente), donde se destacan la secuencia consenso de unión a esteroides (SR, subrayado sencillo) y la secuencia consenso de asociación al grupo prostético Hemo (HR, subrayado ondulado). Los citocromos P450scc de las tres especies difieren en longitud, siendo de 521 aminoácidos el de humano, de 526 el de rata y de 508 el de pollo.



### Estructura Protéica del Citocromo P450<sub>scc</sub>

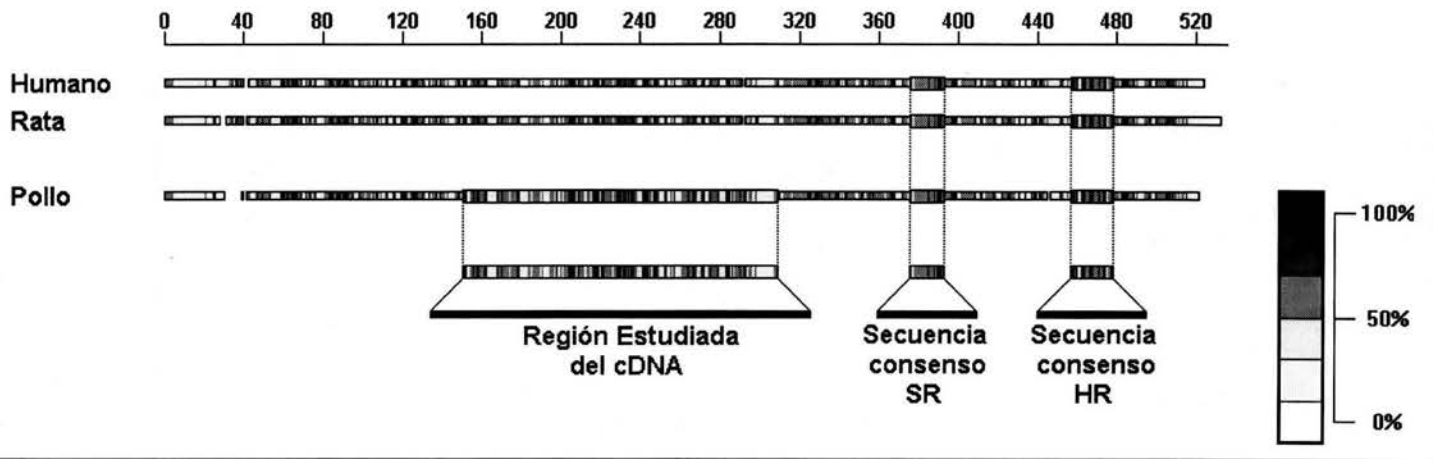


Figura R-2. Comparación esquemática de las secuencias aminoacídicas de los citocromos P450<sub>scc</sub> de humano, rata y pollo, donde son apreciables las regiones de mayor homología. Se muestra la región de la proteína cuyo cDNA fue amplificado para el estudio de la expresión del *Cyp11A1*. El dominio de asociación a esteroides (SR) y el dominio de asociación al grupo hemo (HR), están localizados hacia la región carboxilo terminal de la proteína. El recuadro muestra el porcentaje de homología de las secuencias.

### Estructura del Gen CYP11A1

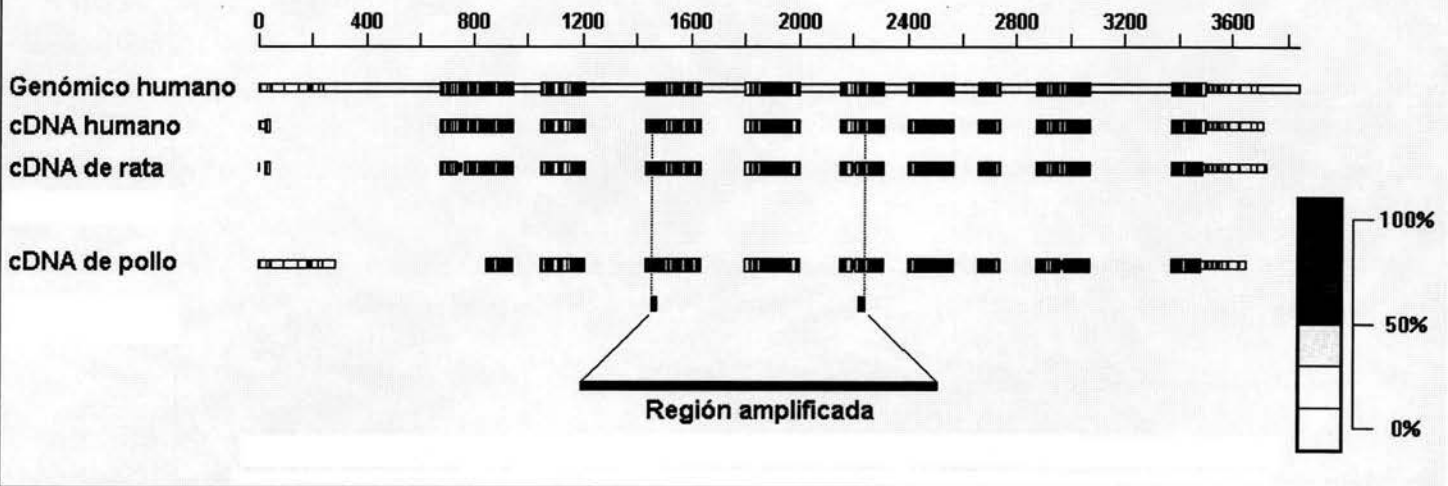


Figura R-3. Alineación esquemática del gen *Cyp11A1* humano (Citocromo P450<sub>scc</sub>), el cDNA para su mensajero y las secuencias referidas en cDNA para los transcritos de rata y pollo. Se muestra la región estudiada que presenta una alta similitud entre las especies e incluye el exon 4 y los intrones 3 y 4. El recuadro muestra el porcentaje de homología de las secuencias.

presente durante los estudios de expresión génica. En estos análisis, se excluyó también la región del mensajero que codifica para la señal de localización mitocondrial en su extremo 5'.

El diseño de los iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus iniciales en inglés), se hizo de manera que también quedaran incluidos en zonas donde las secuencias presentan alta similitud, entre las distintas especies comparadas (Figura R-3).

### **Amplificación del mRNA del *Cyp11A1* por RT-PCR.**

Una vez establecida la región a estudiar, se llevó a cabo la amplificación por RT-PCR (PCR precedida por transcripción reversa o RT) a partir del RNA total de ovario de pollo recién nacido, obteniéndose el fragmento de tamaño esperado; 472 pares de bases (Figura R-4 a.).

A continuación, se procedió a hacer la amplificación por PCR a partir del DNA genómico utilizando los mismos iniciadores de reacción, obteniéndose un fragmento de mucho mayor tamaño que el esperado para la amplificación del cDNA, debido a la presencia de los intrones 3 y 4 (Figura R-4 b.). Con esto se comprueba que el amplificado obtenido por RT-PCR es exclusivamente a partir de RNA.

Para tener la certeza de que el producto de amplificación es una región del RNA mensajero (mRNA) que codifica el *Cyp11A1*, se procedió a secuenciar la banda obtenida para el tejido control. La secuencia obtenida experimentalmente fue corregida en los nucleótidos en que se produjeron fallas en la lectura por el sistema de secuenciación automático (Perkin Elmer, U.S.A.), con la secuencia realizada en sentido inverso sobre el mismo fragmento (Figura R-5). El resultado de la corrección (Figura R-6) se comparó con la secuencia obtenida de la base de datos Genbank (Nomura et al. Genbank, 1995; 1997) y se encontró una discrepancia en sólo 3 de las 472 bases

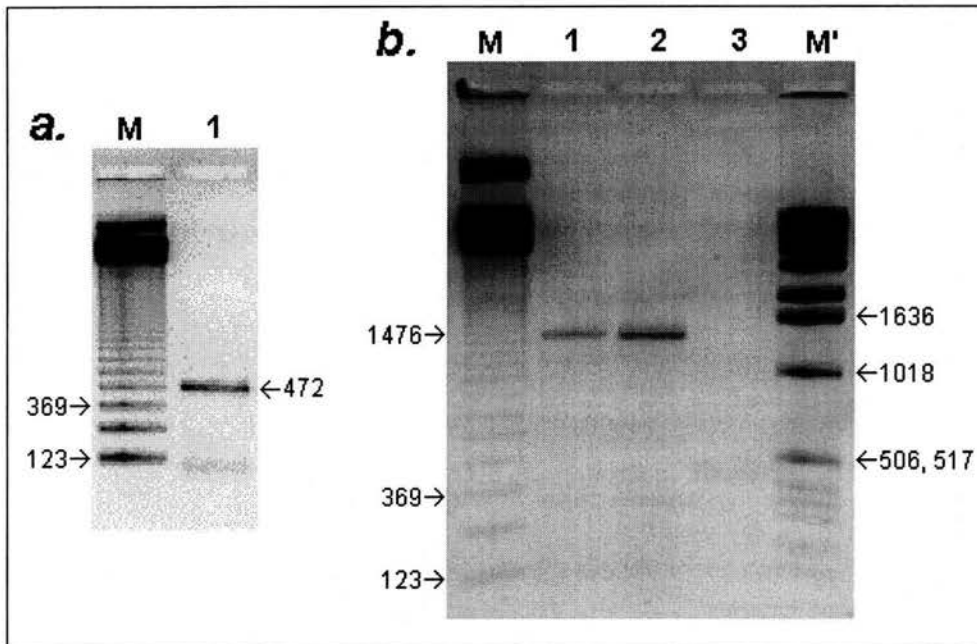


Figura R-4. **a.** Electroforesis en gel de agarosa (1.5%/TAE 1X), teñido con bromuro de etidio, del producto de amplificación por RT-PCR del mensajero del *Cyp11A1* (P450scc) obtenido de tejido control (ovario de pollo recién eclosionado), con el tamaño esperado de 472 pares de bases (carril 1). El marcador de peso molecular (M) es una escalera de 123 pares de bases. **b.** Electroforesis en gel de agarosa (1.5%/TAE 1X), teñido con bromuro de etidio, que muestra los productos de amplificación por PCR del DNA total obtenido de tejido cerebral de pollos hembra (carril 1) y macho (carril 2) recién eclosionados, donde el tamaño de los fragmentos indica la presencia de los dos intrones incluidos en la región amplificada. La mezcla de reacción sin muestra de DNA se presenta en el carril 3 y los marcadores de peso molecular (M y M') son escaleras de 123 pares de bases y de 1 Kilo base respectivamente.

obtenidas de acuerdo al diseño experimental (Figura R-7). Los nucleótidos obtenidos, en la posición 621 una citosina y en la posición 648 una guanina, en lugar de las timinas reportadas con anterioridad en ambas posiciones. El nucleótido en la posición 860 obtenido experimentalmente fue una timina, en lugar de una citosina como la publicada por Nomura y colaboradores (figura R-8).

Con todo lo anterior, es claro que los oligonucleótidos iniciadores de la reacción por PCR son altamente específicos y que el amplificado por RT-PCR es exclusivamente la región definida para el estudio de expresión del *Cyp11A1*.

Al llevarse a cabo el análisis de la expresión génica del *Cyp11A1* sobre el tejido cerebral y gonadal de pollos de 18 días de incubación, se observó una sola banda,

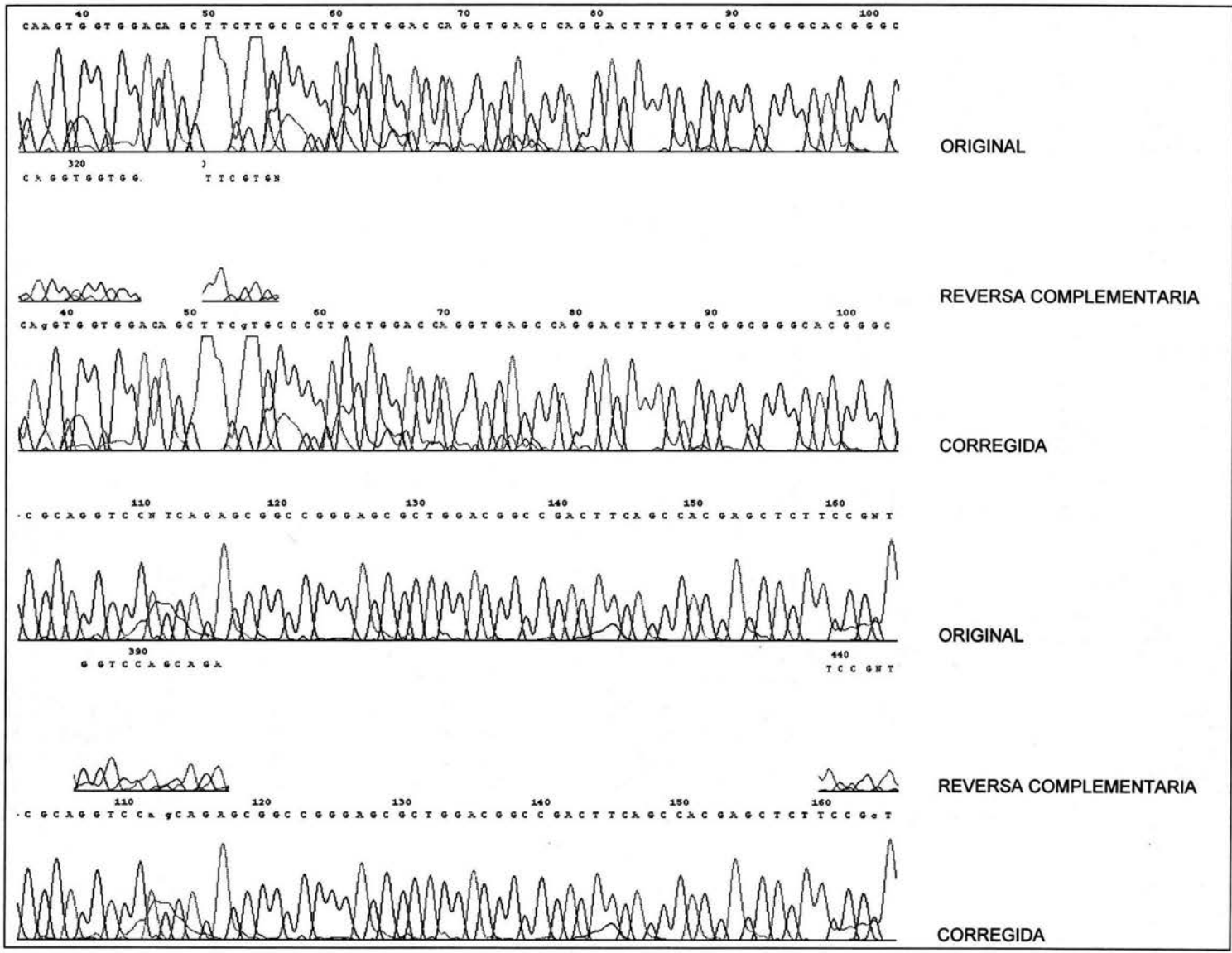


Figura R-5. Cromatogramas comparativos de las secuencias obtenidas experimentalmente (BigDye<sup>®</sup>; Perkin Elmer, U.S.A.) en ambos sentidos (5' → 3' superior y 3' → 5' media) a partir de la amplificación del fragmento de cDNA para el *Cyp11A1*. Se muestran los nucleótidos no identificados por el secuenciador en dirección 5' → 3' y su corrección para la obtención de la secuencia definitiva (cromatograma inferior). En el caso de la base en la posición 164 no fue posible resolver la falla en la lectura con la secuencia reversa complementaria, pero en el cromatograma original es claramente observable la lectura de una citosina, que concuerda con la secuencia publicada anteriormente en GenBank por Nomura et al. 1995.



Experimental..	-----	
Nomura, O.	accacttctggaaggaggagcttcacaacgtgcacaacatcatgcccagcaagtcc	360
Experimental..	-----	
Nomura, O.	agcgctttgggccatctacagggagaagttgggtgtctacgagagcgtgaatatcatca	420
Experimental..	-----	
Nomura, O.	gccccgcgatgcggccagctcttcaagtgcagaggggatgctgcccagcgttcagcg	480
Experimental..	-----	
Nomura, O.	tgccccatgggtggcataccgtgactaccgcaacaagccctacggcgtgctcctcaaga	540
Experimental..	-----TGTCGCCGAGG	12
Nomura, O.	caggggaggcctggcgtcg <b>GACCGCCTGACCCTGAAC</b> aaggaggtgcTGTCGCCGAGG	600
Experimental..	TGGTGGACAGCTTCGTGCCcTGCTGGACCAGGTGAGCCAGGACTTTgTGCGCGGGCAC	72
Nomura, O.	TGGTGGACAGCTTCGTGCCc <b>t</b> TGCTGGACCAGGTGAGCCAGGACTTT <b>t</b> TGCGCGGGCAC	660
Experimental..	GGGCGCAGGTCCAGCAGAGCGCGGGAGCGCTGGACGGCCGACTTCAGCCACGAGCTCT	132
Nomura, O.	GGGCGCAGGTCCAGCAGAGCGCGGGAGCGCTGGACGGCCGACTTCAGCCACGAGCTCT	720
Experimental..	TCCGCTTTGCCTGGAGTCTGTGTGCCACGTGCTGTATGGGGAACGCCTGGGGCTGTGTC	192
Nomura, O.	TCCGCTTTGCCTGGAGTCTGTGTGCCACGTGCTGTATGGGGAACGCCTGGGGCTGTGTC	780
Experimental..	AGGACTTTGTGGACCCAGAGGCACAGCAGTTCATCGACGCCGTCACCCTCATGTTCCACA	252
Nomura, O.	AGGACTTTGTGGACCCAGAGGCACAGCAGTTCATCGACGCCGTCACCCTCATGTTCCACA	840
Experimental..	CCACCTCCCCATGCTCTA <b>t</b> GTGCCACCCGCCTGCTCCGCCACCTCAACACCAAGACAT	312
Nomura, O.	CCACCTCCCCATGCTCTA <b>g</b> GTGCCACCCGCCTGCTCCGCCACCTCAACACCAAGACAT	900
Experimental..	GGCGTGACCACGTGCATGCTTGGGATGCCATCTTCACACAGGCTGACAAATGTATCCAAA	372
Nomura, O.	GGCGTGACCACGTGCATGCTTGGGATGCCATCTTCACACAGGCTGACAAATGTATCCAAA	960
Experimental..	ACGTTTACCGGGACATCCGGCTGCAACGCAAGAGCACCGAGGAGCACACGGGCATCCTCT	432
Nomura, O.	ACGTTTACCGGGACATCCGGCTGCAACGCAAGAGCACCGAGGAGCACACGGGCATCCTCT	1020
Experimental..	TCAGCCTCCTTGtnnnnnnn-----	453
Nomura, O.	TCAGCCTCCTTGtcaggacaagctgcccctggatgacatcaagccagcgtcaccgaga	1080
Experimental..	-----	
Nomura, O.	tgatggcgggcccgtggacacgacttccatgactctgcaatgggccatgctggagctgg	1140
Experimental..	-----	
Nomura, O.	cacgatccccggcatccaggagcggctgcgggcagaggtgctggcagccaagcaggagg	1200
Experimental..	-----	
Nomura, O.	cacaggggacaggtgaagatgctgaagagcatccgactgctcaaagccgcatcaagg	1260
Experimental..	-----	
Nomura, O.	agactctcaggctgcacccggtggcggtgacgctgcagaggtacaccacacaggaggtca	1320
Experimental..	-----	
Nomura, O.	tcctgcaggactaccgcatcccccaagacgctggtgcaggttggtctctacgccatgg	1380
Experimental..	-----	
Nomura, O.	gacgagaccctgaggtcttcccccaagcggagcagttcaaccctgagcgtggtggtga	1440

Figura R-8. Secuencia nucleotídica obtenida experimentalmente del amplificado por RT-PCR de la región estudiada del mensajero del gen *Cyp11A1* (línea superior) y su comparación con la secuencia del cDNA informada por Nomura y colaboradores (Genbank, 1995). Se destaca la secuencia utilizada como iniciador (subrayado doble) en la reacción de secuenciación con BigDye® (Perkin Elmer, U.S.A.). En las posiciones 621, 648 y 860 se encuentran las diferencias entre las secuencias de la región estudiada (minúsculas en negritas y subrayadas).

correspondiente al amplificado del transcrito obtenido a partir del tejido control tanto en tejido ovárico como testicular. Para cada una de las regiones del cerebro anterior, se obtuvo un patrón de bandeo específico, distinto del resultado del estudio de expresión realizado con el RNA control y gonadal. La banda correspondiente al tejido control y gonadal de cada uno de los pollos, se encontró representada dentro del conjunto de bandas de las dos regiones cerebrales estudiadas en ambos sexos, además de dos bandas de menor peso molecular a partir del RNA de tejido diencefálico y tres a partir de la región telencefálica en ambos sexos. Además, se obtuvo una banda adicional de intensidad considerable en el estudio sobre el tejido telencefálico de pollos machos, de un tamaño mayor (ligeramente menor a 615 pares de bases) al fragmento control y que no se encuentra representada en el patrón de bandeo obtenido del estudio sobre el tejido cerebral femenino (figura R-9). En todos los casos, al hacer la amplificación simultánea de la región del transcrito para la  $\beta$ -actina, se obtuvo una banda única y nítida, del peso molecular predicho. De la misma manera, la banda obtenida a partir de la amplificación del transcrito para la beta actina, a partir del RNA telencefálico, tuvo la misma intensidad para ambos sexos.

Se realizó el estudio de la expresión del *Cyp11A1* en tejido telencefálico en repetidas ocasiones, por medio de una triple purificación del RNA total en Trizol. Esto, con el fin de obtener RNA con un alto grado de pureza y evitar así el posible patrón de bandeo inespecífico obtenido con anterioridad. El resultado del análisis por RT-PCR a partir de una muestra ultra pura de RNA hizo desaparecer, casi en su totalidad, las bandas de menor peso molecular que el amplificado esperado, así como la banda de una longitud mayor a los 1000 pares de bases correspondiente a la amplificación del fragmento a partir del DNA genómico. Sin embargo, el fragmento de un peso molecular ligeramente mayor al del amplificado control observado previamente en el estudio de expresión del *Cyp11A1* en telencéfalo masculino, se mantuvo presente de manera muy clara (figura

R-10a). El grado de integridad del RNA total obtenido del tejido se comprobó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% / TAE 1X, justo antes de iniciar la reacción de transcripción inversa (figura R-10b).

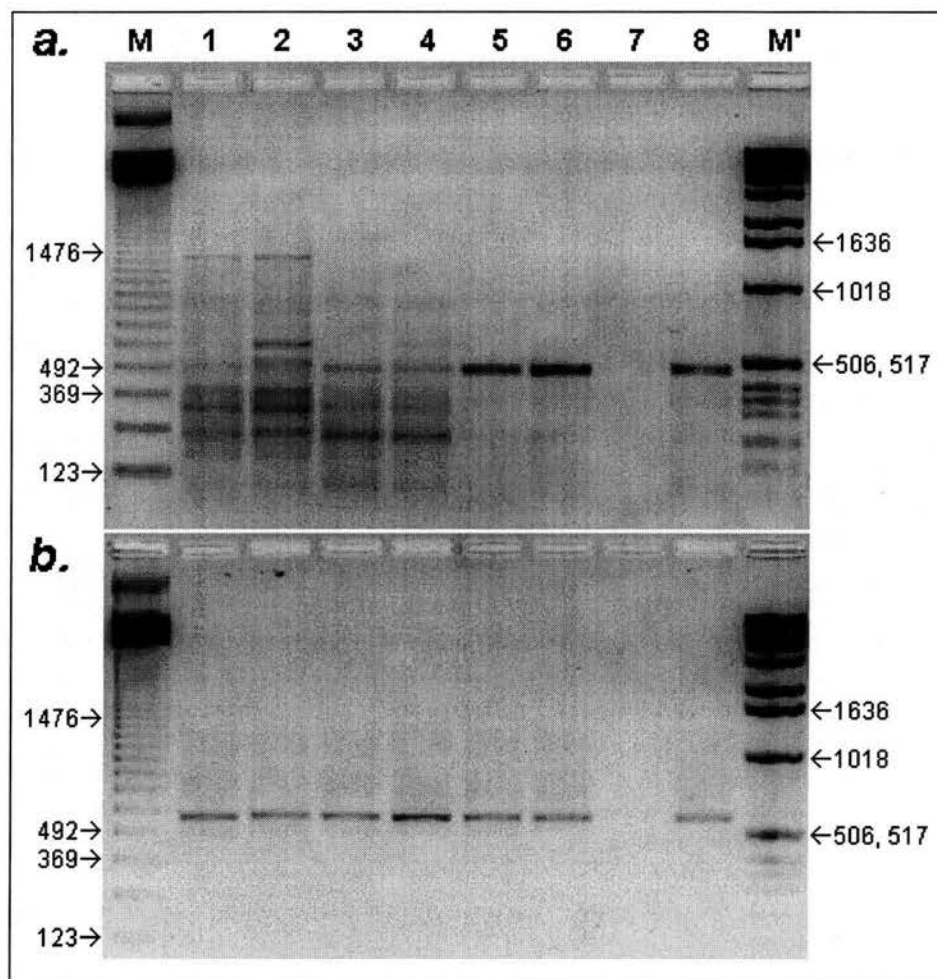


Figura R-9. (a.) Análisis de la expresión génica por RT-PCR del *Cyp11A1* en pollos estadio 45 (Hamburger, et al.) a partir de tejido telencefálico de hembra (carril 1) y macho (carril 2), diencefálico de hembra (carril 3) y macho (carril 4), comparado con la expresión ovárica (carril 5) y testicular (carril 6). Nótese el transcrito extra presente en el telencefalo de macho, de un peso molecular mayor al esperado. (b.) Análisis simultáneo de la expresión del gen de  $\beta$ -actina de las mismas muestras como control de la RT-PCR. Marcadores de peso molecular de 123 pb's (M), de 1 Kilo base (M') y la mezcla de reacción de RT-PCR (carril 7) en ambos casos y el mismo análisis sobre el tejido control (carril 8). Los productos de amplificación se muestran en una electroforesis en gel de agarosa (1.5%/TAE 1X) teñido con bromuro de etidio.



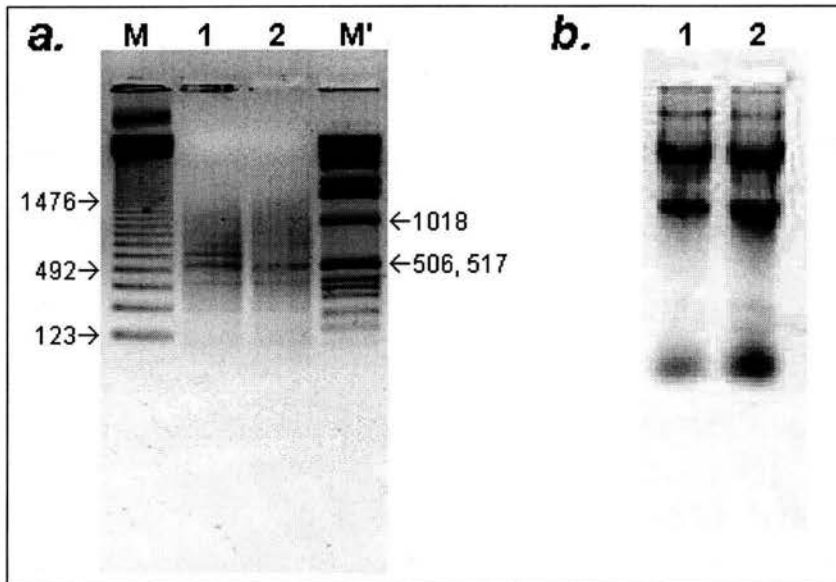


Figura R-10. (a.) Análisis por RT-PCR, de la expresión génica del *Cyp11A1* en tejido telencefálico de pollo macho (carril 1) y hembra (carril 2) estadio 45 (Hamburger, et al.) y marcadores de peso molecular de 123 pb's (M) y de 1 Kilo base (M'). (b.) RNA total extraído del tejido telencefálico de pollo macho (carril 1) y hembra (carril 2) a partir del cual se hizo el análisis de expresión por RT-PCR del recuadro "a.". Se pudo comprobar la presencia de un transcrito adicional para el citocromo en el tejido telencefálico masculino. Los productos de amplificación y el RNA total se muestran con electroforesis en gel de agarosa (1.5%/TAE 1X) teñido con bromuro de etidio.

### **Análisis de la biosíntesis de esteroides en la fracción mitocondrial.**

Las mediciones directas de la producción de pregnenolona por la fracción mitocondrial de los tejidos estudiados, llevadas a cabo por medio de Radio-Inmuno-Análisis (RIA) específico, reportan una producción esteroidea diferencial entre las dos regiones de cerebro anterior y el tejido gonadal de ambos sexos. Dicha diferencia esteroideogénica es estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) de acuerdo a la prueba de Scheffe (Figura R-11a. y b.), precedida por la prueba de análisis de varianza (ANOVA). El estudio en el tejido cerebral de los machos, hace evidente una mayor actividad esteroideogénica en el telencéfalo con respecto al diencefalo (Figura R-11a), mientras que en las hembras se observó el fenómeno inverso (Figura R-11b). El análisis comparativo de la biosíntesis cerebral de pregnenolona entre ambos sexos, muestra existe una marcada diferencia entre ambos sexos en la región correspondiente al diencefalo ( $p < 0.01$ ), diferencia de la

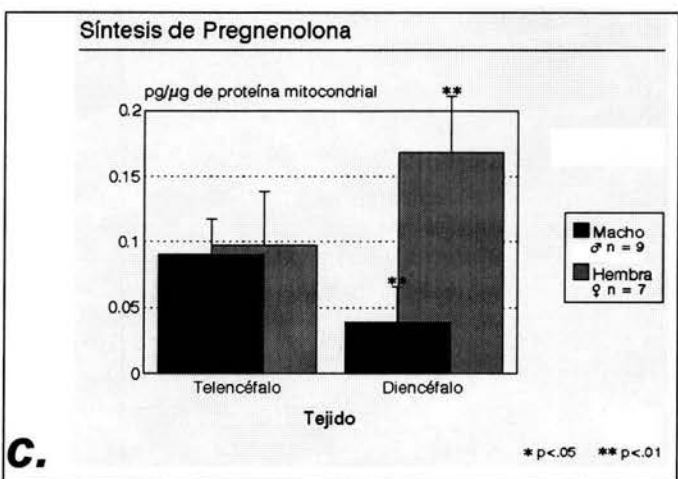
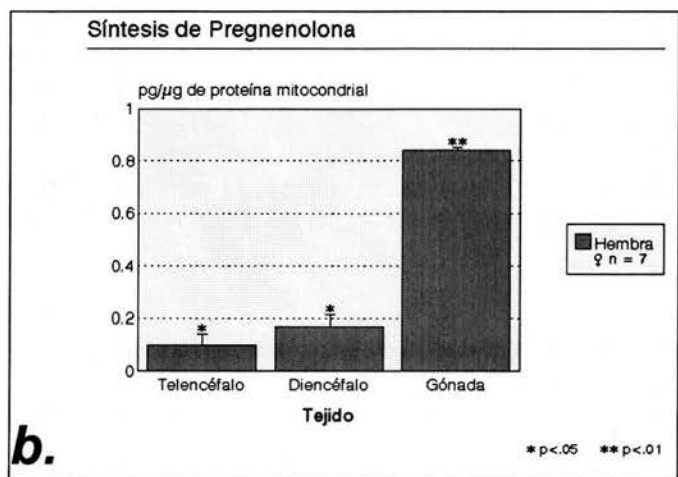
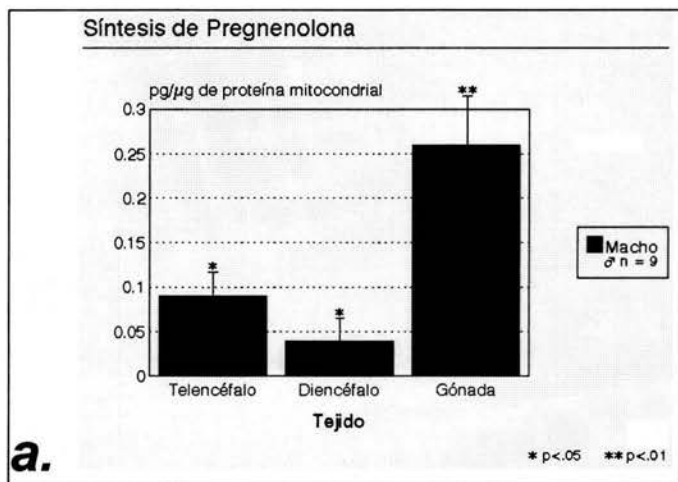


Figura R-11. Medición directa por Radio Inmuno Análisis (RIA) de la secreción de pregnenolona en tejido cerebral y gonadal de pollos de ambos sexos, a los 18 días de incubación (estadio 45, Hamburger et al.).

**a.** Comparación entre la síntesis esteroidea en las dos regiones de cerebro anterior y las gónadas de pollo macho y **b.** hembra, donde se muestra la diferencia entre la esteroidogénesis cerebral y gonadal ( $p < 0.01$ ) y entre las dos regiones de cerebro anterior ( $p < 0.05$ ). **c.** Análisis comparativo de la producción de pregnenolona entre el telencéfalo y diencéfalo de pollos machos y hembras, donde se presenta la marcada diferencia sexual en la esteroidogénesis diencefálica ( $p < 0.01$ ), mientras que el telencéfalo no muestra una diferencia significativa. Los resultados se presentan en picogramos de pregnenolona por microgramo de proteína mitocondrial. Se considera como diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$  (\*) y  $p < 0.01$  (\*\*) con la prueba no paramétrica de Scheffe, precedida por Análisis de Varianza (ANOVA).

región telencefálica, en la que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos sexos (Figura R-11c).

## DISCUSION

Las regiones del sistema nervioso central con un dimorfismo sexual se encuentran principalmente concentradas en el cerebro anterior, constituido por los dos hemisferios cerebrales (telencéfalo) y las regiones del epitálamo, tálamo, subtálamo, hipotálamo y la *pars neuralis* de la hipófisis (diencéfalo), que se originan a partir del prosencéfalo.

La porción estudiada del gen para el citocromo P450<sub>scc</sub> en este trabajo, se seleccionó de tal manera que contuviera intrones (3 y 4), para poder discriminar entre la amplificación del mensajero y del DNA genómico, en caso de que este último se encontrara presente en la muestra de RNA. Para la determinación de las secuencias utilizadas como iniciadores de reacción de PCR (polymerase chain reaction), se tuvo cuidado de no incluir las partes del gen codificantes para los dominios de asociación al grupo hemo o el sitio de unión a esteroides, ya que éstos presentan características similares entre los distintos citocromos de la superfamilia (Fig. D1). Al amplificar el DNA genómico con los iniciadores 5' y 3' de reacción para PCR (exones 3 y 5 respectivamente), se obtuvo un producto de una longitud entre 1353 y 1476 pb, a diferencia del producto de la reacción con el mRNA, que fue de 472 pb. Esto marca una diferencia clara entre los amplificados a partir de RNA y DNA genómico, además de establecer la alta especificidad de las secuencias de los iniciadores de reacción.

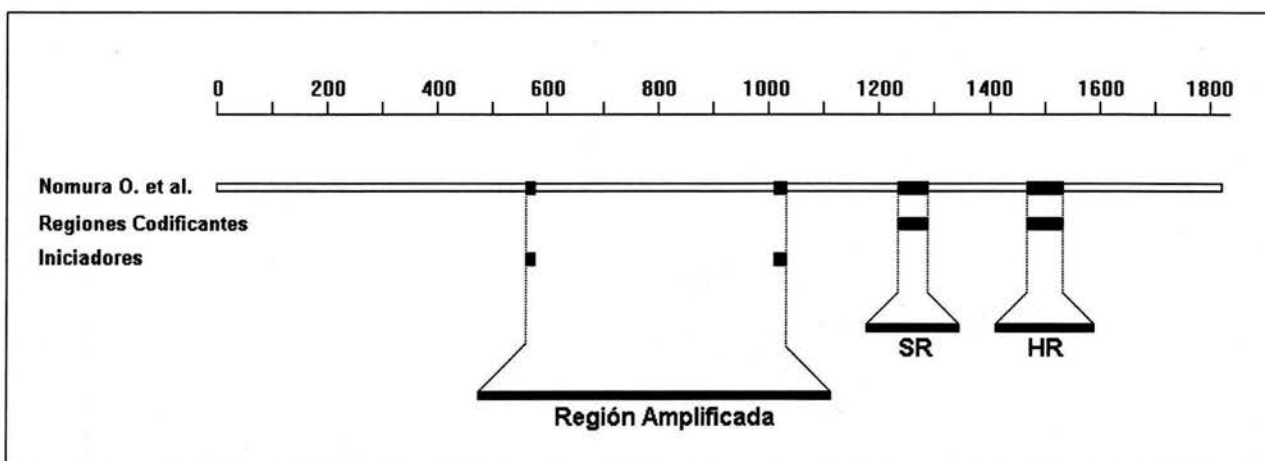


Fig D-1. Representación esquemática de la secuencia en cDNA del *CYP11A1*, donde se muestran las regiones codificantes para los dominios de asociación a esteroides (SR) y al grupo hemo (HR), en relación a la zona seleccionada para el estudio de expresión del citocromo P450<sub>scc</sub>.

La diferencia obtenida en la secuenciación del fragmento de amplificación en tres de los nucleótidos, con respecto a la publicada por Nomura y colaboradores (1997), no representa ninguna diferencia en el producto peptídico teórico resultante de la traducción (Chromas<sup>®</sup> 1.62; Technelysium, Australia), por lo que podría considerarse un polimorfismo génico entre la subespecie de *Gallus gallus* utilizada en Japón por Nomura y la del presente estudio (Fig. D-2). El patrón de expresión del *Cyp11A1* fue claramente distinto entre el tejido de cerebro anterior y el gonadal, ya que se muestra un conjunto de transcritos no presentes en el análisis hecho sobre el RNA gonadal. La expresión del gen en las regiones prosencefálicas estudiadas, mostró un patrón sexo-dependiente en la porción telencefálica. En el telencéfalo masculino, se obtuvo un fragmento adicional de mayor tamaño que el transcrito esperado de 472 pb, mientras que en el telencéfalo femenino, en el diencéfalo y en el tejido gonadal de ambos sexos, no se observó la existencia de dicho fragmento de amplificación.

Estos resultados sugieren una forma alternativa de procesamiento en la maduración del RNA mensajero (mRNA), determinada por la región cerebral en cuestión y el sexo del tejido cerebral. Estos resultados no se encuentran fuera de lógica, ya que se sabe que el *Cyp19* (citocromo P450 aromatasa ó P450arom) presenta un "splicing" alternativo tejido-específico, por lo que distintas secuencias del exón 1 se encuentran presentes en tejido neural, a diferencia de la forma expresada en el resto de los órganos esteroideogénicos (Honda et al., 1996; Agarwal et al., 1997; Conley et al., 1997; Simpson, 1997; Ramachandran et al., 1998; Kamat et al., 2002). La producción de hormonas esteroideas se encuentra bajo la influencia de las hormonas hipofisarias y la presencia del ACTH que regulan la transcripción de las enzimas de la superfamilia de los citocromos P450 (Simpson y Waterman, 1988) por la vía del Adenosin-mono-fosfato cíclico (cAMP). La activación de la transcripción no se encuentra determinada por las secuencias consenso de respuesta al cAMP (CRE/CREB), sino que cada uno de los genes es activado por una secuencia de respuesta (CRS) particular (Sewer y Waterman, 2003).

Nomura O. et al.	yrdyrnkpygvllktgeawrsDRLTLNKEVLS PQVVDSFVPLLDQVSQDFLRRARAQVQQ	180
Secuencia Esperada	-----DRLTLNKEVLS PQVVDSFVPLLDQVSQDFLRRARAQVQQ	39
Secuencia Obtenida	-----LSPQVVDSFVPLLDQVSQDFVRRARAQVQQ	30
Nomura O. et al.	SGRERWTADFSHELFRFALESVCHVLYGERLGLLQDFVDPEAQQFIDAVTLMFHTTSPML	240
Secuencia Esperada	SGRERWTADFSHELFRFALESVCHVLYGERLGLLQDFVDPEAQQFIDAVTLMFHTTSPML	99
Secuencia Obtenida	SGRERWTADFSHELFRFALESVCHVLYGERLGLLQDFVDPEAQQFIDAVTLMFHTTSPML	90
Nomura O. et al.	YVPPALLRHLNKTWRDHVHAWDAIFTQADKCIQNVYRDIRLQRKSTEEHTGILFSLLVq	300
Secuencia Esperada	YVPPALLRHLNKTWRDHVHAWDAIFTQADKCIQNVYRDIRLQRKSTEEHTGILFSLLV-	158
Secuencia Obtenida	YVPPALLRHLNKTWRDHVHAWDAIFTQADKCIQNVYRDIRLQRKSTEEHTGILFSLLV-	149
Nomura O. et al.	dklplddikasvtemmaggvdttsmtlqwamlelarspgigerlraevlaakqeaqgdrv	360
Secuencia Esperada	-----	
Secuencia Obtenida	-----	

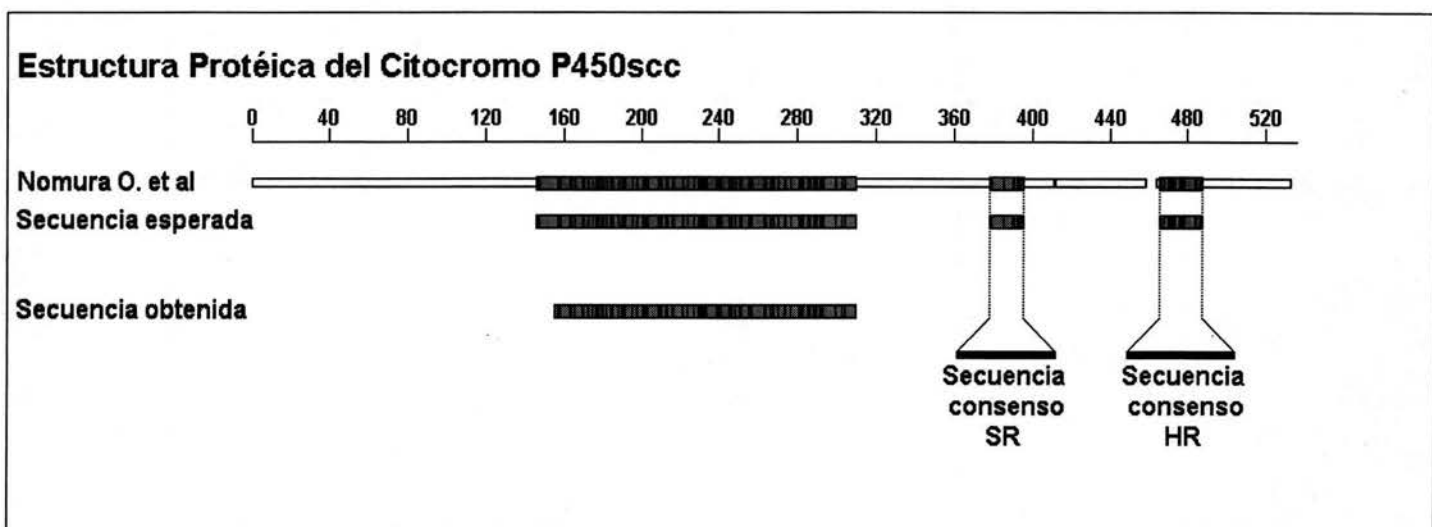


Figura D-2. Alineación comparativa (recuadro superior) de las secuencias de amino ácidos determinadas para el citocromo P450<sub>scc</sub> de pollo, de acuerdo a la publicada por Nomura O. et al. (1997), la secuencia aminoacídica esperada para la región del cDNA estudiada y la experimentalmente obtenida a partir de la secuenciación por BigDye® (Perkin Elmer, U.S.A) del fragmento amplificado, utilizando el programa Chromas® versión 1.62 (Technelysium, Australia).

Representación gráfica (recuadro inferior) de la alineación comparativa, donde se muestran las regiones consenso de la proteína para la asociación a esteroides (SR) y al grupo hemo (HR).

El factor esteroideogénico 1 (SF-1) también se asocia a secuencias específicas de la región promotora del *Cyp11A1*, que participan de una manera importante en la regulación tejido-

específica y hormono-dependiente de la biosíntesis esteroidea de suprarrenal, gonadal y en los demás órganos esteroideogénicos. Al parecer, factores como el c-Jun se encuentran también relacionados con la regulación de la expresión de los genes de la superfamilia P450 (Guo et al., 2003).

Se sabe que la regulación de la transcripción de los genes que codifican enzimas esteroideogénicas es distinta en el sistema nervioso central y periférico, con respecto al resto de los tejidos productores de hormonas esteroideas. Una secuencia de regulación transcripcional importante del *Cyp11A1* de rata se encuentra entre los nucleótidos -130 y -94, a la que se unen dos proteínas nucleares (70 y 86 kDa respectivamente) que fueron identificadas como subunidades del antígeno autoinmune Ku. Los miembros de la familia Sp de factores de transcripción también reconocen la misma secuencia (-130/-94) de una manera ontológicamente regulada en el SNC, con predominancia de Sp2 y Sp4 en etapas tempranas del desarrollo y Sp1 y Sp4 en etapas posteriores (Hammer et al., 2003).

Hasta ahora, además de la regulación de los niveles de transcripción (Kohchi et al., 1998; Takase et al., 1999; Ukena et al., 2001), no existe evidencia de algún procesamiento alternativo del mensajero para el gen del citocromo P450<sub>scc</sub>, que se lleve a cabo de una manera tejido- o sexo-específica. En este trabajo se obtuvo evidencia de la posibilidad de una regulación cotranscripcional o postranscripcional del *Cyp11A1* distinta entre las regiones telencefálica y diencefálica del cerebro anterior, así como un dimorfismo sexual en dicha regulación, debido al patrón de bandedo diferente en la electroforesis de la reacción de RT-PCR en gónada y cerebro, así como para ambas regiones del cerebro anterior y la diferencia sexual entre los telencéfalos masculino y femenino.

Esta observación sobre el patrón de expresión del *Cyp11A1* no es inusual, ya que los genes codificantes para los receptores a las hormonas folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH) presentan un patrón de expresión fragmentado en diversas especies (Heckert et al., 1992; Houde et al., 1994; Zhang et al., 1997). El procesamiento alternativo del mRNA es un

mecanismo fundamental que incrementa la versatilidad de la información contenida en un solo gen, favoreciendo la modulación de la función para la cual codifica.

A pesar de la diferencia observada en la expresión del *Cyp11A1* en la región telencefálica, no se observó una diferencia significativa entre la biosíntesis de pregnenolona entre los telencéfalos de ambos sexos. En estudios realizados en individuos adultos de anfibios de reproducción estacional, se ha encontrado una regulación región-específica de la producción de esteroides neuroactivos en el cerebro anterior. Especialmente, la progesterona y el sulfato de pregnenolona se acumulan de manera independiente a los esteroides de origen gonadal y suprarrenal, en mayor medida en la región diencefálica y cerebelar, además de tener fluctuaciones estacionales de acuerdo con la etapa reproductiva de la especie en cuestión. Esta biosíntesis esteroidea parece estar relacionada con la longitud del periodo luminoso (fotoperiodo) a diferencia de los cambios de temperatura, que no producen variaciones significativas en la neuroesteroidogénesis (Inai, 2003; Takase, 1999).

En el presente trabajo, se observó una mayor síntesis de pregnenolona en la región diencefálica de las hembras de *Gallus gallus*, contrario a lo obtenido en cerebros masculinos. De acuerdo con los resultados obtenidos, Matsunaga y sus colaboradores (2002) encontraron también, una mayor actividad androgénica y estrogénica en el diencefalo de codorniz.

La diferencia en la producción de neuroesteroides por la región diencefálica femenina podría estar asociada con la regulación del *Cyp11A1* durante las etapas críticas del desarrollo de los dimorfismos en los cerebros masculinos y femeninos, posiblemente relacionados con la modulación de funciones reproductivas, cuyos centros de control se encuentran mayormente representados en el diencefalo como serían el área preóptica, el hipotálamo anterior, la región dorsolateral del tálamo, además de algunas otras estructuras del cerebro medio (mesencéfalo) así como regiones ventrales del telencéfalo (Matsunaga et al., 2001). Aunque a lo largo de las décadas dedicadas al neurodesarrollo se hayan hecho grandes avances en el papel que juegan las hormonas sexuales (neuroactivas) en la formación de estructuras neurales y en la



determinación y modulación de conductas reproductivas de varias especies, no se ha encontrado la forma en que los neuroesteroides participan en dicho proceso de diferenciación neural. La evidencia que aporta este trabajo, en cuanto a las diferencias sexuales y tejido-dependientes en la expresión del gen, cuya enzima da inicio a la esteroidogénesis, sugiere que los neuroesteroides participan de manera importante en la diferenciación sexual del sistema nervioso central, dada la diferencia entre ambos sexos tanto en la expresión del *Cyp11A1* así como en la tasa de síntesis de neuroesteroides. Debido a que en las aves el género heterocromosómico es el femenino, sería lógico pensar que la esteroidogénesis neural que participa en la diferenciación sexual de las regiones dimórficas fuera a la inversa de la biosíntesis hormonal en tejido neural de mamíferos, donde el género heterocromosómico son los machos. La biosíntesis mayor del diencefalo femenino observada en este estudio, aporta sustento para tal idea.

La secuenciación de los transcritos obtenidos a partir del tejido telencefálico de los machos y su comparación con los transcritos del diencefalo y gónada de ambos sexos, aportará una evidencia mas clara con respecto a la forma en que es procesado el RNA durante la expresión del *Cyp11A1* y de la forma en que se regula la biosíntesis de neuroesteroides.

Una vez determinadas las secuencias de los fragmentos obtenidos en la RT-PCR, se podría conocer la forma en la que se regula la expresión tejido-dependiente del *Cyp11A1*, por medio de bloqueos específicos sobre su expresión (transcripción y/o traducción) y la biosíntesis de esteroides en tejido neural o gonadal y suprarrenal. De esta manera solamente los neuroesteroides o los esteroides gonadales y suprarrenales, estarían presentes durante las etapas críticas del desarrollo de caracteres sexuales del tejido neural. Con un análisis de este tipo, sería posible estudiar el desarrollo de los dimorfismos sexuales en los núcleos o áreas cerebrales y en caso de no encontrar diferencias entre los dos sexos y entre las distintas regiones del cerebro anterior, tanto en la expresión del *Cyp11A1* y/o en la conversión del

colesterol al primero de sus metabolitos esteroideos, se podría establecer la importancia de los esteroides propios del tejido neural en la diferenciación sexual del sistema nervioso central.

## CONCLUSION

Este trabajo aporta evidencia nueva en cuanto a la regulación de la transcripción del *Cyp11A1*, ya que se obtuvo un patrón de expresión distinto entre el tejido neural y el gonadal (tanto testículo como ovario). Además de la expresión tejido-específica, se observaron distintos conjuntos de transcritos en cada una de las regiones cerebrales (telencéfalo y diencefalo), por lo que la regulación de la transcripción es región-específica. La diferencia fundamental en la regulación de la expresión del gen para este citocromo entre los dos sexos, fué la de un transcrito adicional en el telencéfalo masculino no observado en el patrón de expresión en telencéfalo femenino, así como en ningún otro de los tejidos estudiados.

La esteroidogénesis se encontró también con un patrón región-específica y sexo-dependiente dentro del cerebro anterior, siendo mayor la telencefálica que la diencefálica para los machos, a diferencia de las hembras, donde se observó una tasa de biosíntesis mayor en la región diencefálica.

Aunque la expresión diferencial sexo-dependiente del *Cyp11A1* pudiera estar relacionada con las diferencias en los niveles de biosíntesis de neuroesteroides, solamente se encontró una diferencia esteroidogénica entre los diencefalos masculinos y femeninos, sin que se hiciera evidente entre las regiones telencefálicas.

Es posible pensar que las diferencias en la expresión del gen y la tasa de biosíntesis de esteroides tenga una relación con la diferenciación sexual del cerebro de las aves, debido a los patrones observados en el desarrollo de este trabajo. Los procesos en el establecimiento del sexo cerebral son sumamente complejos y es por eso que los avances en el conocimiento de los factores que influyen en la organización, determinación y diferenciación de las regiones que se encuentran involucradas en la recepción, procesamiento y respuesta a los estímulos del

medio, son de gran importancia, ya que proporcionan información referente a los pasos en la determinación de la conducta.

A través de estudios del mismo tipo a lo largo de distintas etapas ontogénicas, desde aproximadamente 4 días de incubación y hasta la madurez sexual, sería posible determinar no solo si existen diferencias entre ambos sexos, sino que se conocería la posible existencia de variaciones en estos mecanismos determinantes del desarrollo neural para cada uno de los géneros. Se ha obtenido evidencia en diferentes especies de vertebrados, incluyendo al humano, de fenómenos de variaciones ontológicas y diferencias sexuales en la expresión de genes esteroideogénicos y la biosíntesis de esteroides (Kohchi et al., 1998; Watzka et al., 1999; Petratos et al., 2000), sin que hasta la fecha se haya logrado dilucidar la relación que existe entre la expresión génica, biosíntesis esteroidea neural y la conducta.

## REFERENCIAS

- Absil P, Papello M, Viglietti-Panzica C, Balthazart J, Panzica G. **The medial preoptic nucleus receives vasotocinergic inputs in male quail: a tract-tracing and immunocytochemical study.** *J Chem Neuroanat* 24:27-39; (2002).
- Acampora D, Gulisano M, Simeone A. **Genetic and molecular roles of Otx homeodomain proteins in head development.** *Gene* 246:23-35; (2000).
- Agarwal VR, Ashanullah CI, Simpson ER, Bulun SE. **Alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women.** *J Clin Endocrinol Metab* 82:70-74; (1997).
- Anónimo. **A conversation with James D. Watson.** *Sci Am* 288:49-51; (2003).
- Arnold AP. **Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior.** *Horm Behav* 30:495-505; (1996).
- Arnold AP. **Sexual differentiation of the zebra finch song system: positive evidence, negative evidence, null hypothesis and a paradigm shift.** *J Neurobiol* 33:572-584; (1997).
- Arnold AP. **Experimental analysis of sexual differentiation of the zebra finch brain.** *Brain Res Bull*;44:503-507; (1997a).
- Auger AP, Perrot-Sinal TS, Auger CJ, Ekas LA, Tetel MJ, McCarthy MM. **Expression of the nuclear receptor coactivator, cAMP response element-binding protein, is sexually dimorphic and modulates sexual differentiation of neonatal rat brain.** *Endocrinology* 143:3009-3016; (2002).
- Baulieu EE, Robel P. **Neurosteroids: a new brain function?** *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:395-403; (1990).
- Beaudoin C, Blomquist CH, Bonenfant M, Tremblay Y. **Expression of the genes for 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and cytochrome P450<sub>scc</sub> during syncytium formation by human placental cytotrophoblast cells in culture and the regulation by progesterone and estradiol.** *J Endocrinol* 154:379-387; (1997).
- Boncinelli E. **Homeobox genes and disease.** *Curr Opin Genet Dev* 7:331-337; (1997).
- Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. **Cerebrus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer.** *Nature* 382:595-601; (1992).
- Brown RE. **Steroid and thyroid hormone receptors.** *in An Introduction to Neuroendocrinology* pp. 147-190; Cambridge University Press, UK (2001).
- Carruth LL, Reiser I, Arnold AP. **Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation.** *Nat Neurosci* 5:933-934 (2002).
- Casto JM, Ball GF. **Early administration of 17beta-estradiol partially masculinizes song control regions and alpha2-adrenergic receptor distribution in european starlings.** *Horm Behav* 30:387-406 (1996).
- Choi EJ, Ha CM, Choi J, Kang SS, Choi WS, Park SK, Kim K, Lee BJ. **Low-density cDNA array-coupled to PCR differential display identifies new estrogen-responsive genes during the postnatal differentiation of the rat hypothalamus.** *Brain Res Mol Brain Res* 97:115-128; (2001).

- Chung BC, Guo IC, Miller WL. **Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes.** *Steroids* 62:37-42; (1991)
- Conley A, Corbin J, Smith T, Hinshelwood M, Liu Z, Simpson E. **Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene?** *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:407-413; (1997).
- Crawford PA, Sadosky Y, Milbrandt J. **Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic lineage.** *Mol Cell Biol* 7(17):3997-4006; (1997).
- Crews D. **Sex determination: where environment and genetics meet.** *Evol Dev* 5(1):50-55; (2003).
- Degtyarenko KN. **Structural domains of P450-containing monooxygenase systems.** *Protein Eng* 8(8):737-747; (1995).
- Duguay Y, Lapointe A, Lavallee B, Hum DW, Rivest S. **Cloning of murine TReP-132, a novel transcription factor expressed in brain regions involved in behavioral and psychiatric disorders.** *Mol Psychiatry* 8(1):39-49; (2003).
- Echelard Y, Epstein DJ, St.-Jacques B, et al. **Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.** *Cell* 75:1417-1430; (1993).
- Elbrecht A, Smith RG. **Aromatase activity and sex determination in chickens.** *Science* 255:467-470; (1992).
- Gerardin DC, Pereira OC. **Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor.** *Pharmacol Biochem Behav* 71(1-2):301-305; (2002).
- Gizard F, Lavallée B, DeWitte F, Teissier E, Staels B, Hum DW. **The transcriptional regulating protein of 132 kDa (TReP-132) enhances P450scc gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells.** *J Biol Chem* 277(42):39144-39155; (2002).
- Grisham W, Tam A, Greco CM, Schlinger BA, Arnold AP. **A putative 5alpha-reductase inhibitor demasculinizes portions of the zebra finch song system.** *Brain Res* 750:122-128 (1997).
- Gruss P, Walther C. **Pax in development.** *Cell* 69:719-722; (1992).
- Guo IC, Hu MC, Chung BC. **Transcriptional regulation of CYP11A1.** *J Biomed Sci* 10(6):593-598; (2003).
- Hamburger V, Hamilton HL. **A series of normal stages in the development of the chick embryo.** *J Morphol* 88:49-92; (1951).
- Hammer F, Compagnone NA, Vigne JL, Bair SR, Mellon SH. **Transcriptional regulation of P450scc gene expression in the embryonic rodent nervous system.** *Endocrinology* Oct 23 [Epub ahead of print]; (2003).
- Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP. **The world according to hedgehog.** *Trends Genet* 13:14-21; (1997).
- Hansen CS, Marion CD, Steele K, George S, Smith WC. **Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr3.** *Development* 124:483-492; (1997).
- Harland R. **Neural induction.** *Curr Opin Genet Dev* 10:357-362; (2000).

- Heckert LL., Daley IJ, Griswold MD. **Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene.** *Mol Endocrinol* 6:70-80; (1992).
- Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. **Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neutralizing activity.** *Cell* 77:283-295; (1994).
- Honda S, Harada N, Takagi Y. **The alternative exons 1 of the mouse aromatase cytochrome P-450 gene.** *Biochim Biophys Acta* 1305(3):145-150 (1996).
- Houde A, Lambert A, Saumande J, Silversides DW, Lussier JG. **Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues.** *Mol Reprod Dev* 39:127-135; (1994).
- Hum DW, Aza-Blanc P, Miller WL. **Characterization of placental transcriptional activation of the human gene for P450scc.** *DNA Cell Biol* 14:451-463; (1995).
- Hunt P, Gulisano M, Cook M, et al. **A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head.** *Nature* 353,6347:861-864; (1991).
- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. **Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of steroid hydroxylases.** *Mol Endocrinol* 8:654-662; (1994).
- Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. **The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus.** *Mol Endocrinol* 9:478-486; (1995).
- Inai Y, Nagai K, Ukena K, Oishi T, Tsutsui K. **Seasonal changes in neurosteroid concentrations in the amphibian brain and environmental factors regulating their changes.** *Brain Res* 959(2):214-25; (2003).
- Jessell TM, Sanes JR. **The decade of developing brain.** *Curr Opin Neurobiol* 10:599-611; (2000).
- Joyner AL. **Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development.** *Trends Genet* 12:15-20; (1996).
- Kamat A, Hinshelwood MM, Murry BA, Mendelson CR. **Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans.** *Trends Endocrinol Metab* 13(3):122-128; (2002).
- Kempton B. **Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing.** *TIG* 8:7-8; (1992).
- Kendrick AM, Schlinger BA. **Independent differentiation of sexual and social traits.** *Horm Behav* 30:600-610; (1996).
- Kohchi C, Ukena K, Tsutsui K. **Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes p450scc, P450c17 and 3beta-HSD in the postnatal rat brain.** *Brain Res* 801(1-2):233-238; (1998).
- Lacbawan FL, Muenke M. **Central Nervous System Embryogenesis and Its Failures.** *Pediatr Dev Pathol* 5(5):425-447; (2002).
- Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, et al. **Neural induction by the secreted polypeptide noggin.** *Science* 262:713-718; (1993).
- Lin T, Wang D, Nagpal ML, Chang W. **Recombinant murine tumor necrosis factor-alpha inhibits cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and insulin-like growth factor-1 gene expression in rat Leydig cells.** *Mol Cell Endocrinol* 101:111-119; (1994).

- Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T, Anderson DJ. **Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells.**  
*Genes Dev* 5:1524-1537; (1991).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with Folin-phenol reagent.**  
*J Biol Chem* 193:265-275; (1951).
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. **A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation.**  
*Cell* 77:481-490; (1994).
- Mamluk R, Wolfenson D, Meidan R. **LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin.**  
*Domest Anim Endocrinol* 15:103-114; (1998).
- McEwen BS. **Steroid hormones and the brain: linking "nature" and "nurture".**  
*Neurochem Res* 13(7):663-9; (1988).
- McGinnis W, Krumlauf R. **Homeobox genes and axial patterning.**  
*Cell* 68:283-302; (1992).
- Margulis L, Sagan D. **A universe in heat.**  
in *What is Sex?* pp. 15-47; Simon & Shuster Editions, New York, U.S.A. (1997).
- Marnellos G, Deblandre GA, Mjolsness E, Kintner C. **Delta-Notch lateral inhibitory patterning in the emergence of ciliated cells in Xenopus: experimental observations and a gene network model.**  
*Pac Symp Biocomput* :329-340; (2000).
- Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K. **Expression and localization of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/c17,20-lyase in the avian brain.**  
*Brain Res* 899(1-2):112-122; (2001).
- Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K. **Androgen biosynthesis in the quail brain.**  
*Brain Res* 948(1-2):180-185; (2002).
- Matteson KJ, Chung BC, Urdea MS, Miller WL. **Study of cholesterol side-chain cleavage (20,22 desmolase) deficiency causing congenital lipid adrenal hyperplasia using bovine-sequence P450scc oligodeoxyribonucleotide probes.**  
*Endocrinology* 118(4):1296-1305; (1986).
- Mellon SH, Deschepper CF. **Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain.**  
*Brain Res* 629:283-292; (1993).
- Miller WL. **Molecular biology of steroid hormone synthesis.**  
*Endocrine Rev* 9:295-318; (1988).
- Monte D, DeWitte F, Hum DW. **Regulation of the human P450scc gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300.**  
*J Biol Chem* 273:4585-4591; (1998).
- Moore CC, Hum DW, Miller WL. **Identification of positive and negative placenta-specific basal elements and a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human gene for P450scc.**  
*Mol Endocrinol* 6:2045-2058; (1992).
- Morohashi KI, Sogawa K, Omura T, Fuji-Kuriyama Y. **Gene structure of human cytochrome P-450(SCC), chlesterol desmolase.**  
*J Biochem* 101(4):879-887; (1987).
- Morrish BC, Sinclair AH. **Vertebrate sex determination: many means to an end.**  
*Reproduction* 124(4):447-457; (2002).

- Nomura O, Nakabayashi O, Nishimori K, Mizuno S. **The cDNA cloning and transient expression of a chicken gene encoding cytochrome P-450<sub>scc</sub>.**  
*Gene* 185:217-222; (1997).
- Nunez JL, Sodhi J, Juraska JM. **Ovarian hormones after postnatal day 20 reduce neuron number in the rat primary visual cortex.**  
*J Neurobiol* 52:312-321; (2002).
- Oonk, RB, Krasnow, JS, Beattie WG, Richards JS. **Cyclic AMP-dependent and -independent regulation of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450-SCC) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea: cDNA and deduced amino acid sequence of rat P-450-SCC.**  
*J Biol Chem* 264:21934-21942; (1989).
- Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Balthazart J. **The sexually dimorphic medial preoptic nucleus of quail: a key brain area mediating steroid action on male sexual behavior.**  
*Front Neuroendocrinol* 17(1):51-125; (1996).
- Parker KL & SchimmermBP. **Transcriptional regulation of the adrenal steroidogenic enzymes.**  
*Trends Endocrinol Metab* 4:46-50; (1993).
- Pedernera E, Gómez Y, Velázquez P, Juárez-Oropeza MA, González del Pliego M. **Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken.**  
*Gen Comp Endocrinol* 71:153-162; (1988).
- Petratos S, Hirst JJ, Mendis S, Anikijenko P, Walker DW. **Localization of p450<sub>scc</sub> and 5 $\alpha$ -reductase type-2 in the cerebellum of fetal and newborn sheep.**  
*Brain Res Dev Brain Res* 123(1):81-86; (2000).
- Puelles L, Rubenstein JL. **Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization.**  
*Trends Neurosci* 16:472-479; (1993).
- Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK. **Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation**  
*Endocrinology* 143:3727-3739; (2002).
- Ramachandran B, Schlinger BA, Arnold AP, Campagnoni AT. **Zebra finch aromatase gene expression is regulated in the brain through an alternate promoter.**  
*Gene* 240(1):209-216; (1999).
- Richards JS, Hedin L. **Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization.**  
*Annu Rev Physiol* 50: 441-463 ; (1988).
- Richards JS. **Hormonal control of gene expression in the ovary.**  
*Edocr Rev* 15:725-751; (1994).
- Rubenstein JLR, Rakic P. **Genetic control of cortical development.**  
*Cereb Cortex* 9:521-523; (1999).
- Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, Simburger K, Milbrandt J. **Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450<sub>side-chain-cleavage</sub> enzyme in the placenta, and have normal embryonic serum levels of corticosteroids.**  
*Proc Natl Acad Sci USA* 92:10939-10943; (1995).
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK, De Robertis EM. **Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer specific homeobox genes.**  
*Cell* 79:779-790; (1994).



- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis EM. **Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in Xenopus.**  
*Nature* 376:333-336; (1995).
- Segovia S, Guillamon A. **Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors.**  
*Brain Res Brain Res Rev* 18(1):51-74; (1993).
- Sewer MB, Waterman MR. **ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex.**  
*Microsc Res Tech* 61(3):300-307; (2003).
- Simpson ER, Michael MD, Agarwal BR, Hinshelwood MM, Bulun SE, Zhao Y. **Cytochromes P450 11: expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage.**  
*FASEB J* 1129-1136; (1997).
- Simpson ER, Waterman MR. **Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH.**  
*Annu Rev Physiol* 50: 427-440; (1988).
- Smith WC, McKendry R, Ribisi S Jr. Harland RM **A nodal related gene defines physical and functional domain within the Spemann organizer.**  
*Cell* 82:37-46; (1995).
- Smith CA, Smith MJ, Sinclair AH. **Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation.**  
*Gen Comp Endocrinol* 113(2):187-196; (1999).
- Springer ML, Wade J. **The effects of testicular tissue and prehatching inhibition of estrogen synthesis on the development of courtship and copulatory behavior in zebra finches.**  
*Horm Behav* 32:46-591; (1997).
- Takase M, Ukena K, Yamazaki T, Kominami S, Tsutsui K. **Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes.**  
*Endocrinology* 140(4):1936-1944; (1999).
- Tanabe Y, Jessell TM. **Diversity and pattern in the developing spinal cord.**  
*Science* 274:1115-1123; (1996).
- Tanaka T, Strauss III JF. **Stimulation of luteal mitochondrial cholesterol side-chain cleavage by cardiolipin.**  
*Endocrinology* 110:1592-1598; (1982).
- Tobet SA. **Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation.**  
*Eur J Neurosci* 16:373-376; (2002).
- Torres Maldonado LC, Landa Piedra A, Moreno Mendoza N, Marmolejo Valencia A, Meza Martinez A, Merchant Larios H. **Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*.**  
*Gen Comp Endocrinol* 129(1):20-26; (2002).
- Ukena K, Usui M, Kohchi C, Tsutsui K. **Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change.**  
*Endocrinology* 139:137-147; (1998).
- Ukena K, Honda Y, Lea RW, Tsutsui K. **Developmental changes in progesterone biosynthesis and metabolism in the quail brain.**  
*Brain Res.* 898(1):190-194; (2001).
- Voutilainen R, Miller WL. **Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc [corrected], in human steroidogenic tissues.**  
*Proc Natl Acad Sci USA* 84:1590-1594; (1987).

Wade J, Gong A, Arnold AP. **Effects of embryonic estrogen on differentiation of the gonads and secondary sexual characteristics of male zebra finches.**  
*J Exp Zool* 278:405-411; (1997).

Wade J. **Zebra finch sexual differentiation: the aromatization hypothesis revisited.**  
*Microsc Res Tech* 54:354-363; (2001).

Waterman MR, Mason JI, Zuber MX, John ME, Rodgers RJ, Simpson ER. **Control of gene expression of adrenal steroid hydroxylases and related enzymes.**  
*Endocr Res* 12:393-408; (1986).

Watzka M, Bidlingmaier F, Schramm J, Klingmuller D, Stoffel-Wagner B. **Sex- and age-specific differences in human brain CYP11A1 mRNA expression.**  
*J Neuroendocrinol* 11(12):901-905; (1999).

Weeks JC, Levine RB. **Steroid hormone effects on neurons subserving behavior.**  
*Current Opinion in Neurobiology* 5:809-815; (1995).

Wolpert L, Boddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E. **Development of the Nervous System.**  
in *Principles of Development* Oxford University Press, New York (1998).

Zhang C, Shimada K, Saito N, Kansaku N. **Expression of messenger ribonucleic acids of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in granulosa and theca layers of chicken preovulatory follicles.**  
*Gen Comp Endocrinol* 105:402-409; (1997).