

**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

---

---

***"Genes de expresión sexualmente  
dimórfica en hipotálamo de ratas  
neonatales (P6)."***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A:**

**Q.F.B. FABIOLA MORALES MANDUJANO**

**TUTOR:**

**DR. JORGE A. LARRIVA SAHD**

**Juriquilla, Querétaro, Mayo de 2007.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Neuroanatomía del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, bajo la dirección del Dr. Jorge A. Larriva Sahd. Durante la realización de este trabajo, la alumna contó con una beca de financiamiento de sus estudios de posgrado (Maestría) otorgada por CONACYT (becaria No. 181356).

# AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por la nobleza de seguir dándome oportunidades para mi crecimiento profesional ahora en un posgrado. En deuda por siempre!!

Al **Instituto de Neurobiología** por su calidad de enseñanza, investigadores, infraestructura, y las posibilidades de crecimiento y éxito que brinda. Totalmente agradecida por estos 3 años de mi vida!

Mi mayor gratitud al **Dr. Jorge A. Larriva Sahd** por los conocimientos transmitidos, el apoyo, guía, consejos, enseñanzas, ayuda, paciencia y dirección durante todo mi proceso formativo en el Instituto. Gracias por su tiempo, palabras, cariño mostrado ( y que es correspondido) y por creer siempre en mí!

Al **Dr. Alfredo Varela Echavarría** por la guía, conocimientos transmitidos, comentarios y dudas aclaradas. Gracias por su buena disposición para conmigo!

A la **Dra. Magda Giordano** por su apoyo incondicional, palabras, consejos, tiempo, ayuda, charlas, empatía, cariño, sonrisas, y por tenderme la mano una y otra vez. Muchas gracias por arroparme en su laboratorio como una hija más; la quiero, respeto y admiro mucho!!!

Al **Dr. Raúl Paredes** por su apoyo y ayuda, por su enorme paciencia, sabiduría y capacidad para escuchar, resolver problemas y ayudar a los demás (incluyéndome), por sus opiniones, consejos y guía. Gracias por su comprensión y amistad!

Al **Dr. Manuel Salas** por su acervo de conocimientos compartidos, por su gran calidad científica y humana, por la confianza depositada en mi persona, por sus palabras, comentarios acertados, sugerencias, consejos, preocupación e interés en mi trabajo. Toda mi admiración, respeto, cariño y gratitud!

A la **Dra. Anaid Antaramián** por sus comentarios acertados, correcciones, interés y consejos sobre mi trabajo. Gracias!

Toda mi gratitud para la **Q.F.B. Gema Martínez Cabrera**, Técnica Académica del laboratorio, por su gran ayuda técnica y personal, apoyo, palabras, cariño, interés y siempre buena disposición. Gracias Gema no lo habría logrado sin ti!

Agradecimientos especiales a **Victor Hugo Pérez**, Técnico del laboratorio, por su incondicional apoyo, gran ayuda, por la resolución de problemas, asesorías, consejos, tiempo, charlas y amistad. Mil gracias amigo!!

A la **M. en C. Carmen Mejía Viggiano**, Técnica Académica del laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, por su gran ayuda y apoyo técnico, por transmitirme sus conocimientos, por su importante contribución y aportaciones en las diferentes etapas del trabajo experimental, y por su siempre su buena disposición. Gracias por tu cariño y apoyo Carmelita!

Al **F.M. Leopoldo González**, de la Unidad de Imágenes, por su valiosa colaboración en la instalación de programas y bases de datos para análisis de resultados en la fase experimental correspondiente a los Microarreglos. Gracias Polo por tu buena disposición!

A la **M. en C. Leonor Casanova Rico**, jefa de la Unidad de Enseñanza, por su gran apoyo personal y profesional, por su dedicación, disciplina, buena disposición, profesionalismo, calidad humana, cariño y amistad. Gracias por interceder por los alumnos y ser nuestro angelito de la guarda Leo!

Al **M.V.Z. José Martín García Servín**, responsable del bioterio, por su buen trabajo y disposición, por su atención y gentileza, profesionalismo y buen trato, colaborando importante en el abastecimiento de animales experimentales a lo largo del trabajo.

A la **Bibl. Pilar Galarza Barrios**, encargada de la biblioteca, así como a Rafael Silva Cruz e Ignacio Caballero Navarro, por su apoyo en la recuperación de artículos, libros y revistas.

Al **Dr. Michael Wegner**, del Centro de Neurobiología Molecular de la Universidad de Hamburgo, Alemania, por la donación de la sonda SOX10 indispensable para el desarrollo de la parte experimental de Hibridaciones *in situ*. Gracias por su desinteresada colaboración!

Todo mi agradecimiento al **Dr. Rogelio Hernández Pando** por su invaluable contribución a mi trabajo de tesis permitiéndome crecer profesionalmente, por su ayuda técnica y logística, conocimientos transmitidos, consejo, interés y apoyo en todo momento durante mi estancia y fuera de ella. Muchas gracias por acogerme como parte de su equipo!

Mi mayor gratitud al laboratorio de Patología Experimental del INNSZ, en especial a **Dra. Diana E. Aguilar León** por su gran apoyo académico y técnico, por las lecciones y consejos, por su paciencia, dedicación, buena disposición y sobre todo por su cariño y amistad. A Yuri, Clau, Dulce, Erendira, Alex, Jorge, Yu-Mei, y Diego, gracias por su solidaridad, compañerismo, trabajo en equipo, apoyo, ayuda y el cariño diario que rompe la rutina. Gracias a todos!!

A mis **compañeros y amigos** de clase quienes con su granito de arena contribuyeron a mi formación académica y personal, compartiendo buenos y malos momentos conmigo, GRACIAS: Chucho, Nuri, Yunuén, Gus, Susy, Vero, Carlos, y Gris.

Al **M. en C. Raúl Mojica Espinosa** por su constante e incondicional apoyo, por su comprensión, consejos, ayuda, crítica, cariño y valiosa cooperación durante esta etapa de mi vida.

Finalmente, gracias a todos aquellos que me ayudaron a culminar una meta más en la carrera de mi vida.

# DEDICATORIAS

## **A mi linda familia:**

Gracias otra vez por estar ahí, siempre caminando junto a mí sin importar a donde. Una meta más que cosechamos juntos familia. De ustedes, para ustedes y por ustedes. Los quiero mucho: Pa's, Babrish y Gabo.

## **A mi otra familia:**

Para los que siempre están presentes y me han visto crecer en todos aspectos. Porque son parte de mí y yo de ustedes: Abues, tíos, primos y sobrinos..... Cucú, Gore, Home, Dany, Flaco, Mayis, Garo, Fresa, Gut, y no acabaría pero..... Los quiero.

## **A mis queridos "roomies":**

Gracias por compartir dos años de mi vida, conocerme, aguantarme y hasta quererme. Por su valiosísima amistad, cariño, paciencia, interés y entrega, por la familia Telerín que hicimos juntos, muchas gracias. Los quiero: Mi Clau, Chucho "Ñoño", y Dani "Gasolina".

## **A mis nuevos amigos:**

El tiempo pasa volando, y al voltear y partir descubro tanta gente detrás de mi que ahora forma parte de mi vida y de mi historia. Los extrañaré: Claudita, Chucho, Dany, Carlos, Gemita, Vic, Gina (Bruja), Nuri (Chebis), Yunuén (Elías y Josué), Gus, Solecito, Bolo, Nancy, Itzel, Carmelita, Gloria, Lupe, Liz, Vero, Ale, Felipe, Dianis, Yuri y Dulce.

## **A mis viejos amigos:**

Seguimos acumulando historias y momentos, pero no es que estemos viejos, solo que nos conocimos muy pequeños. Mi cariño: pKita, Claus, Cony, Mema, Benne, Neto, Erick, Rosy y secu\_21.

## **A mis 5 laboratorios:**

Tan afortunada de haber formado parte de 5 laboratorios al mismo tiempo. Todo mi agradecimiento y cariño tanto a los Doctores titulares como a todos sus integrantes: Lab. Dr. Larriva, a los que forman y formaron parte de él; Lab. Dra. Giordano, por adoptarme sin quejarse; Lab. Dra. Aceves, por aguantarme; Lab. Dr. Ataúlfo, por dejarme estar; Lab. Dr. Hernández Pando, por hacerme parte del equipo. Gracias a todos!

## **A mi segunda familia:**

A ustedes mi cariño y respeto por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, gracias por su confianza y apoyo incondicional, por creer en mí, por los momentos y sonrisas compartidas. Para ustedes un poquito de mi agradecimiento en esta tesis.

Gracias familia Mojica Espinosa: Sra. Yola, Sr. Raúl, Chopis, Yolis, Tutuchito, Tía Bechita, Tía Martha, Luis, y por supuesto a ti precioso.

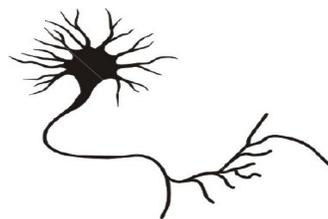
## **Finalmente, quiero dedicar esta tesis a la personita que camina a mi lado en cada paso que doy : Raúl**

Para ti amor por ser la mayor motivación de cada uno de mis logros, por apoyarme incondicionalmente, por levantarme cuando caigo y alentarme a seguir, por enseñarme a compartir, por escuchar y decir, por llorar y reír, por darle sentido a la "paradoja" de la vida, por estar allí para mí y conmigo siempre..... TE AMO.

MUCHAS GRACIAS mi vida!

"La verdadera medida de nuestra valía se compone de todos los beneficios que los demás han obtenido de nuestro éxito."

CULLEN HIGHTOWER



# INDICE GENERAL

1. Introducción.....	12
2. Antecedentes.....	15
2.1 Dimorfismo Sexual	15
2.1.1 Sexo Genético	15
2.1.2 Establecimiento del dimorfismo sexual	17
2.2 Sistema Nervioso Central y Dimorfismo Sexual	21
2.2.1 Hipotálamo	21
3. Aspectos metodológicos.....	29
3.1 Conceptos básicos	30
3.2 Microarreglos (MA)	31
3.3 Hibridación <i>in situ</i>	36
3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa <i>in situ</i> (PCR-IS)	40
3.4.1 Desnaturalización del DNA	40
3.4.2 Alineamiento de las cadenas de DNA	40
3.4.3 Extensión de las cadenas de DNA	40
4. Objetivos.....	45
4.1 Objetivo General	45
4.2 Objetivos Particulares	45
4.3 Hipótesis	45
5. Justificación.....	46
6. Métodos.....	47
6.1 Microarreglos (MA)	47
6.2 Hibridación <i>in situ</i>	48
6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa <i>in situ</i>	50

7. Resultados.....	52
7.1 Microarreglos (MA)	52
7.2 Hibridación <i>in situ</i>	68
7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa <i>in situ</i>	68
8. Discusión.....	74
9. Conclusiones.....	85
10. Apéndice 1.- Protocolos Experimentales.....	86
11. Apéndice 2.- Reactivos.....	93
12. Tabla de abreviaturas.....	95
13. Referencias.....	98

## RESUMEN

Las diferencias estructurales (i.e. dimorfismo sexual) han sido documentadas en diversas áreas cerebrales, especialmente en aquellas involucradas en el comportamiento y la endocrinología de la reproducción. A pesar de que en el cerebro de mamíferos se han encontrado numerosas proteínas cuyos mRNA's se expresan de manera sexualmente dimórfica, aún no es claro si este dimorfismo es el resultado de diferencias genómicas sexuales de especies con cromosomas heteromórficos, o bien, debido a los efectos inducidos por las hormonas gonadales perinatalmente.

El presente estudio fue diseñado para explorar el patrón de expresión de RNA mensajero en ratas albinas de ambos sexos en el lapso conocido como "periodo crítico" de desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC). Para determinar una posible expresión dimórfica sexual en el hipotálamo, se emplearon microarreglos de oligonucleótidos (MWG-Rat5K-5760 genes) con muestras de ratas albinas de ambos sexos y de seis días de nacidas. Un total de 20 hipotálamos de cada sexo fueron probados por cada ensayo, logrando un total de 4 ensayos. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico para microarreglos "R"; obteniendo 64 genes con un 50% de sobre-expresión a partir de la mediana, algunos de ellos de sobre-expresión en ratas hembra y otros tantos en ratas macho. Además se encontró que de estos 64 mRNA's, 16 de ellos pueden considerarse potencial y directamente involucrados en el desarrollo del dimorfismo sexual del hipotálamo. De tal manera fueron seleccionados dos de estos últimos genes para indagar sobre su sitio de expresión en el tejido (hipotálamo), para lo cual, decidimos comparar entre dos técnicas de biología molecular *in situ*: Hibridación *in situ* versus PCR *in situ*. Los resultados finales fueron muy satisfactorios, encontrando los mismos perfiles de expresión con ambas técnicas y confirmando de esta manera los resultados de los microarreglos. Así, nuestra hipótesis fue confirmada demostrando que existe un patrón genético inherente a cada sexo.

Finalmente, este trabajo representa el primer ensayo que intenta vincular el aspecto genético con el establecimiento del dimorfismo sexual del SNC, por lo que cobra gran importancia.

## ABSTRACT

Structural sex differences (i.e., sexual dimorphism) have been documented in numerous brain areas, especially in those involved in behavioral and endocrinological aspects of reproduction. Although in the mammalian forebrain numerous proteins and/or their corresponding mRNA's have been found to be sexually dimorphic, it is not clear whether these dimorphisms result from genomic sex difference of species having heteromorphic sex chromosomes, or they are the result from the perinatally inductive effect(s) of gonadal sex hormones. The present study was designed to set a normative foundation in the sexual pattern of mRNA expression in normal albino rats from both sexes within the so-called "critical period" of CNS development.

In order to determine a possible sexually dimorphic gene expression in the hypothalamus, spotted microarrays (MWG-Rat5K-5760 genes) were performed in six day-old albino rats from either sex. We used a total of twenty rat hypothalami from each sex, and the results obtained from the scanning (Stanford Software) phase were then treated in the "R" Software package, remaining with a total of 64 genes with 50% of over-expression starting from the median. It was found that from these 64 mRNA's, 16 of them were found to be potentially involved in the development of sexual dimorphism. From the 16, we selected two of them in order to localize their expression, comparing between two molecular biology techniques (In Situ Hybridization and In Situ PCR). The final results were very successful, finding as far as we can tell, the same expression profile with both techniques, confirming the microarray's data.

Finally, this work represents the first assay trying to link the genetic aspect with the Sexual Dimorphism of the Central Nervous System.

## 1. INTRODUCCION

La vitalidad de cualquier especie depende en buena medida de la generación de una progenie de individuos con características genotípicas y fenotípicas análogas, con capacidad adaptativa a su entorno ambiental. Así mismo, la perpetuidad de las especies se ha debido tanto a diferencias individuales entre su población como a su capacidad de reproducción. Con este fin, los mamíferos han desarrollado un amplio repertorio de estrategias que permiten una interacción externa (el medio y patrones sociales) y una interna (fisiológica) de manera exitosa para la especie.

Dentro de las estrategias de sobrevivencia en los individuos con cromosomas sexuales heteromórficos, la fecundación exitosa depende de la interacción de sus miembros, para ese fin, el conjunto de patrones motores y conductuales que operan durante el proceso de fecundación se denominan "conducta sexual". Puesto que los eventos que conforman a la conducta sexual son por lo general específicos a los individuos de cada sexo, se dice que la conducta sexual es disimilar o sexualmente dimórfica.

El establecimiento de estos patrones conductuales, los circuitos neuronales específicos que los controlan, la activación y regulación de los mismos, y además las claras diferencias morfofisiológicas entre los sexos, pueden agruparse en lo que se conoce como DIMORFISMO SEXUAL (DS). Más aún, el DS es toda aquella diferencia sexo-específica tanto a nivel estructural como funcional en el individuo.

En los mamíferos, el DS se encuentra determinado tanto por factores de origen genético (cromosomas) como epigenético (hormonas por ejemplo), de tal forma que las características sexuales de cada individuo se establecen durante la etapa específica del desarrollo en la que el tejido es susceptible a la inducción de cambios durante su diferenciación, lapso conocido como Periodo Crítico (PC).

En el caso de los pequeños mamíferos utilizados en el laboratorio, el PC comprende el último tercio del desarrollo intrauterino y aproximadamente las primeras dos semanas posteriores al nacimiento.

Resumiendo, el DS involucra todos los eventos morfogenéticos y fisiológicos que resultan en el apareamiento, lo que implica la existencia de un proceso dinámico sujeto a un programa secuencial, ordenado e interrelacionado entre órganos y tejidos; y que se lleva a cabo en etapas consecutivas desde el desarrollo embrionario hasta después del nacimiento (PC) en el caso de los mamíferos incluyendo al hombre (Woodson y Gosrki, 2000).

Anatómicamente suele encontrarse DS en diversos tejidos y órganos, principalmente relacionados con las funciones reproductoras, siendo relevante el sistema nervioso central (SNC) como el encargado de ejecutarlas y regularlas; de especial importancia son las áreas asociadas a los patrones conductuales ya mencionados.

En lo referente al SNC, el DS se manifiesta en diferencias en tamaño nuclear, número neuronal, densidad sináptica, número de fibras, y cantidad de neurotransmisores (Beyer, 1999); mientras que las propiedades funcionales del cerebro, dependen de la organización de circuitos neurales complejos que se forman durante el desarrollo, bajo la influencia tanto de programas determinados genéticamente, como de factores ambientales (v.gr. micro ambiente celular) (Bailey y Kandel, 1993). El SNC presenta importantes diferencias sexuales estructurales en particular en sus áreas y núcleos relacionados con los aspectos endocrinológicos y conductuales de la reproducción (Arai, Matsumoto, y Nishiuka, 1985).

La aparición y regulación de las funciones de reproducción y apareamiento por la secreción de gonadotropinas por la hipófisis, fue postulada desde principios de 1900. Así, Marshall y Jolly notaron que si a una hembra adulta previamente gonadectomizada se le trasplantaba un ovario funcional, se reinstauraba la ovulación (Marshall y Jolly, 1907).

En 1936, Pfeiffer demostró que la extirpación de ovarios en animales recién nacidos no evita que las ratas hembra se desarrollen como adultos capaces de mantener un ciclo ovulatorio normal, después de un trasplante de ovario. Por otro lado, la implantación de testículos al nacimiento en neonatos hembra, causaba una pérdida permanente de la capacidad de ovulación. De tal forma, que se planteó en aquella época la idea, de que la capacidad de ovulación dependía del genotipo femenino más que de la presencia de los ovarios, aunque la existencia de testículos podía impedirla.

Pfeiffer también mostró, que los machos castrados al nacimiento, desarrollaban una liberación cíclica de gonadotropinas ovulatorias al transplantarles un ovario en etapas adultas. De sus estudios concluyó ovulación que tanto hembras como machos tenían el potencial de desarrollar el mecanismo hormonal que induce la cíclica (Pfeiffer, 1936).

Unos años más tarde en 1978, Roger A. Gorski encontró que las hipófisis de machos eran capaces de desarrollar ciclos estrales, y mantener las condiciones de embarazo y lactancia, cuando eran trasplantadas a hembras adultas, proponiendo que la glándula hipofisiaria no era sexualmente diferenciada, si no que las diferencias sexuales residían en el cerebro (Gorski, 1974).

Los primeros estudios en las que se compararon cerebros masculinos y femeninos no permitieron establecer diferencias anatómicas entre ellos, a excepción del tamaño, acorde con la masa corporal del varón. Por ello fue relevante el descubrimiento hecho en 1978 por un estudiante de Roger A. Gorski y colaboradores, quienes notaron una diferencia inherente a un grupo de células en la región preóptica medial del hipotálamo de la rata. Este núcleo presentaba mayor tamaño (hasta 7 veces) en el macho (Gorski, Gordon, Shryne, y Southam, 1978.)

Posteriormente, Gorski mostró que el dimorfismo sexual en el tamaño del núcleo medial preóptico se adquiere durante el PC de desarrollo y que la supresión de testosterona por castración del macho recién nacido provoca feminización en tamaño del núcleo. Más aún, la administración perinatal de testosterona en la hembra preñada masculiniza el tamaño del núcleo hipotalámico de la progenie femenina.

Estas observaciones llevaron a Gorski a proponer la denominación del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (NSD-APO) (Gorski, Csernus, y Jacobson, 1981). Así, la identificación de diferentes núcleos del hipotálamo de rata con DS justifica el empleo de esta estructura para los estudios de la presente tesis.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las diferencias estructurales (i.e. dimorfismo sexual) han sido documentadas en diversas áreas cerebrales, especialmente en aquellas involucradas en el comportamiento y la endocrinología de la reproducción. A pesar de que en el cerebro de mamíferos se han encontrado numerosas proteínas cuyos mRNA's se expresan de manera sexualmente dimórfica, aún no es claro si este dimorfismo es el resultado de diferencias genómicas sexuales de especies con cromosomas heteromórficos, o bien, debido a los efectos inducidos por las hormonas gonadales perinatalmente.

El presente estudio fue diseñado para explorar el patrón de expresión de RNA mensajero en ratas albinas de ambos sexos en el lapso conocido como "periodo crítico" de desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC). Para determinar una posible expresión dimórfica sexual en el hipotálamo, se emplearon microarreglos de oligonucleótidos (MWG-Rat5K-5760 genes) con muestras de ratas albinas de ambos sexos y de seis días de nacidas.

## HIPOTESIS

♂ Los perfiles de expresión genética en el hipotálamo de rata en el día postnatal 6 son sexualmente dimórficos.

♂ Las dos técnicas empleadas para la visualización de la expresión *in situ* son igualmente eficientes.

## 2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

### 2.1 *Dimorfismo sexual*

Para poder comprender los eventos implicados en la diferenciación sexual del SNC, es necesario primeramente dilucidar y analizar los patrones inherentes a la genética en la determinación del sexo.

#### 2.1.1 SEXO GENÉTICO.

En 1870, Mendel sugirió que la determinación sexual podría ser resultado de los fenómenos de herencia y segregación (Mendel, 1950). Por otro lado, desde inicios de la genética, se propuso que la expresión genética del sexo se explica por la presencia de dos tipos de genes sexuales: los genes que determinan el sexo y los genes básicos para el sexo; encontrándose los primeros en los cromosomas sexuales, y los segundos en los autosómicos (Müller, 1923).

Posteriormente, Morescalchi retomando estas ideas, señaló que puesto que la mayoría de los individuos derivan de padres con sexos diferentes, el método más económico desde el punto de vista genético, es mantener una relación 1:1 entre machos y hembras. A nivel fenotípico, el sexo estaría determinado por la acción reguladora de sustancias químicas durante el desarrollo, de manera que los alelos sexuales pueden o no iniciar la síntesis de una hormona típica del sexo heterogamético (Morescalchi, 1992).

A nivel básico, la determinación sexual genética de los mamíferos deriva de la base cromosómica de la determinación sexual, es decir, de la presencia o ausencia del cromosoma sexual Y, que contiene la información genética necesaria para el desarrollo del sexo masculino y actúa como actor dominante de tales efectos. Una de las razones de peso que apoya este hecho, es la presencia de un *locus* genético único codificado en el cromosoma Y conocido como *Factor Determinante Testicular* (FDT), que es un componente determinante en el desarrollo del testículo, y otras proteínas relacionadas.

Hacia la 7ª semana en el humano y la 1ª en roedores, comienza la diferenciación gonadal, la cual es de forma activa en XY (masculino) y pasiva en XX (*femenino*). Una vez que se ha diferenciado la gónada (testículo), se suceden cambios en las estructuras genitales que habían sido idénticas en ambos sexos hasta la 7ª en humano y 1ª semana en roedor (conducto de Wolf, conducto de Müller, seno urogenital). En el macho, por efecto de la testosterona se desarrolla de forma activa el conducto de Wolf, produciéndose a la vez a nivel testicular, hormona antimülleriana que hace que se presente regresión del conducto de Müller. En ausencia de testosterona, habrá desarrollo en forma pasiva del conducto de Müller e involución del conducto de Wolf.

La diferenciación sexual hormono-dependiente en el macho se pone en marcha por la producción y actuación de tres hormonas secretadas por el testículo fetal: la testosterona, la hormona antimülleriana y la Ins.L-3 (insuline-like 3, citocina de la familia insulinoide), producida por las células de Leydig, dotada de una acción similar a la insulina (insulin-like) e implicada en la migración testicular. En la diferenciación sexual femenina hay una triple ausencia de producción: de testosterona, de hormona antimülleriana y de Ins.L-3, que mantiene los ovarios en el abdomen y al mismo tiempo el gen Wnt-4, presente en el ovario fetal, inhibe la producción de testosterona.

Volviendo a la determinación sexual, se admite actualmente que varios genes están implicados en la evolución de la gónada indiferenciada:

- ♀SF1 (Factor esteroideogénico 1)
- ♀WT-1 (supresor del tumor de Wilms)
- ♀Lim-1 (un gen de la caja homeobox)
- ♀SRY (familia de genes clave en la determinación testicular)

El SF-1 juega un papel decisivo en la diferenciación sexual masculina, de hecho se ha demostrado que el SF1 regula la actividad de dos enzimas clave en la esteroideogénesis fetal: la 17-alfa-hidroxilasa y la 3-beta-hidroxiesteroide-deshidrogenasa; el SF-1 controla así la producción de andrógenos fetales. Adicionalmente, SF-1 interacciona con la Ins.L-3, implicada en el desarrollo de los testículos y, por lo tanto en la migración testicular.

El gen de la HAM (hormona antimülleriana) representa uno de los modelos de expresión de un gen específico del sexo masculino. El SF-1 regula la producción de HAM por el testículo fetal (y postnatal) activando la transcripción del gen de la hormona antimülleriana además de otros factores de transcripción (WT-1, SF-1 y GATA-4, un factor de transcripción expresado entre otros por las células gonadales); en donde el concepto de "dosis" de estos genes aparece aquí como algo fundamental, ya que la pérdida de alguno de los alelos de los genes codificados por autosomas conduce a una patología específica de la determinación del sexo.

### 2.1.2 ESTABLECIMIENTO DEL DIMORFISMO SEXUAL.-

Además de las influencias por expresión del material genético involucrado, el ambiente hormonal durante el periodo crítico del desarrollo contribuye en gran medida al establecimiento de las diferencias sexuales del SNC.

Actualmente se ha aceptado la idea de que las hormonas sexuales ejercen efectos activadores y efectos organizadores sobre el cerebro. Los efectos activadores son transitorios y son los que por lo general inducen las hormonas sexuales en el cerebro adulto. Por otro lado, los efectos organizadores son aquellos que resultan en modificaciones permanentes de la estructura y función cerebral y ocurren, fundamentalmente, durante el periodo crítico de cada especie (Arnold, Breedlove, 1985). Por ejemplo, se ha descrito en machos, que los andrógenos (testosterona) permanecen incrementados por al menos dos semanas después del desarrollo de los genitales, atraviesan la barrera hematoencefálica y son convertidos a estradiol, el cual se une a receptores cerebrales de estrógenos que subsecuentemente regulan la transcripción genética. La expresión genética mediada por el estradiol induce la organización permanente del neurodesarrollo a través de una cascada de mecanismos que promueven diferenciación neuronal, diferentes patrones de formación neuronal, muerte celular programada (apoptosis) y sinapsis específicas en el cerebro del macho en relación a la hembra; presentándose un efecto organizador.

En paralelo y seguido de la diferenciación gonadal determinada genéticamente, el factor crítico para el DS es la secreción hormonal del testículo (Wilson, Griffin, Leshin, y George, 1981). En el caso de los órganos reproductores internos, todos los mamíferos tienen al inicio de la gestación, primordios genitales tanto para el fenotipo masculino como para el femenino. El primordio testicular produce hormona inhibitoria Mulleriana, que inhibe el desarrollo de los órganos internos femeninos (Vigier, Picard, Bezar, y Josso, 1981), permitiendo el posterior desarrollo de los conducto Wolfianos inducidos por las hormonas esteroides testiculares como se comentó previamente.

Para la diferenciación de genitales externos, ambos fenotipos parten de un mismo punto de salida ya que son idénticos, en donde las hormonas testiculares inducen a los primordios genitales indiferenciados hacia el fenotipo masculino, mientras que su ausencia condiciona el desarrollo de genitales femeninos (Wilson, et al, 1981).

En el caso del SNC, el PC de diferenciación sexual se refiere a la etapa perinatal, en donde el cerebro en desarrollo es proclive al efecto de las hormonas de origen gonadal. En el caso del macho, la testosterona (TE) en el PC entra por difusión pasiva a las células y es convertida a estradiol (E2) en el citoplasma celular vía enzimática por la “aromatasa”, siendo este proceso fundamental y necesario para la diferenciación sexual (McEwen, Lieberburg, Chaptal, y Krey, 1977). El E2 se une a su receptor (ER) nuclear alterando el proceso transcripcional hacia la producción de proteínas que inducen cambios en la densidad sináptica, en la neuritogénesis, en la mitosis o en la apoptosis celular, entre otros. Cambios que permanecieran a lo largo de la vida del individuo, proceso conocido como “defeminización del SNC” (Parsons, Rainbow, y McEwen, 1984). Aunque el ovario de hembras neonatales produce pequeñas cantidades de E2, este es secuestrado en el torrente sanguíneo por la alfa-feto proteína (AFP), quedando imposibilitado para acceder al cerebro de la hembra (Toran-Allerand, 1984) y por lo tanto la defeminización no ocurre, desarrollándose de forma pasiva el fenotipo femenino. En resumen, el desarrollo normal del SNC de la hembra ocurre en ausencia de E2, mientras que el macho requiere de éste, el cual obtiene mediante su síntesis a partir de la TE.

Los cambios estructurales inducidos durante el PC presentan repercusiones funcionales a largo plazo, por ejemplo, en una rata hembra adulta, las hormonas gonadales actúan en el cerebro para inducir receptividad sexual o “lordosis” ante el estímulo de la monta de un macho; y si este DS no fue oportunamente inducido en el PC, dicha conducta no se presenta en el apareamiento (Gorski, 1974).

Sin embargo, también existen reportes de cultivos celulares de embriones de rata mostrando que las neuronas dopaminérgicas del diencefalo, pueden desarrollar diferencias sexuales morfológicas y funcionales en ausencia de hormonas esteroides (Reisert, Engele, y Pilgrim, 1989), lo que sugiere un contexto genético para su diferenciación además del epigenético (ambiente hormonal en este caso).

Con el advenimiento de la biología molecular, surgió la posibilidad de establecer los sustratos genómicos de la diferenciación sexual del SNC. Entre sus aportaciones más importantes, destacan las que detallan la activación de ciertos genes cuya expresión subyace a los efectos esteroidogénicos, como lo son las modificaciones en la síntesis de enzimas, receptores hormonales, neurotrofinas y neurotransmisores, entre otros; es decir, se atribuye a los efectos esteroides gonadales el papel de transductor de señales hormonales (Toran-Allerand, Singh, y Setalo, 1999).

Otros genes relacionados con el cromosoma sexual Y, y que se han caracterizado como sexualmente dimórficos, son: *Usp9y*, *Ube1y*, *Smcy*, *Eif2s3y*, *Uty* y *Dby*. Su expresión ha sido detectada en cerebro de machos y en hembras XY, y no requiere de secreciones testiculares. Además, existen seis genes homólogos para el cromosoma X (*Usp9x*, *Ube1x*, *Smcx*, *Eif2s3x*, *Utx*, y *Dbx*) que son expresados en el cerebro y, en etapas adultas, sus transcritos son expresados en mayores cantidades en las hembras que en los machos, independientemente de la inactivación de uno de los cromosomas X (Xu, Burgoyne, y Arnold, 2002). Incluso, se ha desarrollado la hipótesis de que los genes situados en los cromosomas sexuales participan directamente sobre la diferenciación sexual del cerebro y la conducta reproductiva (De Vries, 2002); aunque no se puede descartar la existencia de los genes contenidos en cromosomas somáticos en el desarrollo del DS del SNC.

Finalmente, el DS presenta un periodo de diferenciación que varía entre especies, puede ser prenatal, perinatal o postnatal, dependiendo del grado de maduración del SNC al nacimiento que presente la especie (Gorski, 1983).

Inclusive dentro de la misma especie, la diferenciación sexual de una cierta función difiere temporalmente, en términos de sensibilidad hormonal y de la identidad del esteroide gonadal responsable de esa diferenciación (Christensen y Gorski 1978; Gorski, Csernus, y Jacobson, 1981). Además es posible encontrar evidencia de el DS de una función en una especie pero no en otra (Vale, Ray, y Vale, 1972), es decir, funciones similares pueden diferir entre especies en términos de DS. Además, el DS se encuentra determinado tanto por factores genéticos como epigenéticos.

## **2.2. Sistema Nervioso Central y Dimorfismo Sexual.-**

### **2.2.1 HIPOTÁLAMO**

Estudios en distintas especies de mamíferos han demostrado que en la región hipotalámica del diencefalo se encuentran localizados grupos neuronales que están directamente implicados en la reproducción, ya sea regulando la conducta sexual o bien la secreción hormonal necesaria para activar los diferentes procesos reproductivos. Por lo tanto, el hipotálamo siendo el principal centro regulador de hormonas, ha sido una de las estructuras cerebrales más estudiadas con buenos resultados en cuanto a DS se refiere (como se detalla a continuación).

El Hipotálamo es un derivado diencefálico que se encuentra debajo del tálamo, formando las paredes laterales y el piso del III ventrículo que lo divide en una porción derecha y otra izquierda. Puede ubicarse fácilmente, desde la cara ventral del encéfalo, se encuentra enmarcado por el rombo orto-peduncular que delimitan las cintillas ópticas, quiasma y los pedúnculos cerebrales .

El hipotálamo se divide en cuatro importantes regiones rostro-caudales: el área preóptica (APO), el hipotálamo anterior (HA), el hipotálamo medio (HM) y el hipotálamo posterior (HP). Cada área a su vez puede subdividirse en medial y lateral.

El hipotálamo es un centro de integración esencial para la supervivencia de y la reproducción de las especies, puesto que es el sistema encargado de controlar las complejas interacciones fisiológicas y conductuales. Su papel regulador se ve reflejado en su organización estructural y sus múltiples conexiones, ya que casi todas las subdivisiones del SNC se comunican con el hipotálamo y se infiere que están sujetas a su influencia. Además se encuentra en comunicación con sistemas y órganos periféricos convirtiendo información generada por la actividad sináptica del SNC en señales humorales transmitidas a los tejidos periféricos por el sistema circulatorio, es decir, actúa como centro responsable de la coordinación del sistema endocrino.

Recibe información de la corteza cerebral y del sistema nervioso autónomo e interpreta estímulos ambientales (temperatura, iluminación) y la contrarregulación periférica. En respuesta a estos estímulos el eje hipotálamo-hipófisis regula las actividades de la tiroides, glándulas suprarrenales y gónadas, así como las funciones de crecimiento, producción de leche, y equilibrio hídrico. El hipotálamo interviene además en funciones de naturaleza no endocrina, (regulación de la temperatura) en la actividad del sistema nervioso autónomo y en el control del apetito. Las hormonas hipotalámicas son polipéptidos de pequeño tamaño cuya actividad biológica requiere de concentraciones elevadas observadas en el sistema porta-hipofisiario; excepciones a esta regla son las hormonas de la neurohipófisis: la hormona antidiurética (arginina-vasopresina) y la oxitocina.

Por otro lado, la capacidad de los mamíferos para reproducirse depende de la función del hipotálamo en conjunto con la hipófisis. En efecto, la producción, maduración y liberación de los gametos tanto en hembras como en machos requiere de la participación adecuada del eje hipotálamo-hipofisiario. Además, el hipotálamo juega un papel esencial en la organización y expresión de los patrones conductuales necesarios para la cópula. Estudios experimentales en roedores han demostrado que la zona media rostral del hipotálamo, en especial la región preóptica media participa en el control de la conducta sexual masculina como la erección, la monta y la eyaculación (Larsson, 1979); mientras que el núcleo ventromedial participe en el control de la conducta de las hembras.

Prácticamente todos los núcleos hipotalámicos estudiados hasta la fecha presentan DS estructural. Por ejemplo, estudios ultraestructurales de la región preóptica en ratas hembra y macho mostraron diferencias en los patrones sinápticos que se desarrollan y dependen de una exposición perinatal a andrógenos (Raisman y Field, 1973).

Estas observaciones motivaron la búsqueda de DS en hipotálamos humanos, detectándose que una región equivalente al APO es aproximadamente el doble de tamaño en hombres que en mujeres (Swaab y Fliers, 1985; Hofman y Swaab, 1989).

Aunque el significado funcional del DS tanto por estructura como por conectividad del hipotálamo aún se desconoce, se sabe que ambos patrones estructurales dimórficos coexisten en sujetos que exhiben funciones y conducta sexual normal y específica a cada sexo; el género del cerebro está claramente determinado por la influencia hormonal presente durante el PC del desarrollo.

Además del papel que juega el hipotálamo en el comportamiento sexual, de enorme relevancia es su influencia sobre la producción y liberación de gonadotropinas desde la hipófisis anterior y de las cuales depende la génesis y maduración de gametos competentes. Por ejemplo, la espermatogénesis ocurre en respuesta a una liberación más o menos continua de gonadotropinas, mientras que la ovulación es un evento cíclico iniciado por una elevación abrupta o fásica de ellas. En ambos casos, las neuronas hipotalámicas producen Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés) para estimular la liberación de gonadotropinas por la hipófisis anterior; sin embargo, los patrones sexo-específicos de liberación de gonadotropinas implican la existencia de diferencias sexuales en la organización funcional de sistemas aferentes que influyen la actividad de las neuronas GnRHérgicas. Estas acciones organizacionales de las hormonas sexuales (esteroides) inducen el dimorfismo sexual permanente en los elementos neuronales de la formación sináptica en el hipotálamo, que posteriormente se correlacionará con la liberación fásica o tónica de la hembra y el macho (Matsumoto y Arai, 1997).

Retomando el DS del hipotálamo, Gorski y su grupo encontraron que el núcleo preóptico medial muestra un obvio DS en rata; por lo que llamaron como Núcleo Sexualmente Dimórfico del Area Preóptica (NSD-APO). Este núcleo presenta mayor número de neuronas en ratas macho que en hembras (Gorski, Gordon, Shryne y Southam, 1978) y fue el primer grupo de neuronas en describirse como sexualmente dimórfico y continúa siendo uno de los ejemplos más claros de dimorfismo tanto en animales de laboratorio como en humanos (Swaab y Hofman, 1988). En rata, el NSD-APO corresponde a la porción central del núcleo medial y en el humano al núcleo intersticial del hipotálamo anterior-1 (NIHA-1 o INAH-1) (Allen, Hines, Shryne y Gorski, 1989).

Además del NIHA-1, se ha descrito el NIHA-2 como regiones dimórficas de NIHA 1-4 representan grupos neuronales anatómica y funcionalmente independientes. LeVay (1991) confirmó el dimorfismo sexual en el NIHA-3 pero no en NIHA 1, 2, y 4. En el caso del NIHA-1, sin embargo, se ha determinado que en el varón existen dos veces más células que en la mujer. Incluso se ha determinado que tanto niños como niñas poseen el mismo número de células al nacer y que este número aumenta exponencialmente hasta los 4-5 años de edad; la cantidad de células permanece constante hasta la pubertad pero en el caso de las niñas un gran porcentaje de las células muere (Swaab y Hofman, 1988). Por lo tanto, el dimorfismo sexual del área preóptica en humanos no es aparente hasta la pubertad.

Ya que teóricamente no existe una correlación lineal entre el número de neuronas de un circuito y su capacidad funcional, se desconoce si diferencias en tamaño reflejan diferencias cualitativas y/o cuantitativas en términos de función neural; sin embargo, es claro que si se destruye el área preóptica, las ratas machos no expresan conducta sexual en presencia de una hembra receptiva (Hansen, Köhler, Glodstein, y Steinbusch 1982; Szechtman, Caggiula, y Wulkman 1978). También se ha determinado el papel del APO en la conducta sexual de los primates.

En macacos machos, el APO está asociada con la iniciación del acto sexual, erección del pene, y con el periodo refractario postcoital. En las hembras el APO está asociada con la iniciación de la cópula (Oomura, Aon, Koyama, Fujita, y Yoshimatsu, 1989).

Otro grupo neuronal hipotalámico sexualmente dimórfico y generalmente de mayor densidad celular en las hembras, se identifica en la sustancia gris periventricular del APO, caudalmente al órgano vasculoso de la lámina terminal, el Núcleo Anteroventral Periventricular (AvPv-APO) (Bleier, Byne, y Siggelkow, 1982). Este núcleo es más voluminoso en la hembra. y desempeña un papel crítico regulando la liberación cíclica de gonadotropinas en este sexo (Terasawa, Wiegand, y Bindon, 1980).

La administración de andrógenos o estrógenos perinatalmente causa una reducción en tamaño del AvPv vía potencialización de la apoptosis neuronal, más que por la inhibición de la neurogénesis (Arai, Murakami, y Nishizuka, 1994).

Es importante señalar que estas hormonas esteroideas administradas perinatalmente tienen un efecto facilitador en la incidencia de apoptosis en el AvPv-APO, pero inhibidor en el NDS-APO, mostrando una dualidad en efectos (Arai, Sekine, y Murakami, 1996; Davis, Popper, y Gorski, 1996)

La primera forma de DS identificada en el SNC consistió en diferencias en densidad sináptica en la porción estrial del APO, se evidenció que la testosterona puede actuar como factor neurotrófico estimulando la formación de sinapsis de los núcleos Arcuato (ArcN) y Ventromedial (VMN) hipotalámicos (Arai y Matsumoto, 1978). En el ArcN el número de sinapsis somáticas y espinosas es aproximadamente el doble en hembras que en machos (Matsumoto y Arai, 1980); en contraste, el VMN cuenta con un número significativamente mayor de sinapsis, tanto somáticas como espinosas, en el macho que en la hembra (Matsumoto y Arai, 1986; Millar y Aoki, 1991); siendo ambos núcleos sensibles a hormonas esteroides, y sugiriendo que la organización sináptica puede variar de acuerdo con la respuesta genética individual que cada núcleo presenta ante los esteroides.

El NVM es facilitador de conducta sexual en las hembras (Davis, McEwen, y Pfaff 1979; Pfaff, y Sakuma, 1979) expresando receptividad sexual por medio de una conducta refleja que se conoce como "lordosis". Esta conducta de receptividad sexual se expresa durante niveles altos de hormonas sexuales (estrógeno y progesterona), de lo contrario la hembra rechaza los acercamientos sexuales del macho. Aún más interesante, el número de contactos sinápticos en la rata hembra varía en función de la etapa ciclo estral (Frankfurt, Gould, Woolley, y McEwen, 1990; Cohen y Pfaff, 1992). Por lo tanto, el NVM está claramente determinado por los efectos organizacionales y transitorios de las hormonas sexuales, puesto que la densidad sináptica en el caso de las hembras se modifica a lo largo de los ciclos hormonales.

Otra región hipotalámica que presenta DS es el núcleo supraquiasmático (NSQ) que funcionalmente es el encargado de regular los ritmos cíclicos o ritmos circadianos controlados por el SNC. En efecto, el NSQ genera y coordina los ritmos de secreción hormonal y modificaciones conductuales con una periodicidad de cerca de 24 horas. Se ha encontrado que el NSQ difiere en forma entre machos y hembras; esférico en machos y ovoide en hembras (Swaab y Fliers, 1985), forma que se ha relacionado con diferencias sexuales en conectividad. Se ha establecido que el NSQ también está asociado con conductas sexuales. Así, Sördersten y colaboradores (1981) determinaron que la amplitud de los ritmos circadianos en conducta sexual es mayor en ratas tratadas con anti-estrógenos durante el periodo neonatal. De igual modo, la administración de antagonistas a receptores estrogénicos durante el periodo prenatal y postnatal, incrementa en un 59% el número de neuronas que contienen vasopresina en el NSQ, en paralelo con la aparición de conducta “bisexual” en ratas; si el tratamiento con anti-estrógenos se limita al periodo prenatal no se observan estos cambios (Swaab y Fliers, 1985).

Por otro lado, existen evidencias experimentales que corroboran que las hormonas sexuales regulan diversos aspectos del desarrollo neural en determinadas áreas del cerebro. Por ejemplo, pueden determinar la existencia de un número diferente de neuronas en el adulto, actuando durante el desarrollo ya sea como factores tróficos y promoviendo la supervivencia neuronal (Chowen, Busiguina, y García-Segura, 1995), o favoreciendo la muerte neuronal (Guillamon, Segovia, y Del Abril, 1988). También pueden afectar el crecimiento de las prolongaciones neuronales, dendritas y axones (Torand-Allerand, Hashimoto, y Greenough, 1983), mediante la inducción de proteínas del citoesqueleto y estabilización de microtúbulos (Díaz, Lorenzo, y Carrer, 1992; Ferreira y Cáceres, 1991). Además, afectan las conexiones mutuas entre estas prolongaciones, es decir, pueden determinar el número de conexiones sinápticas entre las neuronas, y por lo tanto el patrón de conectividad neuronal, el cual es la base de la función cerebral (García-Segura, Baetens, y Naftolin, 1986; Matsumoto, 1991).

Estos efectos organizadores de las hormonas sexuales sobre la conectividad cerebral ejercen su actividad, fundamental pero no exclusivamente, en estructuras cerebrales que controlan el comportamiento reproductor o la secreción hormonal.

Es importante destacar que el efecto de la testosterona en el cerebro se manifiesta rápidamente, de tal forma que desde el mismo día del nacimiento existe una diferencia sexual en la composición de la membrana neuronal (García-Segura, Baetens, y Naftolin, 1985). Esta diferencia sexual precede, por tanto, a la llegada de los conos de crecimiento para la formación de sinapsis y podría determinar que se formaran más sinapsis sobre neuronas de las hembras que sobre neuronas de los machos (Pérez, Naftolin, y García-Segura, 1990).

Además, los efectos de la testosterona sobre la expresión de la proteína ácida glio-fibrilar (GFAP por sus siglas en inglés), están asociados a la aparición de diferencias sexuales en la cantidad de membrana postsináptica recubierta por las prolongaciones astrogliales.

Esta cantidad es menor en hembras que en machos, es decir, está en proporción inversa al número de contactos sinápticos. Una vez alcanzada la pubertad, se producen variaciones en los niveles de GFAP y en el recubrimiento de la superficie neuronal por prolongaciones gliales durante el ciclo estral, en coordinación con los cambios que ocurren en el número de contactos sinápticos (García-Segura, Chowen, y Párducz 1994). Estos resultados sugieren que las modificaciones hormonales en el citoesqueleto de los astrocitos, pudieran tener como resultado, cambios en la ramificación de sus prolongaciones y en su capacidad para recubrir la superficie neuronal, lo que a su vez determina la cantidad de membrana neuronal disponible para el establecimiento de contactos sinápticos.

Los astrocitos parecen tener una activa participación en el proceso de diferenciación sexual de la conectividad neuronal en el núcleo arcuato del hipotálamo de rata.

Se ha demostrado que niveles perinatales de testosterona determinan la densidad de ramificaciones astrogliales en el núcleo arcuato; además, la administración de testosterona en hembras recién nacidas tiene como resultado un aumento en los niveles de RNA mensajero de la proteína GFAP y de los niveles de proteína inmunoreactiva. Esta proteína es un constituyente de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos, y su nivel de expresión es un buen índice del grado de diferenciación morfológica de estas células. La castración neonatal en machos tiene el efecto opuesto sobre la expresión de GFAP (Chowen, Busiguina, y García-Segura, 1995).

Estudios realizados en cultivos primarios de hipotálamo sugieren que el efecto de la testosterona sobre los astrocitos depende, por lo menos en parte de su conversión a estradiol. Además, los estudios *in vitro* indican que el efecto del estradiol sobre los astrocitos sólo se produce si existe un contacto directo sobre la membrana glial con la membrana neuronal (Torres-Alemán, Rejas, y Pons, 1992). Es necesaria una estrecha comunicación ente astrocitos y neuronas para que se produzca la diferenciación sexual de los circuitos neuronales, y por tanto, la diferenciación sexual de la función cerebral.

Finalmente y resumiendo los antecedentes detallados, se concluye que a la fecha prevalecen dos corrientes tendientes a explicar el DS. Una primera vertiente propone que éste resulta exclusivamente de la interacción temprana de las hormonas sexuales con el genotipo neuronal a lo largo del PC de desarrollo, en donde el SNC se convierte en el “órgano blanco” de las hormonas gonadales, asumiendo, un papel relativamente pasivo. Por otra parte, con base en los estudios realizados a lo largo del desarrollo gonadal que han discutido que los mecanismos de diferenciación están determinados por diferencias sexuales en la información genética (cromosomas), se infiere que dichas diferencias pudieran ser el factor determinante en la génesis del DS observado en el tejido nervioso. Más aún, esta concepción está apoyada por la observación de que en prácticamente todos los modelos de dimorfismo sexual experimental, las manipulaciones hormonales gonadales no han sido capaces de revertir completamente ni estructural ni funcionalmente los patrones inherentes a cada sexo (Arnold, 2000).

En este ámbito, el grupo de trabajo del laboratorio, propone que ambas líneas de pensamiento pudieran conciliarse en una nueva hipótesis en la que “las diferencias sexuales en la composición genética actúan de manera sinérgica con las variaciones hormonales cuantitativas y cualitativas a las que el SNC en desarrollo está expuesto” y que a su vez, sugiere una interacción temporal y anatómica de eventos genómicos y endocrinológicos. La elección del hipotálamo como modelo experimental para este trabajo, se basa en estudios en distintas especies de mamíferos que han demostrado que en la región hipotalámica se encuentran localizados grupos neuronales que están directamente implicados en la reproducción, ya sea regulando el comportamiento sexual o la secreción hormonal, además de otros estudios revelando la existencia de núcleos sexualmente dimórficos en dicha estructura.

El trabajo será abordado primeramente por la búsqueda de genes de expresión sexualmente dimórfica en el hipotálamo de ratas neonatales (día postnatal 6) mediante la técnica experimental de microarreglos, y seguido por la estandarización de técnicas que permitan la visualización y localización topográfica de dichos genes *in situ* (Hibridación y PCR *in situ*).

### **3. ASPECTOS METODOLOGICOS**

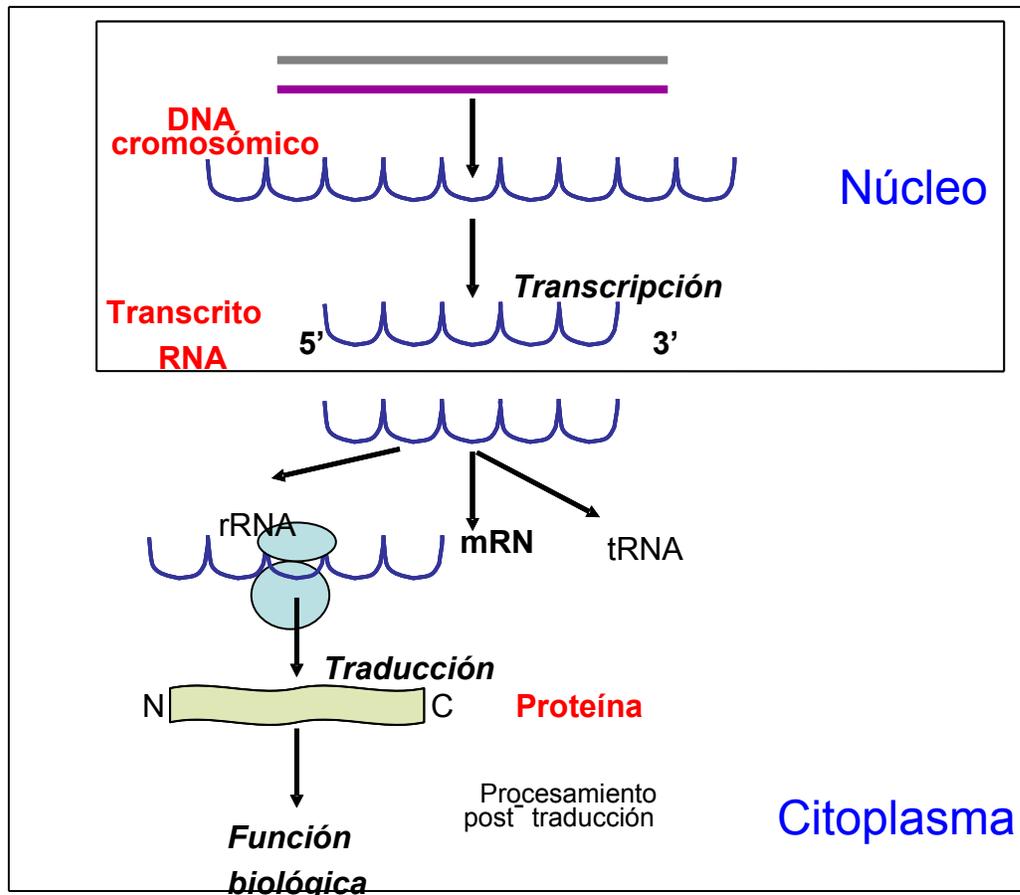
Para cumplir los objetivos planteados, nos valdremos de las tres técnicas ya mencionadas: Microarreglos, Hibridación *in situ*, y RT-PCR *in situ*, por lo que a continuación se comentan las bases de cada una de ellas.

En primera instancia y para comprender el fundamento de las técnicas empleadas en este trabajo es necesario tener claros algunos conceptos básicos de biología molecular como los que se comentan en seguida.

### 3.1 CONEPTOS BÁSICOS

Los genes consisten en porciones de ácido desoxirribonucleico (DNA) que codifican la síntesis de una proteína en particular. Cada segmento de DNA genómico, organizado en cromosomas en el núcleo celular, está construido por secuencias lineales de nucleótidos, cada uno constituido por un grupo fosfato, un azúcar desoxirribosa y una de las cuatro bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Durante la síntesis de RNA (transcripción) la doble cadena de DNA se despliega y una de ellas es usada como molde para generar una copia complementaria también de cadena simple con la base uracilo (U) que reemplaza a la T. El RNA es procesado de manera que a partir de un transcrito primario se generan diferentes clases, entre ellas el RNA mensajero (mRNA) que en células eucariotes lleva un Capuchón (Cap) 5', una cola de poli-Adeninas (Poli-A) y no contiene intrones. En el proceso siguiente de traducción, se sintetizan proteínas a partir del mRNA en los ribosomas. La correspondencia entre las cuatro letras presentes en el DNA y los 20 aminoácidos que forman las proteínas está dada por el código genético, que vincula tres bases (codón) a un aminoácido.

Una propiedad importante del DNA es la complementariedad de las bases que lo componen, así la T se complementa con la A y la G con la C por medio de puentes hidrógeno de las cadenas opuestas del DNA. Esta propiedad es la base molecular de la técnica de microarreglos (MA), hibridación *in situ* (HIS) y RT-PCR *in situ* (RT-PCR-IS) aquí empleadas, donde hebras de DNA de diferente origen van a hibridarse por complementariedad de las bases que las componen.



**Figura 1.-** Dogma central de la biología molecular: el material genético consiste de DNA, que se transcribe a mRNA que sirve como molde para la síntesis de proteínas. mRNA: RNA mensajero; rRNA: RNA ribosómico; tRNA: RNA de transferencia.

A continuación se exponen los fundamentos de cada una de las técnicas por separado, y que además comparten el mismo principio de la complementariedad de bases.

### 3.2 MICROARREGLOS (MA)

La palabra *microarreglo* (MA) deriva del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada). Los MA son un conjunto de sondas moleculares fijadas de manera ordenada sobre un soporte sólido, es decir que las micromatrices o microarreglos permiten el depósito de miles de genes o parte de genes sobre un portaobjetos para su estudio en paralelo.

De esta manera es posible tener una visión instantánea de la actividad de genomas completos o de un grupo selecto de genes. Además, los MA constituyen un procedimiento que describe el grado de expresión de un gen como indicador de la actividad del mismo, siendo detectado por su correspondiente RNA mensajero (mRNA) transcrito.

En los estudios de MA se combinan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridación habrá fluorescencia y su intensidad será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio. Una condición indispensable es que cada uno de los genes que esté representado sea fácilmente distinguible de otros. En otras palabras, la porción del gen inmovilizado en el portaobjeto debe llevar consigo, independientemente de su tamaño, su cédula de identidad.

El concepto básico en MA es el posicionamiento preciso en un soporte sólido de elementos que funcionen como detectores moleculares en altas densidades. En la práctica, abarcan una amplia gama que puede tener diferentes soportes (membranas o vidrio) y diferentes moléculas que interaccionan en este medio, en donde se le llama “blanco” a la molécula libre, por hibridar o muestra, y “sonda” a la inmovilizada.

Existen diversos tipos de MA según las sondas utilizadas que abarcan metodologías muy variadas que van desde lo más casero hasta lo más sofisticado.

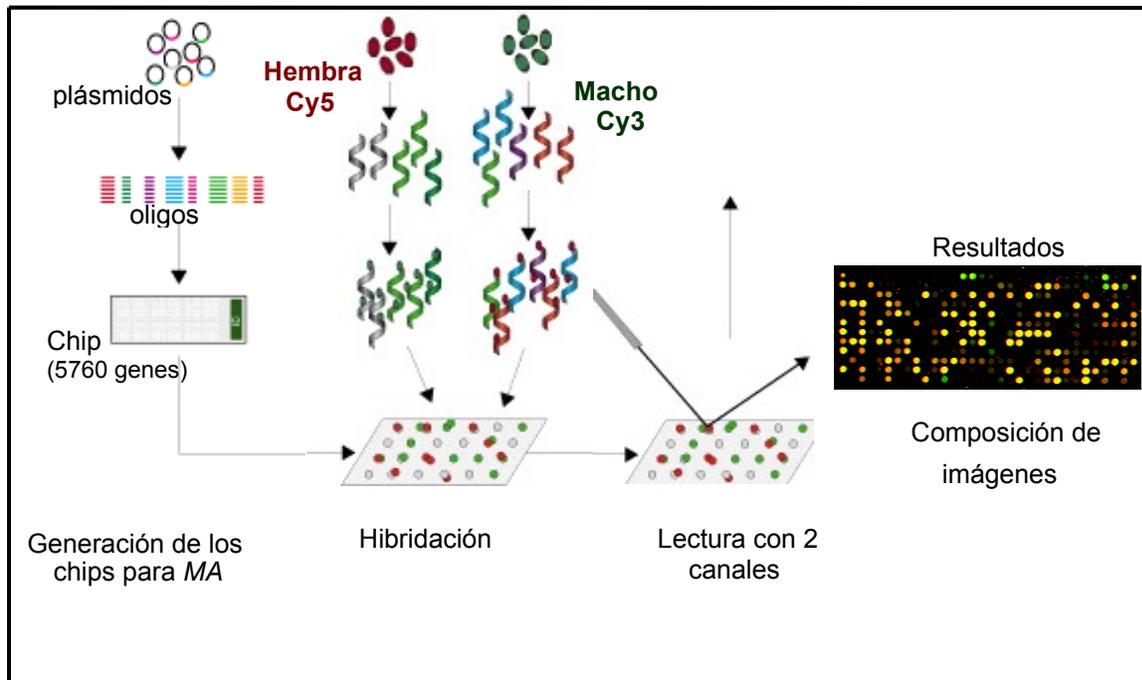
Los que se emplearán en este proyecto corresponden a MA de ácidos nucleicos particularmente de “oligonucleótidos”, buscando expresión diferencial entre hipotálamos de ratas hembra y macho neonatales.

Las sondas u oligonucleótidos son secuencias de DNA sintético de cadena simple que pueden ser cortas (15-25 nucleótidos) o largas (50-120 nucleótidos). Estos fragmentos pueden ser presintetizados y depositados en portaobjetos por robots o sintetizados *in situ* y depositados por *ink jet* o fotolitografía (DNAchips).

En los experimentos de expresión génica como éste, el RNA total es obtenido de la muestra biológica (hipotálamo de rata) y marcado con colorantes fluorescentes derivados de cianinas (Cy5-rojo para hembra y Cy3-verde para macho o viceversa) durante el proceso de RT-PCR al que se someten las muestras para su posterior detección.

Las muestras provienen de dos condiciones a comparar (hembra y macho en este caso), se mezclan en cantidades iguales y se hibridan competitivamente en el mismo MA. La lectura se hace con detectores que permitan cuantificar los espectros de emisión de los dos colorantes en canales diferentes y generar imágenes separadas para cada uno de ellos.

Para el análisis de las imágenes se debe detectar la expresión diferencial en un solo archivo de imágenes, que se obtiene por la superposición resultante del archivo generado por la detección del colorante verde más la del colorante rojo por separado. De esta manera los puntos que resulten verdes estarán expresados diferencialmente en una condición y los rojos en otra, mientras que los amarillos estarán expresados en ambas condiciones.



**Figura 2.-** Técnica de microarreglos, generación, hibridación (hembras y machos), lectura composición de imágenes. (Modificado del libro *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"* Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, Cold Spring Press, New York, 1989.

Una vez obtenido el/los archivos de imágenes, hay que transformar las intensidades de las señales obtenidas en datos numéricos, discriminando la señal informativa del ruido que pudiera haber en segundo plano. En este proceso hay que considerar las dimensiones y forma de cada punto analizado de la imagen, su localización y los parámetros estadísticos que pueden asociarse a ellos. Los controles de calidad son realizados para cada imagen.

El manejo de una cantidad extensa de datos en simultáneo requiere del uso de algoritmos de computación para obtener, manejar, procesar y almacenar la información en paralelo. De esta manera se obtiene una matriz de expresión donde las filas serán genes y las columnas experimentos. Los datos se normalizan y transforman para disminuir las variaciones y hacer los cálculos posteriores más sencillos (Bowtell, y Sambrook, 2002).

Para un gen dado (fila) pueden compararse las intensidades entre muestras y generar un reporte que indique sobreexpresión y subexpresión de genes en las diferentes condiciones ensayadas. No deben compararse intensidades entre genes (filas) del mismo experimento ya que el nivel de expresión es una propiedad de cada gen, se puede modificar por la expresión de otro gen presente en altos niveles en el mismo experimento y está ligado a complejas vías de control (Bowtell, y Sambrook, 2002).

A pesar de la gran diversidad de paquetes analíticos para microarreglos (aproximadamente 100 paquetes diferentes) nuestro grupo eligió para este proyecto, el paquete estadístico “**R**” entre otras cosas, debido a su simpleza de manejo e instalación, además, es ideal para microarreglos menores a 10,000 genes y sin sesgo alguno de la información. El programa es de libre acceso e instalación por internet y no permite la manipulación de los datos para la introducción de sesgos.

Además, **R** es uno de los lenguajes de programación para análisis estadístico y gráfico más utilizados en investigación por la comunidad estadística, siendo además muy popular en el campo de la investigación biomédica y bioinformática.

Representa un proyecto de software gratuito enfocado al análisis y la comprensión de datos genómicos y ofrece paquetes específicos para la normalización, análisis y clasificación de MA (Parmigiani, Garret, Irizarri, y Zeger, 2003).

El lenguaje R es ideal para gráficos y estadísticas múltiples, ya que provee de una gran cantidad de análisis estadísticos tanto para modelos lineales como no lineales, pruebas estadísticas clásicas, análisis seriados, agrupamiento y clasificación de datos, etc., así como técnicas de graficación avanzadas siendo extremadamente sensible, además pueden diseñarse análisis basados en algoritmos y fórmulas con símbolos matemáticos (<https://svn.r-project.org/R-dev-web/trunk/index.html>).

El programa **R** integra una serie de facilidades para la manipulación, cálculo y análisis de información que incluyen ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)):

- ♂Facilidad en el almacenamiento de datos
- ♂Varios métodos de cálculos y operaciones con matrices
- ♂Amplia colección de herramientas para el análisis de datos
- ♂Facilidad para desplegar varios tipos de gráficos sobre una misma matriz
- ♂Programa de fácil entendimiento para personal ajeno a la computación.

Así una vez procesadas las muestras, se realiza un análisis de los datos en el programa R, se seleccionan los genes de interés para el estudio y se continúa con el desarrollo experimental del proyecto recurriendo a las técnicas de visualización y localización topográfica de los genes seleccionados en el tejido (hipotálamo): Hibridación y el RT-PCR *in situ*.

### 3.3 HIBRIDACION *IN SITU* (HIS)

La “hibridación *in situ*” (HIS) es una técnica histoquímica que fue desarrollada en 1969 (Gall,y Pardue, 1969), y es ampliamente utilizada hoy en casi todos campos de estudios biológicos. El término “*in situ*” deriva del latín “en su sitio o lugar”.

La HIS resulta de la combinación de técnicas anatómicas, citológicas y moleculares, y es empleada para localizar secuencias específicas de RNA mensajero (mRNA) en células individuales o en secciones de tejido; lo que nos da un indicio del nivel de expresión de un gen en una célula determinada y nos permite su localización precisa en el tejido.

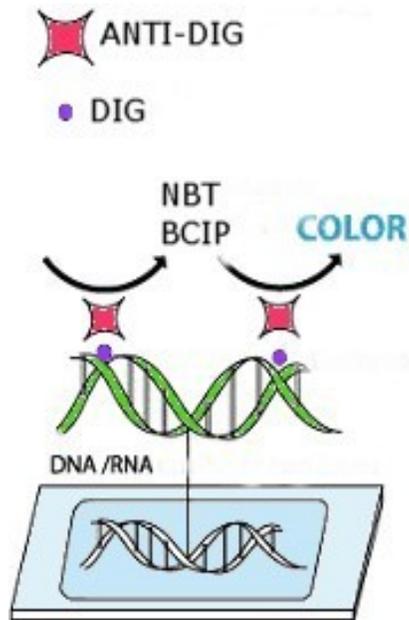
La “hibridación” representa una reacción en donde dos moléculas de ácidos nucleicos de cadena sencilla se reconocen mutuamente, debido a la acción de las fuerzas electroquímicas (tipo puentes de hidrógeno) generadas por la afinidad de pares de bases complementarias. Duplas DNA-DNA, DNA-RNA y/o RNA-RNA pueden ser producidas mediante ésta reacción. En el caso particular de la HIS, la dupla RNA-RNA es la más común, en donde el mRNA por detectar (transcrito) se encuentra fijo en el tejido, y es localizado por la unión de su sonda complementaria de ácido nucléico previamente marcada (Henderson, 1996).

El procedimiento general consiste en obtener cortes (14 y 16 micras en nuestro caso) del tejido de interés (hipotálamo) y adherirlos en laminillas polarizadas, en seguida se procede a su tratamiento con soluciones químicas que inducen la permeabilidad de los tejidos y desnaturalizan los ácidos nucleicos presentes.

Previo a la hibridación, la sonda de secuencia específica debe ser marcada con alguna enzima cuya reacción pueda ser colorida, radiactiva o fluorescente. Posteriormente se pone en contacto la sonda con el tejido de interés a una temperatura permisible (55-75°C dependiendo de la longitud de la sonda) para el alineamiento y reconocimiento de bases entre la sonda y el mRNA nativo de la célula (etapa de hibridación).

El exceso de sonda es lavado y su revelado dependerá del tipo de marcaje que posee (Leitch, 1994). Finalmente, las laminillas son observadas al microscopio óptico o de fluorescencia según sea el caso.

A continuación se esquematiza el fundamento de las HIS con fines didácticos.



**Figura 3.-** Esquemización de una HIS  
DIG = digoxigenina, NBT= nitro azul de tetrazolio,  
BCIP = Bromo, Cloro, indol-fosfato, ANTI-DIG = Ac contra DIG

El éxito de la técnica depende principalmente de la síntesis de la sonda. Es de vital importancia que la sonda contenga la secuencia específica del mRNA del gen deseado y que sea marcada eficientemente.

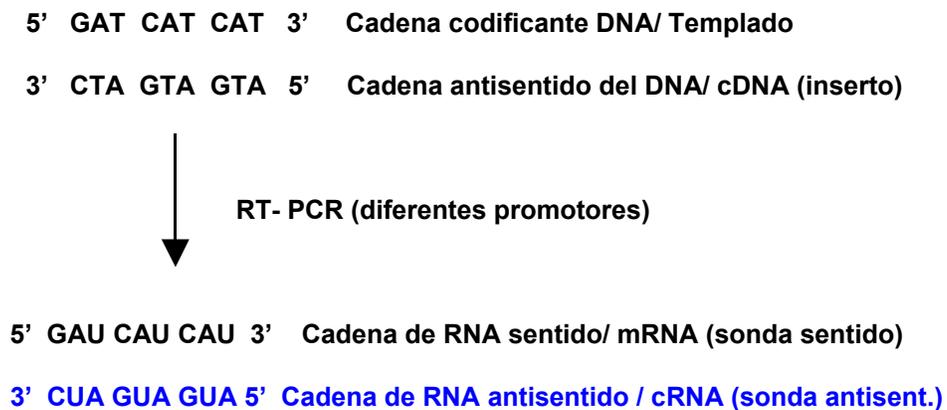
En nuestro caso, las sondas fueron diseñadas con base en cDNA's de nuestros genes de interés contenidos en plásmidos de bacterias E.coli transformadas que se adquirieron comercialmente a la firma de Biología Molecular Alemana "RZPD" (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Heubnerweg 6, 14059, Berlin, Alemania. Página web: [www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)) (Pedido del 19 de Octubre de 2004, No. Factura: 3463353).

Las bacterias se crecieron en medio LB a 37°C y la extracción del DNA plasmídico fue mediante MaxiPreps. Finalmente, los cDNA's fueron sintetizados mediante la la reacción en cadena de la polimerasa con su variante de transcripción reversa (RT-PCR), como se explica a continuación.

El cDNA insertado en un vector (plásmido), puede ser empleado como el templado para sintetizar la sonda de RNA por transcripción *in vitro* en presencia de la *polimerasa* (Pol) de RNA (Cox, DeLeon, y Angerer, 1984).

La Pol de RNA (Taq-Pol en nuestro caso) utiliza de molde la cadena "antisentido" de DNA (de 3' a 5') para sintetizar un mRNA "sentido" (de 5' a 3'). La cadena "sentido" es la que contiene el "código genético" y es la codificante, es idéntica al templado del DNA original con excepción del cambio de la base Timina (T) por Uracilo (U).

Ejemplo:



La sonda de RNA antisentido (en azul) es complementaria al mRNA celular, es la requerida para la HIS, puede variar en tamaño desde cientos hasta miles de bases de longitud, y es sintetizada *in vitro* a partir del cDNA templado (inserto).

Los plásmidos contienen promotores de transcripción derivados de los bacteriófagos T3, T7 y/o SP6 principalmente, adyacentes al sitio de policlonación. Si un promotor diferente está presente en cada lado del sitio de policlonación, le permite al RNA ser transcrito tanto en sentido (5'-3') como en antisentido (3'-5') a partir de la misma cadena del cDNA (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989); recordando que para la síntesis de cada sonda es importante el empleo de las enzimas de restricción y los promotores adecuados para cada vector.

Es importante el marcaje de la sonda para su posterior revelado, lo que se logra agregando nucleótidos (NTP's) previamente acoplados al marcador "*digoxigenina*" (DIG) en la mezcla de síntesis del RT-PCR, reacción en donde la sonda incorporará los NTP's marcados con DIG a su secuencia.

La DIG es un esteroide aislado de las hojas y semillas de la planta *Digitalis purpúrea*, que se une mediante un brazo de 11 carbonos a la posición C-5 del nucleótido Uracilo (U) por compatibilidad electronegativa.

La sonda que está marcada por incorporación de la DIG a su secuencia puede ser posteriormente detectada por anticuerpos (Ac) específicos contra DIG. Estos Ac se encuentran conjugados a una enzima cuyo sustrato metabólico proporciona productos coloridos, siendo la más común y la utilizada en este proyecto, la fosfatasa alcalina (FA). Misma que al ser incubada en presencia de sales de azul de tetrazolio (NBT / BCIP = Tetrazolium salt / 5-bromo,4-cloro,3-idolyl-phosphate) produce un precipitado azul/morado resultado de la desfosforilación y posterior oxidación de BCIP a índigo fácilmente observable al microscopio óptico.

### 3.4 TRANSCRIPCIÓN REVERSA – REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA *IN SITU* (RT- PCR-IS)

La RT-PCR-IS es una variante de la técnica de PCR convencional (desarrollada por Kary B. Mullis en 1985), cuyo propósito es crear un número ilimitado de copias de un gen (Sambrook, 1989).

La técnica consta de tres etapas fundamentales que se repiten de 30 a 40 veces (ciclos) en un termociclador automático, que puede enfriar y calentar las muestras en periodos muy cortos (Innis, Gelfand, y Sninsky, 1995):

#### 1.- **Desnaturalización** (a 94°C):

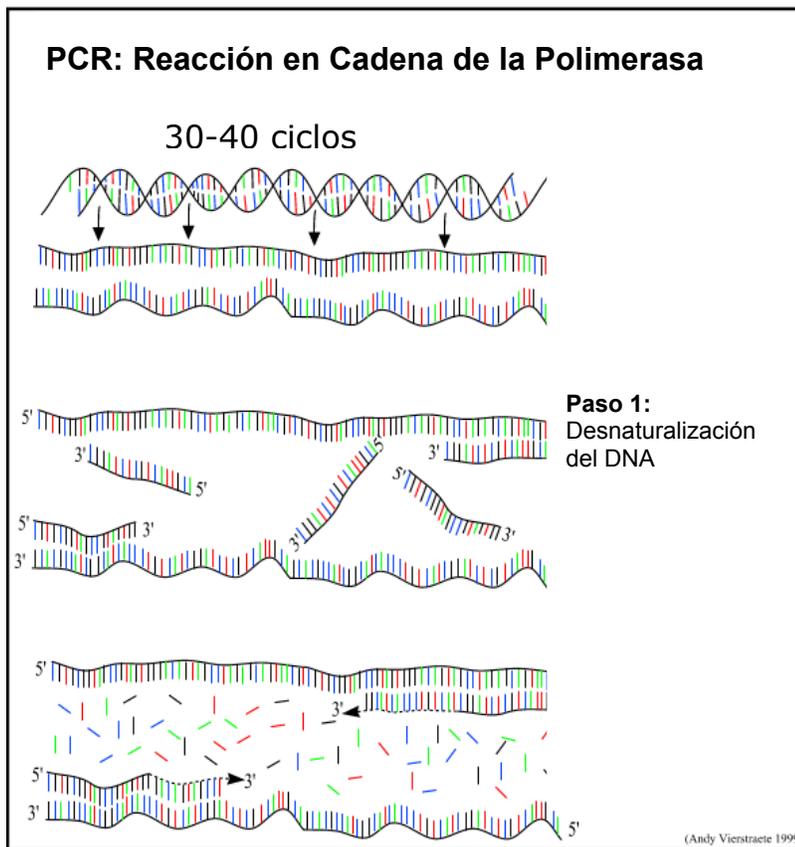
Durante esta etapa la doble cadena de DNA se abre en 2 cadenas sencillas y ningún proceso enzimático se lleva a cabo.

#### 2.- **Alineamiento** (55 a 75°C):

En este paso la temperatura es variable dependiendo de la longitud y condiciones de los “*primers*” o “*cebadores*” empleados, ya que es aquí en donde por movimientos Brownianos los *primers* reconocen a su secuencia complementaria y se unen o “flanquean” a la cadena sencilla de DNA (templado o molde) mediante enlaces de tipo iónico. Entre más estables sean las uniones iónicas mayor facilidad de la Polimerasa (Pol) para unirse al complejo y empezar la copia del templado.

#### 3.- **Extensión** (a 72°C):

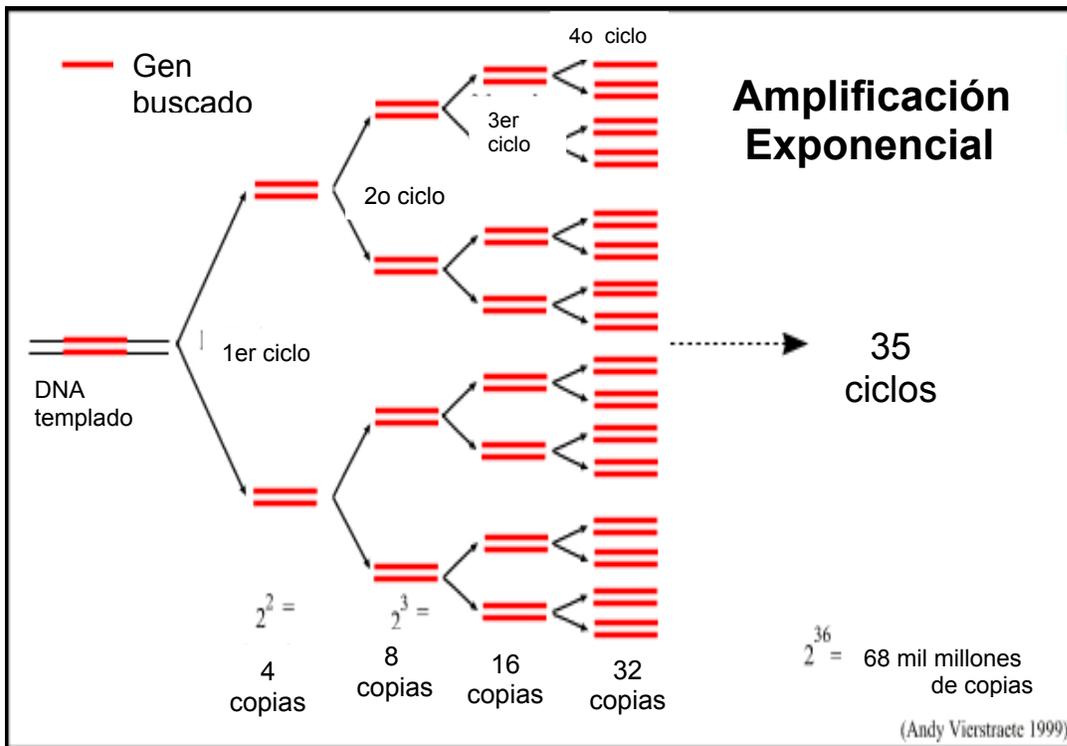
Los *primers* aún conservan la fuerza de atracción por el templado, y es la temperatura óptima de trabajo para la Pol que comienza la replicación o extensión del templado. La Pol añade los dNTP's (presentes en la mezcla de reacción) en sentido 5' a 3' leyendo el templado de 3' a 5', y anexando la base complementaria a la secuencia del templado.



**Figura 4.-** Etapas del PCR: Paso 1: desnaturalización, Paso 2: alineamiento, Paso 3: extensión. (Tomado del libro "Bases moleculares de Genética", Andy Vierstraete, 1999)

Debido a que ambas hebras del DNA son copiadas durante el PCR, el incremento de las copias del gen es de manera exponencial. Esto es, posterior al primer ciclo de la reacción solo habrá dos copias del gen; después de dos ciclos el número de copias será cuatro, de tres ciclos resultan ocho copias, y así sucesivamente.

El número de ciclos dependerá de la cantidad de copias que se requieran, y generalmente va de entre 30 a 40 ciclos (Sambrook, Fritsch, E.F. and Maniatis, 1989).



**Figura 5.-** Crecimiento exponencial del PCR de acuerdo con el número de ciclos.  
(Tomado del libro "Bases moleculares de Genética", Andy Vierstraete, 1999)

La enzima clave en todo el proceso es la Polimerasa, generalmente se emplea la Taq-Polimerasa que cuenta con características especiales necesarias durante la reacción. La Pol proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq-Pol), una bacteria fotosintética cuyo hábitat natural son los geysers por lo que resiste temperaturas de hasta 80°C, siendo su óptima entre 70 y 72°C. Contiene como parte de su maquinaria constitutiva de transcripción a la DNA-Pol, considerada como una exonucleasa que cataliza la síntesis de nuevas hebras de DNA a partir del DNA templado.

La Taq-Pol se une al grupo hidroxilo 3' libre e inicia la síntesis de la nueva cadena, siendo requeridos iones de magnesio libres y una temperatura de 70-75°C para alcanzar su mayor tasa transcripcional y su tasa de error total es de 1 error por cada  $1 \times 10^{-4}$  a  $2 \times 10^{-5}$  pb ([www.pcrlinks.com](http://www.pcrlinks.com)).

Ahora bien, así como para la Hibridación *in situ* el paso crítico depende de la síntesis de la sonda y su eficiencia para hibridarse, el éxito del PCR se basa en la elección y síntesis de los *primers* además de la eficiencia de la enzima de transcripción. 42

Para diseñar los *primers* es necesario conocer la secuencia del gen deseado, misma que se puede obtener por acceso libre al banco mundial de genes en internet (Genebank, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)), y mediante programas especiales para el diseño de *primers* (**Primer Express** en este caso), es posible localizar aquella secuencia única e irrepetible para cualquier otro gen, y así seleccionar el par de *primers* (sentido y antisentido) correspondientes al gen de interés.

Es importante que las secuencias en el diseño de los *primers* siempre sean leídas en sentido 5' a 3' no importando qué *primer* se va a sintetizar (sentido o antisentido), ya que la Pol siempre leerá en sentido 3' a 5'. Además, la secuencia del *primer* determinará la temperatura media de alineamiento óptima ( $T_m$ ), ya que por cada par de G-C se suman 4 grados, y 2 grados por cada par A-T ([www.mature.com/oligonucleotide.html](http://www.mature.com/oligonucleotide.html)).

Ahora bien, el procedimiento descrito anteriormente corresponde únicamente al PCR convencional *in vitro*, sin embargo en este proyecto se emplean dos variantes más. La primera es una **Transcripción Reversa** previa al PCR, y la segunda es el sitio de reacción, llevándose a cabo sobre el tejido mismo (*in situ*).

La transcripción reversa (RT) consiste en un paso adicional previo al PCR que semeja a la síntesis de la sonda en la HIS. Debido a que en el tejido muestra se cuenta con el DNA y los mRNA originales (5' a 3'), es necesario obtener los cRNA's (3' a 5') para poder amplificar la señal de los genes de nuestro interés, lo que se logra mediante la RT.

La RT representa un tipo de PCR en donde la única diferencia con el PCR convencional es la exonucleasa implementada, ya que en esta ocasión reemplazando a la Taq-Pol se emplea una transcriptasa reversa (M-MLV) capaz de reconocer los sitios de Poli-adeninas (Poli-A) típicos del mRNA, de tal suerte que uniéndose a ellos y siguiendo con el patrón de la complementariedad de bases sintetiza y amplifica cRNA's. Además, los reactivos de la mezcla y las condiciones de reacción son diferentes al PCR tradicional, sin embargo el fundamento de la técnica es exactamente el mismo (Innis, Gelfand, y Sninsky, 1995).

La segunda variante mencionada anteriormente se refiere exclusivamente al sitio de reacción, esto es, tanto la RT como la PCR se desarrollan directamente en el tejido.

En principio las muestras de tejido se incluyen en medio de montaje (parafina por ejemplo) para posteriormente ser cortadas a un grosor máximo de 5 micras. A continuación los cortes se someten a soluciones químicas que inducen la permeabilidad de los tejidos y desnaturalizan los ácidos nucleicos presentes. Seguido a esto, se realiza la RT y el PCR en un termociclador con cabezales especiales, dando a las muestras tratamientos previos a cada reacción con DNAsas y RNAsas (respectivamente) para evitar la degradación de los ácidos nucleicos por sintetizar.

De vital importancia es el hecho de emplear dNTP's marcados con DIG en la mezcla de reacción del PCR, ya que el revelado se basa en la detección de la DIG por anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina, cuyo principio es semejante al de la HIS y fue comentado anteriormente en este capítulo.

Resumiendo, el RT-PCR-IS es una variante del PCR convencional cuyo procedimiento general consta de varios pasos a seguirse en estricto orden: la fijación y desnaturalización del tejido, la RT, el PCR y el revelado de las reacciones; para finalmente observar las laminillas al microscopio y analizar los resultados.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

♂ Identificar genes de expresión sexualmente dimórfica en el hipotálamo de ratas Wistar neonatales machos y hembras por medio de microarreglos, y comparar 2 técnicas de visualización y localización topográfica de dichos genes.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

♂ Determinar genes involucrados en el DS del hipotálamo de ratas Wistar en el día postnatal 6, mediante microarreglos y su análisis.

♂ Seleccionar genes involucrados directamente en el DS del hipotálamo.

♂ Comparar las técnicas de Hibridación *in situ* y RT-PCR *in situ* para la visualización y localización de los genes elegidos.

### 4.3 HIPÓTESIS

♂ Los perfiles de expresión genética en el hipotálamo de rata en el día postnatal 6 son sexualmente dimórficos.

♂ Las dos técnicas empleadas para la visualización de la expresión *in situ* son igualmente eficientes.

## 5. JUSTIFICACIÓN

En la ciencia el uso de animales para predecir los probables efectos de procedimientos sobre humanos u otros animales, conlleva la responsabilidad del bienestar de ambos. Los animales son usados para distintas investigaciones entre ellas: comportamiento fisiológico, patológico, toxicológico y terapéutico, para cirugías experimentales y de entrenamiento, para testificación de fármacos y preparaciones biológicas; y para la generación de conocimientos básicos que aporten un beneficio posterior a alguna de las especies (1).

En este contexto nuestro trabajo experimental basado en un modelo animal, se centra en la generación de respuestas del conocimiento básico relacionado con el establecimiento de las diferencias sexuales presentes en el sistema nervioso central (SNC), en donde tanto el protocolo como los procedimientos experimentales que se utilizaron en el manejo de animales a lo largo del estudio, fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, basados en la Guía para el manejo y uso de animales de experimentación de la National Academy of Science (2), así como en el Real Decreto de las Comunidades Europeas (3).

De tal manera, este trabajo se justifica intentando responder a la interrogante acerca del establecimiento del dimorfismo sexual en SNC a partir de su componente genético intrínseco, expresado en el hipotálamo de ratas Wistar (ambos sexos y sin manipulación previa) de 6 días de nacidas.

- 1) International Guiding principles for biomedical research involving animals, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Medicina, Córdoba, Argentina, 1992.
- 2) Guide for the care and use of laboratory animals, National Academy of Science, 2003, 1-7.  
(<http://www.nap.edu>)
- 3) Real Decreto 1201/2005, Comunidad de Naciones Europeas, 10 de Octubre de 2005.

## 6. MÉTODOS

La parte experimental fue dividida en tres etapas conforme a los objetivos del proyecto, así mismo, todas las técnicas desarrolladas emplearon como modelo biológico experimental, ratas Wistar de ambos sexos en etapa neonatal, específicamente del día postnatal seis (P6).

Con el objeto de determinar genes de expresión sexualmente dimórfica en el hipotálamo, se realizaron los ensayos correspondientes a los microarreglos (MA), posteriormente el segundo objetivo fue cubierto con la estandarización de la HIS y de la RT-PCR-IS en ese orden. Todas las técnicas utilizadas y a continuación descritas estuvieron precedidas de experimentos preliminares en los que se establecieron las condiciones óptimas en: espesor de corte, pH, concentración de soluciones, temperatura, concentraciones enzimáticas, etc.

### 6.1 MICROARREGLOS (MA)

La obtención del material biológico se realizó a partir de ratas Wistar hembra y macho en el día postnatal 6 de acuerdo al protocolo (ver protocolo de obtención de muestras en el apéndice 1). Se completaron un total de 20 muestras por cada sexo, mismas que se dividieron en 4 ensayos con 5 muestras por sexo para cada uno.

A continuación se realizó la extracción del hipotálamo completo de cada rebanada de tejido (bloque de aproximadamente 2 mg., tomando 5 hipotálamos de cada sexo (100 µg. totales) para un solo ensayo. Las muestras de hembras y machos se procesaron por separado para la extracción del mRNA con la técnica de Trizol (protocolo mostrado en el apéndice 1), obteniendo aproximadamente 100 ng de mRNA por muestra.

Las muestras de mRNA fueron enviadas a la “Unidad de Microarreglos” del “Instituto de Fisiología Celular” de la U.N.A.M. para su procesamiento. Los chips de MA fueron adquiridos comercialmente (MWG-Biotech (E.U.A.), nombre de catálogo MWG-Rat5k, con oligonucleótidos de 30-100 bases de longitud y con un total de 5760 genes de rata ([www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com)).

Se efectuaron 4 sesiones de microarreglos con distintos sujetos de estudio utilizando separadamente 5 ratas de cada sexo para cada ensayo con el objeto de asegurar su reproducibilidad. Una vez procesadas las muestras, los resultados cuantitativos fueron analizados estadísticamente con el programa “R”, y fueron seleccionados aquellos genes con expresión diferencial mínima del 50% y reproducibles en un mínimo de 3 de los 4 ensayos realizados.

A continuación se establecieron los criterios de selección con el fin de descartar genes irrelevantes en el DS del hipotálamo. Se eligieron aquellos considerados importantes en el crecimiento, apoptosis, diferenciación, maduración, sinaptogénesis, y/o proliferación celular del SNC; incluyendo genes tipo: factores de transcripción, enzimas metabólicas del ciclo celular, receptores a hormonas, enzimas intermediarias en biosíntesis o catálisis de hormonas, factores anti o pro-apoptóticos, citocinas de señalización y factores de crecimiento principalmente. Una vez reducido el número de genes se procedió a la selección únicamente de dos de ellos para estandarizar las técnicas de localización *in situ*.

## 6.2 HIBRIDACIÓN *IN SITU* (HIS)

De los dos genes elegidos en los MA se obtuvieron las sondas requeridas para la HIS. Una de ellas SOX10 (de la que se hablará más adelante) fue donación del laboratorio del Dr. Michael Wegner (Centro de Neurobiología Molecular de la Universidad de Hamburgo, Alemania), a manera de insertos en plásmidos liofilizados.

La otra sonda para el Receptor de Leptina tipo-b (Lepr) fue adquirida comercialmente a la empresa alemana RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GMBH) como inserto en el plásmido de bacterias E.coli (Clona de la librería 463, Rat Array TAG cDNA- LION plasmid, No. de catálogo LIONp463C08200D2, Requisición No. 2426483).

Con los plásmidos de SOX10 se transformaron bacterias E.coli y junto con las bacterias de Lepr se incubaron a una temperatura de 37°C, en agitación constante y durante toda la noche. A continuación se extrajo (Maxiprep) y purificó el DNA plasmídico, se realizó la digestión con las enzimas de restricción correspondientes a cada sonda; finalmente, se efectuaron las transcripciones tanto para las sondas sentido (mRNA 5'-3') o controles negativos, como para las **antisentido** (cRNA 3'-5') o sondas de interés (Apéndice 3). Entre cada uno de los pasos mencionados, fue necesario corroborar los resultados mediante geles de agarosa al 30% y el análisis de las bandas obtenidas.

El material biológico para la HIS se obtuvo de acuerdo con el protocolo de obtención de muestras (ver apéndice 1), y la fijación del tejido se basó en gradientes de sacarosa con inclusión en medio de montaje (Tissue Tek O.C.T. Sakura, No. de catálogo 4583 (Apéndice 1) y posterior congelación en nitrógeno líquido a -70°C.

Para establecer el grosor ideal del corte de los tejidos en el crióstato (Leica CM3050S) se probaron desde 10 hasta 20 µm de espesor (basado en diversas referencias de la técnica), siendo 16 µm el óptimo para la preservación del tejido durante el tratamiento y así mismo como para una mejor visualización del resultado.

Así mismo, para estandarizar las condiciones óptimas de trabajo, fue necesario inicialmente probar diferentes temperaturas de hibridación, ya que según la literatura las sondas pueden hibridar desde 55 hasta 75°C dependiendo de su fuerza de afinidad, el número de pares de bases G-C y A-T, y la longitud de las mismas (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989).

Se realizaron varias pruebas sobre el protocolo original (mostrado en el apéndice 1) y finalmente se determinó como la temperatura óptima a 65°C para ambas sondas.

Además los tiempos y temperaturas de incubación, las concentraciones de sonda y anticuerpo, fueron modificados hasta obtener el resultado deseado que se logró bajo las siguientes condiciones:

Concentración de las sondas: [1 µg/ ml] (previa a la hibridación)

Dilución del Ac anti-DIG: 1:2000 (Roche)

Reactivos NBT/BCIP en proporción 1:1 (Roche No. Catálogo 1383213 y 1383221 respectivamente).

Por último, los cortes se observaron al microscopio, se analizaron, y se compararon los tejidos de hembra y macho con los obtenidos en la RT-PCR-IS.

### 6.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA *IN SITU*

De la misma manera que en la HIS fue fundamental la síntesis de la sonda, el papel crucial en la RT-PCR-IS lo desempeñan los “primers” o “cebadores”. En este caso, se diseñaron los primers sentido y antisentido para flanquear la secuencia de los genes SOX10 y Lepr, que se muestran a continuación:

♀ **Primer Sentido para SOX10 (21 pb): TGGAGGTTGCTGAACGAGAGT**

♀ **Primer Antisentido para SOX10 (19 pb): TTTTGTGCTGCATCCGGAG**

♀ **Producto de PCR de longitud 73 pb. de para SOX10**

♀ **Primer Sentido de Lepr (21 pb): TTTCTCTTGTGTCCTGCTGC**

♀ **Primer Antisentido de Lepr (21 pb): TGTGCCAGGAACAATTCTTG**

♀ **Producto de PCR de longitud de 106 pb para Receptor de leptina (Lepr)**

Estas secuencias se sintetizaron comercialmente con los laboratorios SIGMA y el siguiente paso consistió en determinar la temperatura media de alineamiento ( $T_m$ ) para cada par de *primers* mediante ensayos de PCR convencional (Apéndice1) y verificándolos en geles de agarosa al 1%, donde la banda más clara indica la temperatura ideal para el par de primers, después de probar con 10 temperaturas diferentes (60-70°C) de acuerdo al número de pares G-C y A-T, la  $T_m$  óptima resultó ser de 62°C para ambos pares de *primers*,, misma que se empleó para los PCR's *in situ*.

El tejido se obtuvo de acuerdo al protocolo ya mencionado en la HIS, y fue sometido a un tratamiento de deshidratación en gradientes de alcohol y xilol hasta finalmente ser incluido en parafina (protocolos descritos en el apéndice 1).

En esta ocasión los cortes se realizaron en un microtomo convencional a un grosor de 5  $\mu\text{m}$  (lo recomendado en el protocolo original), y en orientación coronal de la misma manera que para la técnica anterior. Los tejidos se montaron también en laminillas polarizadas (Fisherbrand No. Catálogo 12-550-15), las cuales se desparafinaron por incubación durante 18 hrs a 60°C.

Inmediatamente después, se desarrolló la RT-PCT-IS siguiendo seis etapas secuenciales del protocolo: Fijación, tratamiento con DNAsas, RT, tratamiento con RNAsas, PCR y Revelado (protocolo detallado en el apéndice1), cuyo fundamento fue descrito en los aspectos metodológicos.

Por último, los resultados fueron observados al microscopio, analizados y comparados con los tejidos de la HIS.

## 7. RESULTADOS

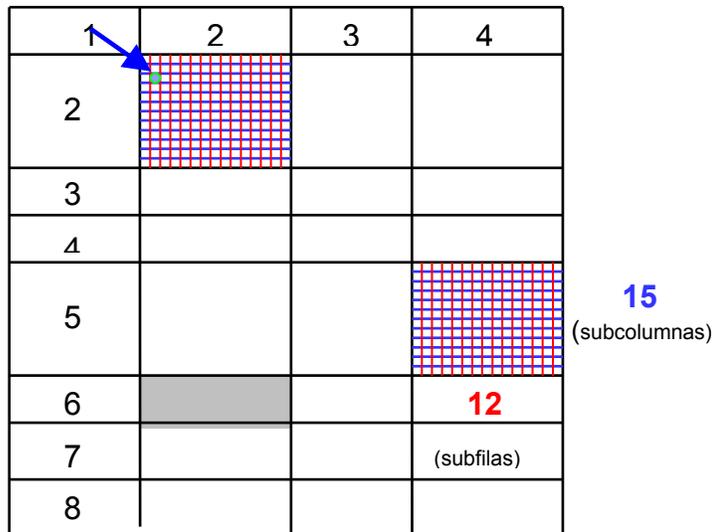
### 7.1 MICROARREGLOS (MA)

La etapa experimental correspondiente a los MA se desarrolló en 4 ensayos con muestras de tejido hipotalámico de 5 ratas macho y 5 ratas hembra (P6) para cada uno de ellos.

El mRNA de cada muestra fue extraído y enviado para su procesamiento a la Unidad de Microarreglos del “Instituto de Fisiología Celular” de la U.N.A.M., para obtener posibles diferencias cuantitativas en intensidad de fluorescencia para cada gen y su fondo o background (Bkg) respectivo. Las tablas con los datos cuantitativos originales que se desprendieron de los MA no se muestran en el trabajo por considerarse irrelevantes, puesto que previo a su manipulación y análisis, los datos crudos de los 5760 genes no revelan ninguna información sobre la expresión diferencial de estos.

Los resultados fueron tratados y analizados por nuestro grupo de laboratorio y la unidad de imágenes del Instituto mediante el paquete estadístico “R” (ver arriba) como se comenta a continuación.

Los datos iniciales fueron agrupados en matrices de  $(8 \times 4)$  ( $12 \times 15$ ) (total de 5760 genes), facilitando tanto su localización en el chip como su manipulación para el análisis, presentándose a continuación de manera gráfica para su mejor comprensión (ver figura 6).



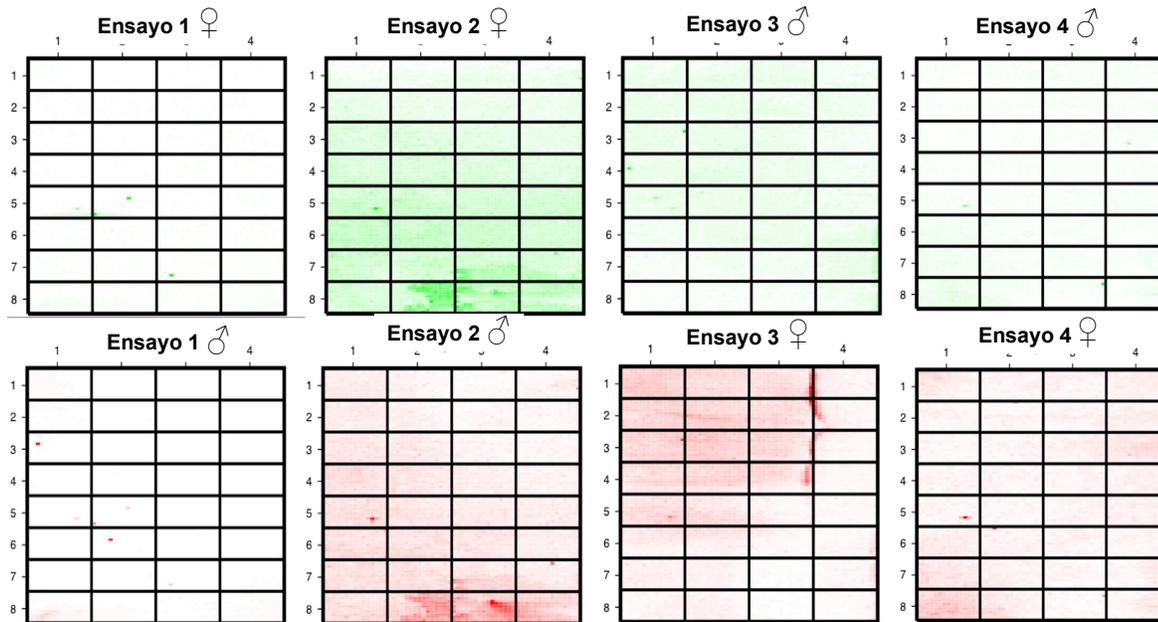
**Figura 6.-** Esquematización de la matriz  $(8 \times 4)(12 \times 15)$  que agrupa los 5760 genes del chip.

En la figura 6, se representa la distribución de los genes en el chip, cada cuadrado mayor (gris) contiene 180 genes  $(12 \times 15)$ , agrupados en una matriz de 8 (filas) por 4 (columnas), de tal forma que para cada gen existe una serie de coordenadas única e irrepetible. Tal es el ejemplo mostrado en la figura, en donde al gen (punto) señalado (flecha) corresponde la posición 2.2.2.3, es decir, pertenece a la columna 2, fila 2, subcolumna 2 y subfila 3.

De cada ensayo de microarreglos realizado (4 en total) se arrojan datos como el diámetro del spot (oligo adherido al chip que se visualiza como un punto fluorescente en el MA), y la densidad e intensidad del mismo, información que es procesada para graficar y ser analizada. Pero además el programa de lectura de las imágenes nos puede mostrar la señal inespecífica o no hibridada de cada spot, a manera de fondo, ruido o background, para entonces discernir la calidad de ese ensayo.

De tal manera, la segunda manipulación de los resultados consistió en graficar el background (Bkg) de los datos, con el fin de observar la homogeneidad en el procesamiento de las muestras de cada ensayo y descartar posibles errores sistemáticos.

## Background



**Gráfico 1.- Distribución del background en los 4 ensayos.** De izquierda a derecha los ensayos 1, 2, 3, y 4. De arriba abajo los fluoróforos Cy3 y Cy5. Las muestras de hembras y machos fueron marcadas de manera diferente en cada ensayo. Con la intersección de los ejes X y Y es posible localizar la posición de cada gen en los chips de MA por coordenadas, siendo exactamente el mismo orden de los genes en los 4 ensayos.

Como se observa en el gráfico 1, la distribución del Bkg para cada ensayo es aparentemente homogénea entre hembras y machos, sin embargo, el ensayo 2 presenta una región localizada con mayor Bkg (más densa) en su parte inferior para ambos sexos, lo que nos sugiere un posible error sistemático en el depósito de las muestras, o una mayor concentración de las mismas.

No obstante, el grupo de trabajo lo consideró irrelevante ya que el problema es equiparable para ambos, además de que el Bkg se sustraería de las intensidades totales para el análisis de los datos. Aunado al hecho de que se decidió seleccionar aquellos genes de expresión diferencial reproducibles en un mínimo de 3 arreglos. A continuación, se sustrajo el Bkg respectivo a la intensidad de fluorescencia de cada uno de los datos originales ( $I_0$ ), eliminando así la señal inespecífica:

$$1) \quad \text{Intensidad Original (Io)} - \text{Background (Bkg)} = \text{Intensidad corregida (Ic)}$$

Se ha documentado que para el tratamiento de resultados de un MA es recomendable el empleo de herramientas matemáticas que simplifiquen la manipulación de un conjunto numeroso de datos con alta disparidad (Parmigiani, Garret, Irizarri, y Zeger, 2003, y Vawter, Barrett, Cheadle, Sokolov, Wood, Donovan, Webster, Freed, y Becker, 2001). Así, el empleo de un logaritmo permite disminuir el margen de variación entre magnitudes sin alterar los valores absolutos de ellas (Daniels, 1989), así mismo, el uso del logaritmo base 2 facilita la dispersión de los valores cuando se tienen solamente 2 condiciones por comparar en un experimento (hembra y macho en este caso), mientras que logaritmos mayores (base 10 o natural) permiten una dispersión más amplia y homogénea, útil para el estudio de varias condiciones experimentales (Garret, Irizarri, y Zeger, 2003, y Jung-Choi, Man-Ha, Choi, Soo, Sung, Kyu, Kim, y Ju, 2001).

Con el objeto de simplificar el manejo de la información se aplicó el logaritmo base 2 ( $\log_2$ ) a todos los datos obtenidos reduciendo así sus magnitudes (desde -20 hasta 20 aproximadamente) pero sin alterar sus valores absolutos.

$$2) \quad \text{Log}_2 (Ic) = \text{Intensidad tratada (It)}$$

Para lograr determinar la expresión diferencial entre sexos, se relacionaron los datos de hembras y machos mediante el cociente entre ellos:

$$3) \quad \text{It de machos} / \text{It de hembras} = \text{Intensidad Total (IT)}$$

Por lo tanto, si la IT es igual o cercana al valor absoluto de "1" indica igualdad de expresión entre los sexos y, por el contrario, entre más alejado de la unidad se encuentre el valor del cociente, significa una expresión diferencial de mayor magnitud en la expresión de ese gen.

A continuación se ejemplifica el tratamiento de los datos con los valores reales correspondientes al gen mostrado:

Gen No. 2048

Nombre: sry-box gene 10 sox10 (SOX10)

Número de acceso al GeneBank: NM\_019193\_1

Posición en el chip: 3,4,5,8.

Densidad en hembra: 316.420382 D.O.      Densidad en macho: 41466.242 D.O.

Bkg en hembra: 111.8049 D.O.                      Bkg en macho: 110.061

Tratamiento:

1) Intensidad Original (Io) – Background (Bkg) = Intensidad corregida (Ic)

Hembra:

$$316.4203 - 111.8049 = 204.6154$$

Macho:

$$41466.242 - 110.061 = 41356.181$$

2) Log2 (Ic) = Intensidad tratada (It)

Hembra:

$$\log_2 ( 204.6154 ) = 7.67677092$$

Macho:

$$\log_2 ( 41356.181 ) = 15.3358153$$

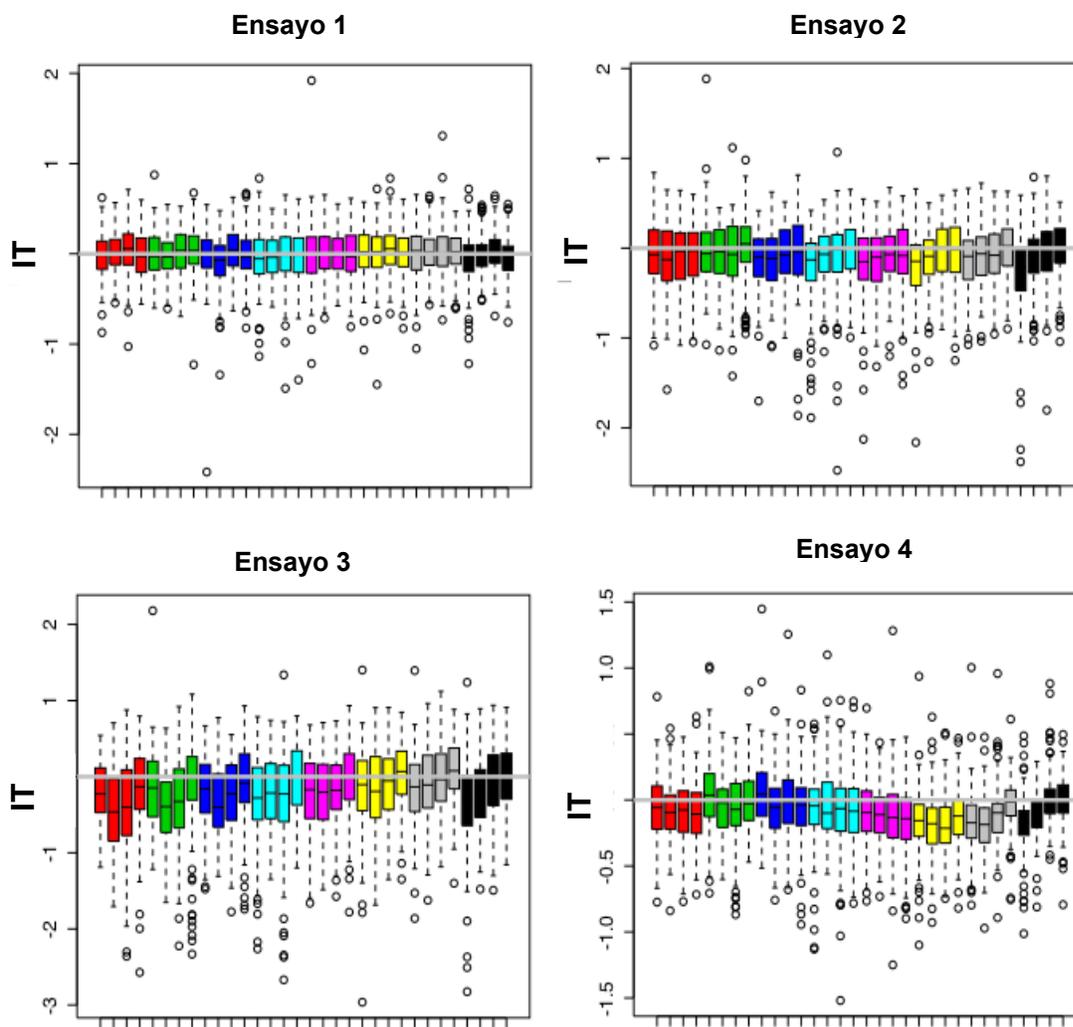
3) It de machos / It de hembras = Intensidad Total ( IT )

$$15.3358153 / 7.67677092 = 1.99769 \quad \dots\dots\dots IT$$

Este procedimiento se realizó para cada uno de los genes (5760) de los 4 ensayos, obteniendo en todos los casos un intervalo de IT con valores desde -3 hasta 3 (Intervalo [-3 a 3]), en donde el signo (+/-) de cada valor no refiere ninguna información en particular y es inherente exclusivamente al logaritmo.

Posteriormente, las IT obtenidas de los cocientes fueron graficadas en Box plot (cajas y bigotes) respetando su ubicación dentro de la matriz y obteniendo el gráfico 2.

## Box Plot



**Gráfico 2.-** Box plot (cajas y bigotes) de los 4 ensayos.

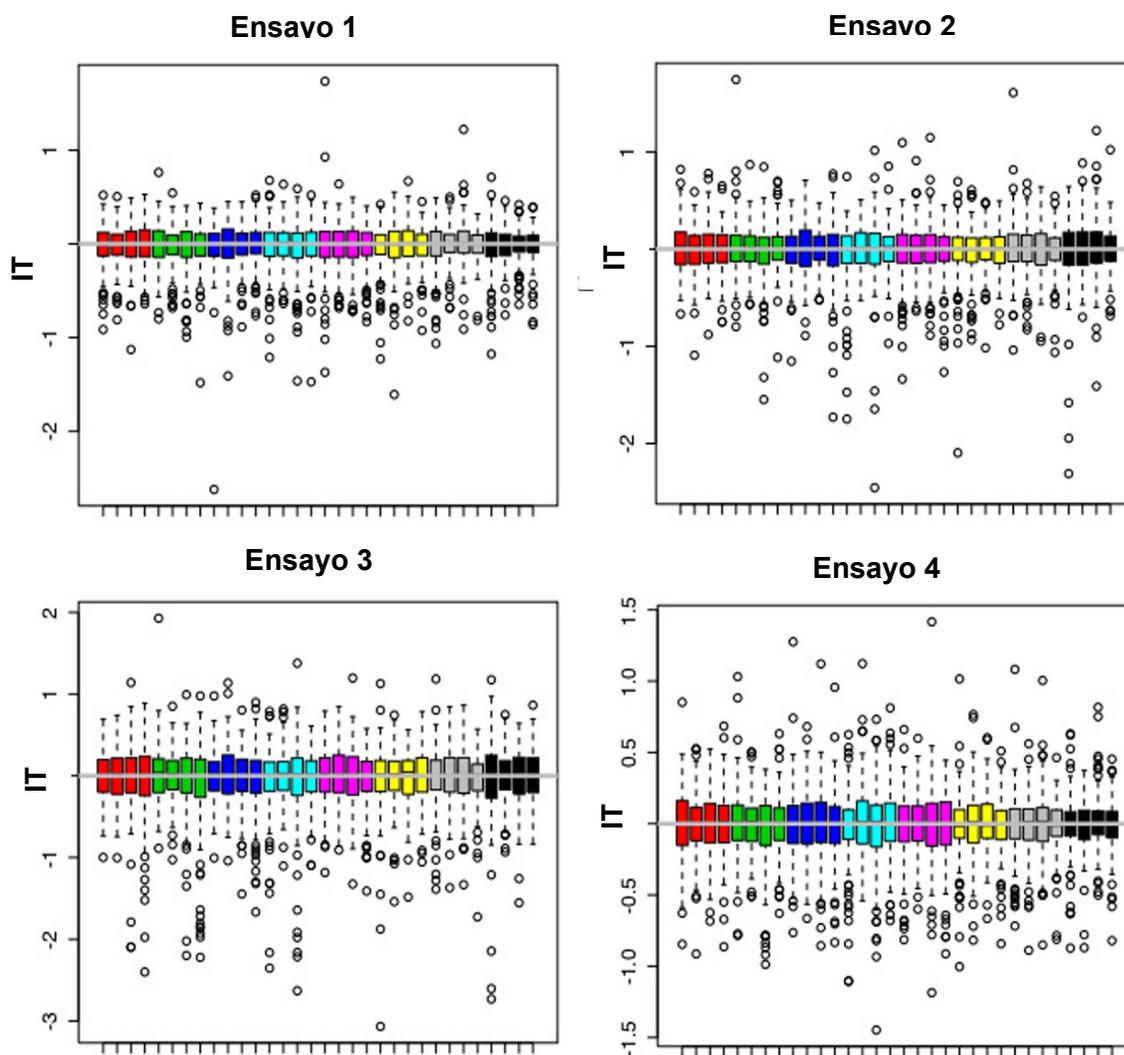
Datos agrupados en matrices de  $(8 \times 4)$  ( $12 \times 15$ ). En el eje de las ordenadas se presenta la posición de los genes en la matriz y en el de las abscisas la intensidad total (IT) de fluorescencia de los genes

En el gráfico anterior se muestran los datos de IT de acuerdo a la posición del gen respecto a la matriz. En cada caja se representan 180 genes ( $12 \times 15$ ), existiendo 4 cajas de un mismo color referente a las columnas, y ocho colores diferentes aludiendo a las filas de la matriz. Ahora bien, cada caja representa dos cuartiles (la mitad) de la población a partir de la mediana (marcada por la línea divisoria de la caja y con un total de 180 genes), los bigotes nos refieren el tercer cuartil, y los puntos fuera de los bigotes corresponden al último cuartil de la muestra, siendo ésta región la de interés en nuestro estudio por referirse a aquellos genes en los que la expresión diferencial fue mayor.

Como se puede observar en el gráfico 2, las medianas no se encuentran alineadas a un mismo punto, imposibilitando la comparación entre los ensayos. En este sentido, el programa "R" cuenta con una herramienta de "normalización" basada en la comparación de los datos con valores de genes control. Es decir, los chips de MA contienen secuencias (oligos) de genes considerados como "genes base", "constitutivos" o "house-keeping"; que se alternan entre los genes de interés actuando como control positivo para el proceso. De los 5760 genes contenidos en los chips de nuestros ensayos, 225 de ellos fueron de tipo constitutivo (gen de GADPH, beta-actina, entre otros), depositados siempre en el mismo orden a lo largo de toda la matriz. Por ser constitutivos tanto en hembra como en macho, estos genes actúan como control positivo intra e inter-arreglo (Parmigiani, Garret, Irizarri, y Zeger, 2003).

La importancia de los genes constitutivos en el análisis de los datos radica en que el programa "R" promedia sus valores de IT (aproximado a 1), y multiplica el valor resultante por cada IT de los genes restantes (5535); logrando así la normalización de los datos con respecto a un punto de referencia (Parmigiani, 2003) (ver gráfico 3).

### Box plot de datos normalizados



**Gráfico 3.-** Box plot (cajas y bigotes) de los 4 ensayos con datos normalizados.

Datos agrupados en matrices de  $(8 \times 4)$   $(12 \times 15)$ . En el eje de las ordenadas se presenta la posición de los genes en la matriz y en el de las abscisas la intensidad total (IT) de fluorescencia de los genes.

El siguiente paso permitió establecer la expresión diferencial con base en los datos obtenidos, ya que todos los valores de IT por arriba o abajo de 1 y -1 (0.999, 1.1, -0.95, -1.2, etc.) podrían considerarse en esta categoría. Del intervalo inicial [-3 a 3] de los datos de IT, se buscaron los genes que se sobre-expresaran por arriba del 50% (intervalo [-1.5 a 1.5]), entendiendo por sobre-expresión a las IT's diferentes de 1, y al valor absoluto de 3 como el 100% de sobre-expresión, entonces, todo aquel valor fuera del intervalo [-1.5 a 1.5] se considera sobre-expresado en un 50%. Así el grupo de trabajo evaluó varios criterios de expresión diferencial de los genes, tales como el 25, 40, 75 y 90% de sobre-expresión, determinando finalmente que el intervalo [-1.5 a 1.5] (equivalente al 50%) proporcionaba las condiciones ideales para fines de comparación del número de genes encontrados. Estableciendo el 50% de sobre-expresión, se localizaron los genes con valores de IT's fuera del intervalo y que además fueran reproducibles en mínimo 3, encontrando 36 genes repetidos en 3 ensayos, y 28 presentes en los 4 arreglos, mismos que se reportan en las tablas siguientes.

## SOBREEXPRESION DEL 50% O MAYOR EN 3 DE LOS 4 ARREGLOS EVALUADOS

NOMBRE	FUNCION	Sobre-EXPRESIÓN
1 -Serpine1	Puede promover la supervivencia neuronal e inhibe la actividad del activador del plasminógeno.	Hembra
ycs: Myc-like oncogene	Actividad como factor de transcripción	Hembra
Ugcg: UDP-glucose	Cataliza la transformación de UDP-glucosa (UDP-Glc) a ceramida para formar glucosilceramida	Hembra
S100a1	Se une al ion Ca <sup>2+</sup> para dirigirlo a Retículo Sarcoplásmico	Hembra
Paics	Actividad carboxilasa	Hembra
slc26a3	Mediador electrolítico para la absorción de fluidos en el colón	Hembra
Bzrap1	Regulación génica implicada en la metástasis	Hembra
mta1	Asociado a metástasis, y puede tener un papel en la regulación genética	Hembra
Atp1a3	ATPasa, transporte de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Hembra
Gnb2	Actividad de GTPasa	Hembra
sry-box 10 sox10	Factor de transcripción asociado con el factor determinante sexual; importante para el desarrollo de células gliales	Macho
Ptf1a	Factor de transcripción del páncreas	Hembra
Pafah1b2	Subunidad cerebral del factor activador plaquetario de acetilhidrolasa	Hembra
GRASP65	Juega una papel importante en el almacenamiento de CHO's en las cisternas del aparato de Golgi	Hembra
Pppr2b2	Regula la actividad catalítica de la fosfatasa	Hembra
Intersectin 1	Se une a la dinamina y a la SNAP 23, y está involucrado en exocitosis	Hembra
nogo-a	Proteína inhibidora del crecimiento neuronal	Hembra
Clathrin	Cadena ligera de la clatrina que cubre a las vesículas	Hembra
kallikrein	Caliceína	Hembra
Creb1	Regula transcripción uniéndose a cAMP	Hembra
Neuromedin	Induce la contracción muscular del útero y la vasoconstricción	Hembra
Sphingosine-1	Esfingosina-1-fosfato fosfolidolasa	Hembra
Nbl1	Supresor tumoral	Hembra
Adamts4	Desintegrina y metaloproteasa involucrada en la enfermedad de Alzheimer	Hembra
CL1BA	Proteína G acoplada al receptor de alfa-Latrotoxina	Hembra
Ntrk3	Receptor tirosin-cinasa de neurotrofina-3	Hembra
Nfib	Regula la expresión de neuronas olfatorias	Hembra
pex11a	Biogénesis de la membrana peroxisomal	Macho
Cryaa	Proteína estructural del "lens" ocular	Hembra
Apoc1	Transportador de lípidos	Macho
megf8	EGF-like	Hembra
Rps5	Componente de la subunidad 40S ribosomal	Hembra
Vegfb	Involucrado en angiogénesis	Hembra
Etle	Mediador de la selección de splicing	Macho
7 Igals7	Lectina galactosidasa de unión	Hembra
Dncic1	Dineína citoplásmica	Hembra

**Tabla 1.-** Genes sobre-expresados 50 % en 3 de los 4 arreglos.86

## SOBRE- EXPRESION DEL 50% EN LOS 4 ARREGLOS EVALUADOS

NOMBRE	FUNCION	Sobre-EXPRESIÓN
Map2k2	Cinasas mitogénicas	Hembra
Synpo	Papel importante en la plasticidad sináptica, asociada a la actina del citoesqueleto	Macho
TNNT2	Troponina cardiaca	Hembra
Tfrc	Receptor de transferrina	Hembra
PRP-2	Proteína provedora de prolinas	Hembra
Plat	Activador de plasminógeno	Hembra
RP4-622L5	Proteina RP4-622L5	Hembra
Cacna1d	Canal de calcio tipo-L	Hembra
Syt7	Sensor de exocitosis sináptica complementaria a las r sinaptotagminas vesiculares	Hembra
Npr3	Papel importante en la hipertensión y el flujo de neurotransmisores	Hembra
Ptf1a	Factor de transcripción del páncreas	Hembra
Chrn4	Subunidad del receptor neuronal nicotínico para acetilcolina	Hembra
Slc8a1	Regulación en el transporte de Ca <sup>2+</sup>	Hembra
Smpd3	Esfingomielina fosfodiesterasa 3, involucrada en crecimiento celular	Hembra
Amelx	Amelogenina del cromosoma X	Hembra
Hprt	Cataliza la conversión de IMP y difosfatos a hipoxantina y 5-fosfo-alfa-D-ribosa, 1-difosfato	Hembra
Leptin receptor	Receptor de leptina	Hembra
Steroid sulfatase	Enzima que convierte precursores sulfatados a estrógenos durante el embarazo	Hembra
Mca32	Citocina inducida por la activación de mastocitos	Hembra
Fibronectin 1	Componente de la matriz extracelular, juega papel importante en metástasis y fibrosis	Macho
Rarb	Receptor de Ác. Retinóico	Hembra
Dipeptidase 1	Actividad de dipeptidasa	Macho
camk2g-prov	Protein-cinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina	Hembra
Dkc1	Procesamiento de mRNA en hígado	Hembra
P2rx2	Receptor purinérgico pX2	Hembra
Glutamate receptor	Papel importante en la transmisión sináptica del dolor por artritis	Hembra
Sulfite oxidase	Cataliza la oxidación de sulfita a sulfato	Hembra
Slc39a1	Transportador iónico	Hembra

**Tabla 2.-** Genes sobre-expresados 50 % en los 4 arreglos.

Así contamos con un total de 64 genes, 36 encontrados en 3 de los 4 arreglos, y los 28 restantes en los 4 ensayos. Debido a que algunos genes aparentaban no estar directamente involucrados con la diferenciación sexual, se establecieron criterios de selección que según literatura consultada, incluyeran genes ya reportados y relevantes para el DS del SNC.

De tal manera, se realizaron revisiones en PubMed y en el banco internacional de genes (GeneBank) sobre la participación y función reportada de cada uno de los 64 genes. Como se comentó en la metodología, se eligieron aquellos considerados importantes en el crecimiento, apoptosis, diferenciación, maduración, sinaptogénesis, y/o proliferación celular del SNC; incluyendo genes tipo: factores de transcripción, enzimas metabólicas del ciclo celular, receptores a hormonas, enzimas intermediarias en biosíntesis o catálisis de hormonas, factores anti o pro-apoptóticos, citocinas de señalización y factores de crecimiento principalmente.

Logrando obtener una lista de los 16 genes relacionados con el DS del hipotálamo, que pueden subdividirse para su estudio en cinco grupos: a) Factores de transcripción, b) factores de crecimiento, c) enzimas metabólicas, d)receptores, y e) proteínas señalizadoras; como se enuncia a continuación:

### **a) FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN:**

#### **1)Receptor de ácido retinóico beta (Rar-b):** (sobre-expresión en macho)

Se acepta que los gradientes de ácido retinóico dirigen la polaridad antero-posterior durante el desarrollo del SNC; la sobre-expresión de su receptor produce alteraciones y arrestos en el ciclo celular (Wang, Zhang, y Parent, 2005). Además, el Rar-b (subunidad exclusiva del SNC) se ha involucrado en la diferenciación celular (hacia neuronas) y en la apoptosis, por lo que se ha vinculado con procesos cancerosos (Lane, y Bailey, 2005). El Rar-b está ubicado en el cromosoma 5 de rata, es un gen regulador de la expresión de genes Hox (Genebank No. Acceso AJ002942\_1).

#### **2)SRY-box SOX10:** (sobre-expresión en macho)

Gen importante en el desarrollo de las células gliales y su especificidad celular (Kordes, Cheng, Scotting, 2005), ya que es un cooperador asociado a la diferenciación de glía hacia oligodendrocitos (Gokhan, Marin-Husstege, Yung, Fontanez, Casaccia-Bonnet, y Mehler, 2005). Gen ubicado en el cromosoma 7 de rata, locus 7q34, que actúa como factor de transcripción asociado al factor determinante sexual SRY (Genebank No. Acceso NM\_019193\_1).

### **3) Neuromedina (Nmu):** (sobre-expresión en hembra)

Gen al que recientemente se le ha involucrado en la ingesta, repartición de energía y liberación hormonal hipofisiaria (Jethwa, Small, Smith, Seth, Darch, Abbott, Murphy, Todd, Ghatei, y Bloom, 2005). Su expresión provoca elevación en los niveles de serotonina en corteza e hipotálamo y se cree que afecta las respuestas endócrinas y neuroquímicas; además, la Nmu es una proteínas ligando de receptores tipo G en la regulación de hormonas neurohipofisarias (Ueta, Ozaki, Saito, 2004). localizado en el cromosoma 14 de rata, cuya función reportada inicialmente fue como gen inductor de la respuesta vasoconstrictora del músculo liso intrauterino (Genebank No. Acceso NM\_022239\_1).

### **4) Factor nuclear I/B (Nfib):** (sobre-expresión en hembra)

El Nfib es un factor expresado principalmente en ratones en desarrollo (Chaudhry, Lyons, y Gronostajski, 1997), y su supresión causa agénesis del cuerpo calloso e hidrocefalia (Das Neves, Duchala, Tolentino-Silva, Haxhiu, Colmenares, Macklin, Campbell, Butz, y Gronostajski, 1999) y ha sido involucrado en la formación de estructuras gliales (Shu, Butz, Plachez, Gronostajski, y Richards, 2003). El gen de Nfib se localiza en el cromosoma 5, locus 5q31, el nfib corresponde a un factor de transcripción que regula la expresión génica nuclear en neuronas olfatorias (Genebank No. Acceso AB012230\_1).

## **b) FACTORES DE CRECIMIENTO:**

### **5) Factor activador de plaquetas acetil-hidrolasa alfa-2 (Pafah1b2):** (sobre-expresión en hembra):

La proteína de Pafah está compuesta por varias subunidades, sin embargo, la subunidad alfa 2 es exclusiva del SNC, en donde se le ha relacionado con los procesos de diferenciación, supervivencia y migración neuronal (Sweeney, Clark, Prokscha, Dobyms, y Eichele, 2000), por lo que se le asume un papel importante en el DS estructural. El gen que codifica para dicha proteína está ubicado en el cromosoma 8 de rata, locus 8q22, el gen pafah codifica para una subunidad intracelular de plaquetas cerebrales (Genebank No. Acceso NM\_022387\_1) y está asociada a lisencefalina.

**6) Factor B de crecimiento del endotelio vascular (Vegfb):** (sobre-expresión en hembra)

El Vegfb está localizado en el cromosoma 1, locus 1q43, y es importante para el crecimiento celular y tisular, ya que desempeña un papel fundamental en la angiogénesis promoviéndola (Genebank No. Acceso AF022952\_1).

**c) ENZIMAS METABOLICAS:**

**7) Proteín-cinasa 2 activadora de mitógenos (Map2k2):** (sobre-expresión en hembra)

Gen cuya relevancia en el DS del hipotálamo se asume por participar en metabolismo y mitosis neuronal, al ser activada por estradiol (Lania, Filopanti, Corbetta, Losa, Ballare, y Spada., 2003). Localizado en el cromosoma 7 de rata, locus (7q11), la expresión de Map2k2 resulta en una enzima activadora de otras cinasas de la familia (Genebank No. Acceso NM\_031643\_1);

**8) Protein-cinasa gamma-2 dependiente de calcio (Camk2g):** (sobre-expresión en hembra)

Unidad de la cadena gamma de la cinasa Camk II, localizada en el cromosoma 15, región 15p16 (Genebank No. Acceso NC\_005114.2) e involucrada con la regulación de las corrientes de calcio. La expresión de este gen se ha detectado en las terminales sinápticas principalmente en tálamo, hipotálamo y corteza, en relación a los procesos de plasticidad sináptica a largo plazo (Musazzi, Perez, Hunt, Racagni, y Popoli, 2005); además, se sabe que está presente en la mayoría de las terminales sinápticas asimétricas, especialmente en neuronas glutamatérgicas, involucrándolo en actividad epiléptica (Lee, Kwon, Shim, Lee, y Suh, 2005).

**9) Esfingomielina fosfodiesterasa 3 (Smpd3):** (sobre-expresión en hembra)

Se sabe que la expresión de Smpd3 es a nivel nuclear interfiriendo con la muerte celular, confiriéndole un papel protector en la neurodegeneración (Stoffel, Jenke, Block, Zumbansen, y Koebke, 2005).

El gen de la Smpd3 está localizada en el cromosoma 19 de rata, locus 19q12 y parece actuar como gen regulador del crecimiento celular (Genebank No. Acceso NM\_053605\_1).

**10) Sulfatasa de esteroides (Sts):** (sobre-expresión en hembra)

La Sts es la enzima encargada de la conversión de dehidroepiandrosterona-sulfato a dehidroepiandrosterona en el proceso de biosíntesis de hormonas esteroideas (Compagnone, Salido, Shapiro, Mellon, 1997). El exceso o disminución de Sts provoca cambios en las concentraciones de esteroides ováricos; mientras que en SNC se le ha relacionado en procesos afectivos e instinto maternal (Wood, 2005). El gen de Sts se encuentra ubicado en el cromosoma sexual X. locus Xq12-14, que codifica a la enzima convertidora de precursores sulfatados a estrógenos (Genebank No. Acceso NM\_012661\_1),

**11) Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (Hprt):** (sobre-expresión en hembra)

La deficiencia de esta enzima en cerebro conlleva la acumulación de histidina, provocando un desbalance en la regulación de los ganglios basales, alterando las interacciones dopamina-adenosina con daño específico a neuronas dopaminérgicas (Connolly, 2001). El gen codificante de la Hprt se localiza en el cromosoma sexual X, locus Xq36, codificando a una enzima catalizadora de la conversión de IMP a hipoxantina (Genebank No. Acceso NM\_017008\_1).

**d) RECEPTORES:**

**12) Receptor de Leptina b (Lepr):** (sobre-expresión en hembra)

El Lepr se encuentra ampliamente distribuido en las neuronas hipotalámicas POMC (ProOpiMelanoCortinas), en donde las cascadas de señales de leptina son muy importantes para la fertilidad (De Luca, Kowalski, Zhang, Elquimist, Lee, Kilimann, Ludwig, y Chua, 2005). La leptina también parece estar involucrada con la organización neuroanatómica resultante de los procesos de mielinización, maduración neuronal y glia.

Adicionalmente, la leptina tiene una influencia neuroprotectora en forma dosis-dependiente (Wilson, Bagnol, Kaelin , Ollmann, Gantz, Watson, y Barsh , 1999). Su gen está ubicado en el cromosoma 5 en rata, locus 5q33 , inicialmente relacionado con el mantenimiento del peso corporal y la saciedad (Genebank No. Acceso AF007818\_1).

### **e) PROTEINAS SEÑALIZADORAS:**

#### **13) Sinaptopodina (Synpo):** (sobre-expresión en macho)

Gen con funciones descritas en la plasticidad sináptica, asociada a la actina del citoesqueleto. Se encuentra localizado en el cromosoma 18 de rata, locus18q12.1, (Genebank No. Acceso NM\_021695\_1).

#### **14) Intersectina-1 (Itsn-1):** (sobre-expresión en hembra)

Gen ubicado en el cromosoma 21 en humano y 11 en rata, locus 11q11. Se reportó inicialmente como una proteína de unión a la dinamina durante el proceso de exocitosis (Genebank No. Acceso NM\_019227\_1); actualmente se sabe que la Itsn-1 está involucrada en el síndrome de Down y se expresa en neuronas de diferenciación y/o proliferación (Pucharcos, Fuentes, De la Luna, Alcantara, Arbones, Soriano, Estivill, y Pritchard,1999).

#### **15) Sinaptotagmina 7 (Syt7):** (sobre-expresión en hembra)

Este gen se localizada en el locus 1q43 del cromosoma 1 de rata, y codifica para una proteína descrita como sensor de calcio membranal durante la exocitosis (Genebank No. Acceso AF336858\_1); también se sabe que esta proteína se encuentra directamente relacionada en la velocidad de reciclamiento de las vesículas sinápticas (Virmani, Han, Liu, Sudhof, y Kavalali, 2003), actuando al mismo tiempo como switch molecular para el splicing alternativo de su forma larga o corta; la primera desacelerando el reciclamiento vesicular y la segunda acelerándolo (Fukuda, Ogata, Saegusa, Kanno, y Mikoshiba, 2002).

#### 16) **Reticulón 4 (Rtn-4):** (sobre-expresión en hembra)

También conocido como Nogo 4, está ubicado en el cromosoma 14 de rata, locus 14q22. Su expresión da origen a una proteína mielínica señalizadora inhibidora del crecimiento neurítico (Genebank No. Acceso NM\_053835\_1); además de inhibir en el crecimiento neurítico y axonal, se sabe que la expresión de este gen induce apoptosis, y que a bajos niveles de reticulón se produce denervación, por lo que se le ha vinculado con la plasticidad cerebral (Buss, Shellhouse, Wolmsley, Noth, Schwab, y Brook 2005).

En principio es importante señalar que ninguno de los 16 genes aquí expuestos había sido vinculado hasta el momento con el DS del SNC, no existiendo reportes previos, y siendo este trabajo el primero en relacionar su expresión con un posible papel de diferenciación sexual.

Todos los genes mencionados serán estudiados a profundidad en trabajos posteriores, tanto su función, expresión, y localización *in situ*, ya que resultaría imposible evaluarlos a todos en el presente proyecto de tesis de maestría. De tal forma que de la lista anterior, se eligieron dos genes con el objeto de comparar entre las técnicas de identificación de expresión génica ya mencionadas (HIS y RT-PCR-IS), y determinar aquella que satisface las necesidades del proyecto como nuestro segundo objetivo, para emplearse posteriormente en trabajos subsecuentes.

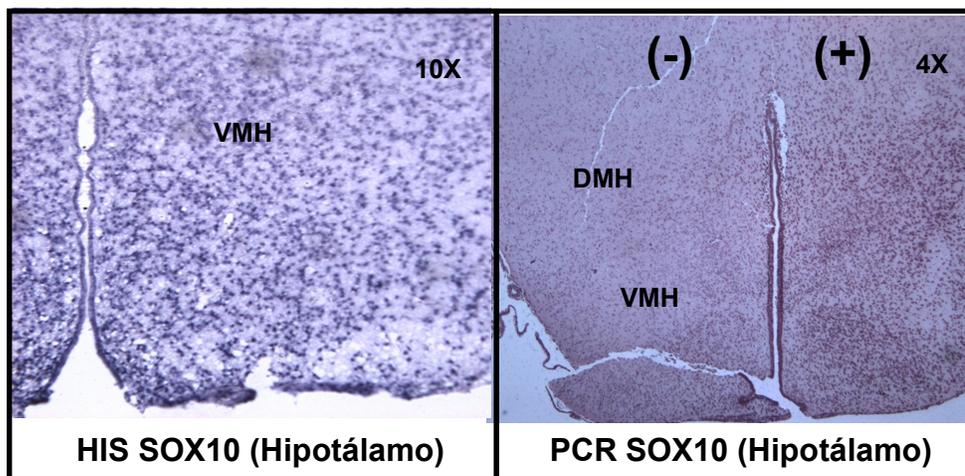
## 7.2 HIBRIDACIÓN Y PCR *IN SITU*

Se eligieron 2 genes al azar: el SOX10 sobre-expresado en machos y el Receptor de Leptina tipo b (Lepr) cuya expresión es mayor en hembra, y de los cuales existe información reportada (no vinculada al DS) sobre sus sitios de expresión en el SNC de la rata adulta (control). Además, cabe mencionar que ambos genes fueron sometidos a PCR en tiempo real (datos no mostrados) encontrando diferencias las mismas diferencias de expresión entre hembras y machos, confirmando así nuestros resultados.

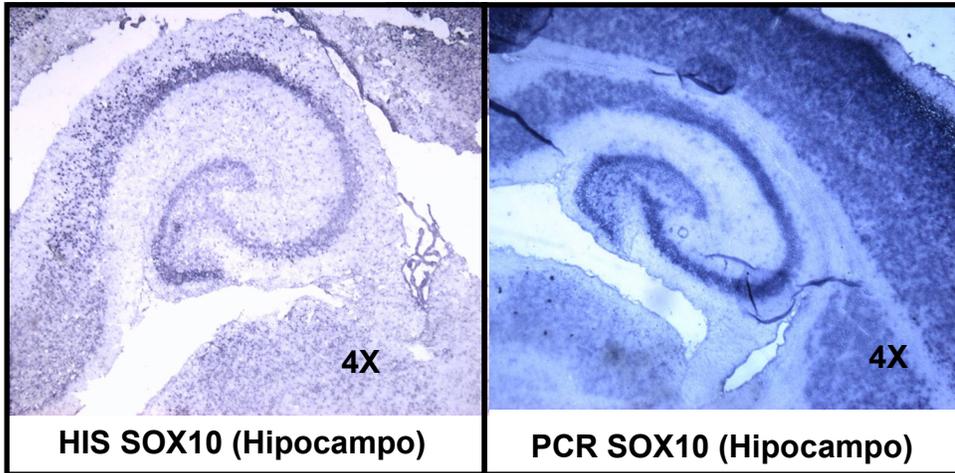
Las condiciones para las técnicas de HIS y RT-PCR-IS fueron estandarizadas previamente (ver metodología), sobre cortes de cerebro de rata Wistar (P6) hembra y macho, tanto para el gen SOX10 como para Lepr, y siguiendo los protocolos de las técnicas obtuvimos los resultados siguientes.

A continuación se presentan las imágenes comparativas entre las técnicas, tratando de mostrar el mismo nivel de corte entre individuos de igual sexo. La señal puede ser identificada por un precipitado (puntos) morado sobre el tejido, fácilmente distinguible del fondo.

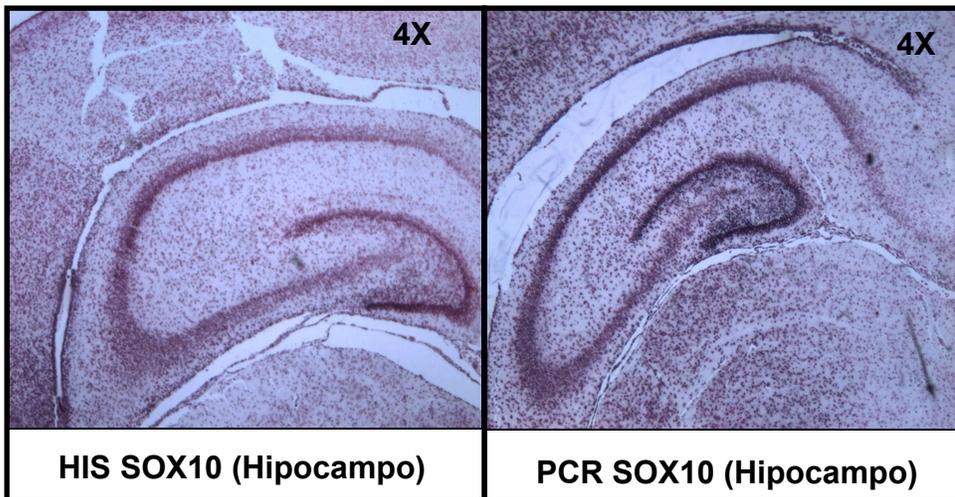
La expresión del gen SOX10 fue clara y comparable entre ambas técnicas, siendo más intensa en núcleos ventromedial (VMH) y dorsomedial (DMH) del hipotálamo (figura 7), giro dentado y circunvolución hipocámpica (figuras 8 y 9), y núcleo cortical de la amígdala (CoAp) (figura 10) que en el resto de las estructuras cerebrales observadas (información no mostrada).



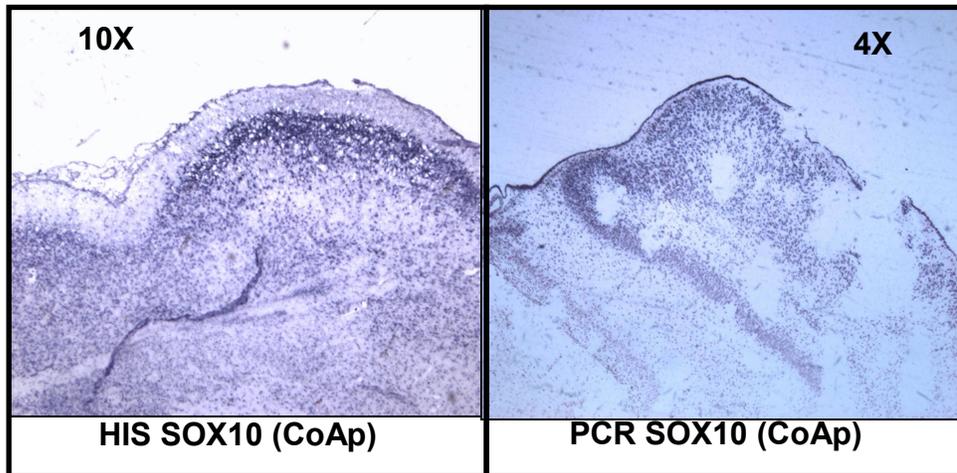
**Figura 7.-** Expresión del gen SOX10 en el Núcleos ventro y dorso-medial del hipotálamo. Cortes coronales, región hipotalámica, ratas macho. El lado izquierdo de la figura muestra la técnica de HIS con expresión positiva para SOX 10, y del lado derecho la técnica de RT-PCR-IS mostrando en el mismo corte expresión positiva(derecha +) y falta de expresión (izquierda -) para SOX10. VMH=Núcleo VentroMedial, DMH= Núcleo DorsoMedial, ambos núcleos bilaterales.



**Figura 8.-** Expresión positiva de SOX10 en el giro dentado del hipocampo.  
 Corte coronal, región hipocámpica, ratas macho.  
 De lado izquierdo la técnica de HIS, y del derecho la de RT-PCR-IS.

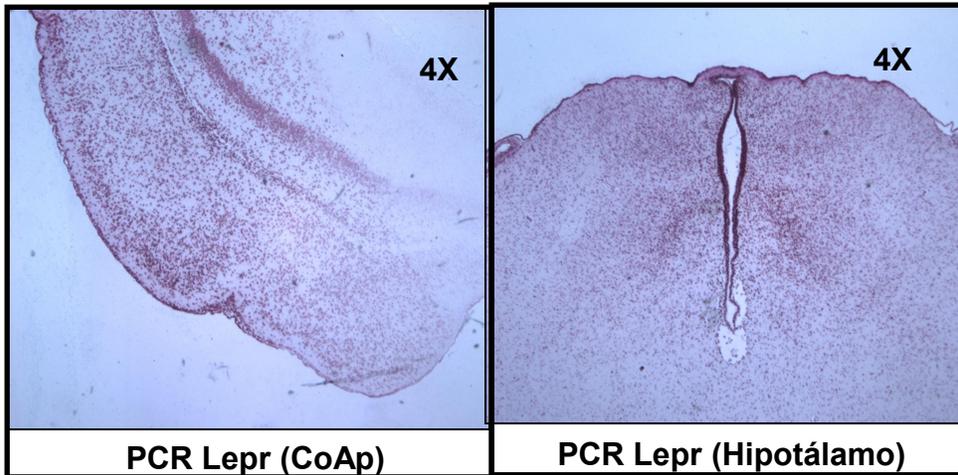


**Figura 9.-** Expresión positiva de SOX10 en circunvolución hipocámpica.  
 Corte coronal, región hipocámpica, ratas hembra.  
 De lado izquierdo la técnica de HIS, y del derecho la de RT-PCR-IS.

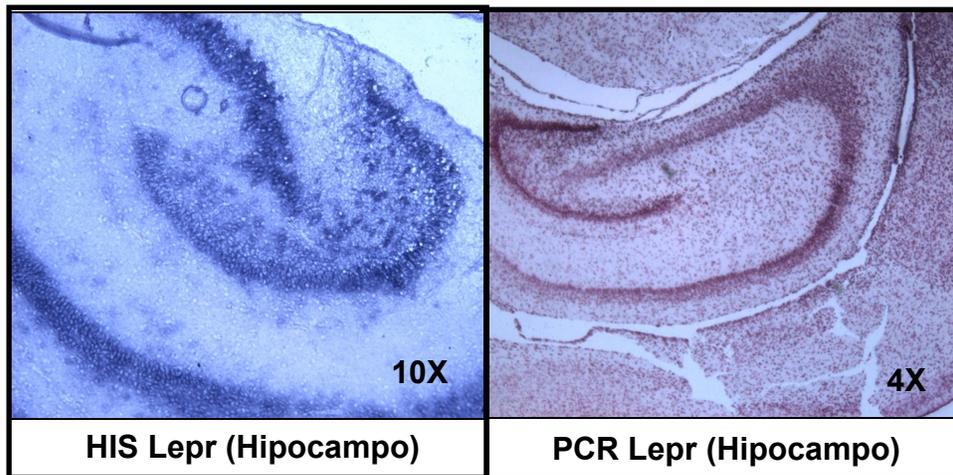


**Figura 10.-** Expresión positiva de SOX10 en el Núcleo cortical de la Amígdala (CoAp).  
 Corte coronal, región de la amígdala, ratas macho.  
 De lado izquierdo la técnica de HIS, y del derecho la de RT-PCR-IS.

Concordante a la bibliografía (Steppan y Swick, 1999) y en ambas técnicas probadas en este trabajo, la localización topográfica de SOX10 en macho fue en Núcleo Cortical de la Amígdala (CoAp) e hipocampo, además en hipotálamo ventral. Así mismo, el receptor de leptina (Lepr) se ha descrito en regiones dienceálicas tanto de hembra como de macho, sin embargo en ningún trabajo se le había relacionado sexualmente, siendo este el primer reporte de sobre-expresión de Lepr en hipotálamo de hembras neonatales. A continuación se muestra la expresión basal de Lepr en rata macho, y la sobre-expresión en hipocampo de rata hembra como control positivo de la técnica según la literatura.

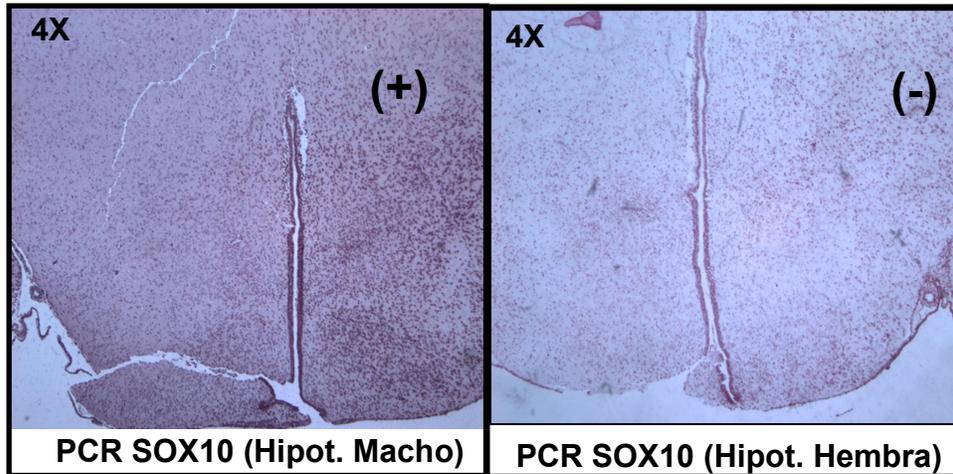


**Figura 11.-** Expresión positiva de Lepr de ratas macho en cortes coronales. A la izquierda expresión de Lepr en el Núcleo cortical de la Amígdala (CoAp), y de lado derecho expresión de Lepr en hipotálamo (periventricular), ambas figuras por la técnica de RT-PCR-IS.



**Figura 12.-** Expresión positiva de Lepr en ratas hembra, cortes coronales, región hipocámpica. A la izquierda se muestra la expresión de Lepr en hipocampo por la técnica de HIS, y de lado derecho expresión de Lepr en hipocampo por la técnica de RT-PCR-IS.

La expresión del Lepr ha sido vinculada en la regulación de la reproducción y la fertilidad, encontrando su expresión en hembra en hipotálamo (núcleos periventricular, dorsomedial y lateral), hipocampo y corteza amigdaloides como se comentará más adelante en la discusión.



**Figura 13-** Expresión diferencial de SOX10 en cortes coronales, región hipotalámica. A la izquierda se muestra la expresión (positiva) de SOX10 en el hipotálamo de rata macho, y de lado derecho la expresión (negativa) del mismo gen en rata Hembra (P6), ambas figuras con la técnica de RT-PCR-IS.

Finalmente, se muestran imágenes de macho y hembra (respectivamente) buscando la expresión del gen SOX10, encontrando que en la hembra no es posible distinguir la misma intensidad de expresión (porción derecha ventricular) que en el macho, corroborando los resultados de los MA que arrojaron una sobre-expresión en el sexo masculino.

## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo principal el de establecer posibles diferencias sexuales en la expresión genética en el SNC de la rata en desarrollo, en particular en el hipotálamo que juega un papel primordial en desarrollo y control endócrino de las funciones reproductivas.

Puesto que las diferencias estructurales del encéfalo son más ostensibles en las áreas directamente involucradas con la reproducción, elegimos la región hipotalámica de animales de cada sexo, durante la etapa que precede a la consolidación estructural del dimorfismo sexual; es decir, hacia el final del período crítico de desarrollo hipotalámico. A partir de múltiples observaciones realizadas por nosotros y por otros grupos de investigación, muestran que es la interacción de las hormonas esteroides con el SNC en desarrollo un poderoso factor inductor que promueve la adquisición de los rasgos fenotípicos que caracterizan a cada sexo. En este contexto supusimos de interés el poder establecer los patrones de expresión genética durante desarrollo, así como determinar posibles diferencias cuantitativas entre los sexos.

Este cuestionamiento estuvo justificado por que a la fecha se desconoce si las neuronas en diferenciación sintetizan “espontáneamente” productos (v.gr. proteínas) relacionados con el fenotipo dimórfico de cada sexo; o bien si éste resulta exclusivamente del bien identificado efecto promotor de las hormonas gonadales.

Dos corrientes han discurrido respecto al dimorfismo sexual del encéfalo invocando mecanismos distintos: Una primera vertiente propone que éste resulta exclusivamente de la interacción temprana de las hormonas sexuales con el genotipo neuronal a lo largo del período crítico de desarrollo, ya que el SNC se convierte en el “órgano blanco” de las hormonas gonadales, asumiendo, un papel relativamente pasivo.

En segunda instancia, con base en los estudios realizados a lo largo del desarrollo gonadal en que los mecanismos de diferenciación están determinados por diferencias sexuales en la información genética (cromosomas), se infiere que dichas diferencias pudieran ser el factor determinante en la génesis del dimorfismo sexual observado en el tejido nervioso.

Más aún, esta concepción está apoyada por la observación de que en prácticamente todos los modelos de dimorfismo sexual experimental, las manipulaciones hormonas gonadales no han sido capaces de revertir completamente ni estructural ni funcionalmente los patrones inherentes a cada sexo (Arnold, 2000).

En este marco teórico, nuestro grupo de trabajo del laboratorio propuso que ambas líneas de pensamiento pudieran reunirse en una hipótesis más conciliatoria en la que “las diferencias sexuales en la composición genética, más que marginales o inertes, participan de manera sinérgica con las variaciones hormonales cuantitativas y cualitativas a las que el SNC en desarrollo está expuesto” y que a su vez, sugiere una interacción temporal y anatómica de eventos genómicos y endocrinológicos. Para someter esta hipótesis a experimentación, elegimos al hipotálamo de la rata, sitio en el que se localizan algunos de los grupos neuronales directamente implicados en la reproducción y que muestran importantes diferencias sexuales estructurales.

La resolución de la hipótesis inicial se proyectó en dos etapas ontogenéticas: la primera, realizada en esta tesis implica la identificación hipotalámica de los genes relacionados con la diferenciación sexual durante el periodo crítico; y la segunda fase por realizar, proyecta la identificación de los mensajeros sexualmente dimórficos en la etapa que precede al periodo crítico, es decir antes incremento de hormonas gonadales que normalmente le precede.

Como se comenta en el apartado correspondiente, durante etapas específicas o periodos críticos, es la interacción de las hormonas esteroides de origen gonadal, placentario y suprarrenal, el factor epigenético más importante en la adquisición de caracteres anatómicos y funcionales específicos de cada sexo.

Durante las tres o cuatro décadas pasadas se estableció mediante técnicas de histología, citología, morfometría e inmunohistoquímica, la caracterización de más de cincuenta elementos neurales sexualmente dimórficos. Más recientemente, con el advenimiento de la biología molecular y la utilización de técnicas de detección de polinucleótidos asociados con la biosíntesis de proteínas específicas, se han podido detectar diferencias sexuales aún más sutiles. Una consecuencia obvia de estos métodos es su enorme fidelidad, puesto que derivan de la utilización de enzimas que multiplican de manera prácticamente infinitesimal los sustratos de interés.

Por otra parte, la detección de mensajeros específicos en los diferentes dominios tisulares y neuronales (v.gr. hibridación y PCR *in situ*) ofrece una resolución espacial inmejorable. Gracias a ello, optamos inicialmente por la cuantificación de mRNA entre individuos de cada sexo, a partir muestras de hipotálamo obtenidas en el periodo crítico de desarrollo. Por sus posibles implicaciones en el proceso de diferenciación sexual estructural, los resultados más relevantes del proyecto actual derivan de los ensayos de microarreglos en ratas recién nacidas.

En estos detectamos un total de 64 genes con expresión diferencial mínima del 50% entre sexos; 16 de ellos codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis de hormonas sexuales, receptores de hormonas no esteroideas, factores de crecimiento, enzimas del ciclo celular, factores pro o anti apoptóticos, factores de transcripción, así como algunos relacionados con la diferenciación celular; parámetros relacionados directamente con los mecanismos de el establecimiento del DS estructural del SNC (vide supra). La expresión sexualmente dimórfica de estos genes y su relación con proteínas relacionadas con los diferentes eventos que participan en el desarrollo y consolidación de las funciones reproductivas justifican que a continuación se discutan separadamente en este contexto.

En primera instancia citamos al grupo de los factores de transcripción, quienes son los principales encargados de la posible expresión o inexpressión de las diferencias sexuales que buscamos.

Así, Encontramos ampliamente documentada la participación del ácido retinóico durante el desarrollo normal del SNC; por ende, el receptor de ácido retinóico beta (Rar-b) es crucial para sus efectos plásticos y metabólicos. Más específicamente, se sabe que durante el periodo crítico la activación del Rar-b inhibe a la muerte neuronal, efecto por el que se le considera un factor de transcripción anti-apoptótico en ratas (Lane y Bailey, 2005). Por otra parte, el ácido retinóico tiene un papel fundamental en la neurogénesis al potenciar la proliferación y diferenciación neuronal de los neuroblastos en mamíferos (Wang, Zhang, y Parent, 2005).

Además, de manera importante para el DS, el nivel de expresión del receptor (Rar-b) varía durante el ciclo estral de la rata de manera directamente proporcional con las variaciones cíclicas de hormonas esteroideas, sugiriendo un vínculo entre la actividad transcripcional de éstas y la regulación en la expresión de Rar-b (Camacho-Arroyo, 2005).

En el contexto de la diferenciación sexual hipotalámica, el dimorfismo sexual en Rab-b detectado en nuestro estudio es altamente relevante, puesto que indica que los efectos inductores de las hormonas esteroides observados en este sitio (apoptosis, migración, sinaptogénesis, etc.:) parecen requerir de manera suplementaria o sinérgica de la activación de otras vías metabólicas, en particular de las dependientes de vitamina A.

Por otro lado, el DS estructural en el caso de diferenciación celular hacia estructuras gliales en el hipotálamo de rata en este estudio se encontraron dos genes, el Factor nuclear I/B (Nfib) (sobre-expresión en hembra) y el gen SOX10 (sobre-expresión en macho) y del que se detallará posteriormente. La falta de expresión de Nfib en ratones macho knock out (E15-E17) redundaba en la disminución (+/-) y en casos de homocigosis (-/-) en la ausencia de células gliales en telencéfalo dorsal, principalmente en cuerpo calloso, corteza del cíngulo y comisura anterior (Shu, Butz, Plachez, Gronostajski, y Richards, 2003; Kordes, Cheng, y Scotting, 2005), lo que nos sugiere DS a nivel estructural y sobre todo de circuitos y conexiones neuronales.

De la misma manera nos referiremos ahora a los factores de crecimiento encontrados, quienes intervienen de manera directa en la diferenciación celular, y por lo tanto se ven altamente involucrados en el DS.

Comenzando con el gen que codifica al factor activador de plaquetas acetil-hidrolasa alfa-2 (Pafah1b2), que participa en procesos de coagulación a nivel sistémico, codifica también en el SNC a una subunidad de la enzima Lisencefalina (Lis). Esta enzima guarda estrecha relación con los procesos de diferenciación, supervivencia y migración neuronal en etapas incipientes del desarrollo del SNC. Su participación en dichos procesos se evidencia por la escasa cantidad de Lis en las áreas hipoplásicas observadas en la lisencefalia humana (Sweeney, Clark, Prokscha, Dobyns, y Eichele, 2000). Adicionalmente, la Lis parece estar relacionada con la migración neuronal en células de Purkinje en corteza cerebelar en estadios intermedios de la gestación de la rata (Isumi, 1998).

Finalmente, en el humano la Lis parece estar relacionada con los procesos de integración psicoafectiva (Ohtsuki, 2002). Mientras que el Factor B de crecimiento del endotelio vascular (Vegfb) es importante para el crecimiento celular y tisular, ya que desempeña un papel fundamental en la angiogénesis promoviéndola, lo que favorece el crecimiento celular en la zona de expresión.

Siguiendo como el grupo de enzimas involucradas en el metabolismo de procesos importantes como la diferenciación y crecimiento celular, apoptosis, señalización intracelular entre otras, tenemos que la Proteínasa-2 activada por mitógenos (Map2k2) es una proteína cuya relevancia en el DS del hipotálamo se infiere a partir de las observaciones previas que prueban su participación en la mitosis neuronal mediada por estradiol (mitógeno). Lo anterior nos permite sugerir que su elevación de Map2k2 durante los periodos críticos del desarrollo del SNC, tal y como se observa durante la ovulación en rata (Nordstrom, 2005). Más aún, el incremento de Map2k2 observado aquí, es concomitante con los eventos morfogénicos asociados al crecimiento y diferenciación neuronal celular, observación que está en consonancia con la asociación de Map2k2 con el crecimiento y proliferación de adenomas y gliomas cerebrales (Lania, Filopanti, Corbetta, Losa, Ballare, y Spada, 2003).

De especial interés resulta el dimorfismo cuantitativo observado tanto la Protein-cinasa gamma-2 dependiente de calcio (Camk2g) como la Esfingomielina fosfodiesterasa 3 (Smpd3). En efecto la expresión de CamK2g y Smpd3 ha sido observada en las terminales sinápticas en tálamo, hipotálamo y corteza de ratón, entre otros (Musazzi, Perez, Hunt, Racagni, y Popoli, 2005). Dado que además la hibridación in situ revela que estos genes se expresan a nivel nuclear, se ha propuesto que sus productos interfieren con la muerte celular considerándose genes anti-apoptóticos. En apoyo de esta tesis, es que la expresión de CamK2g y Smpd3 es estimulada a la alta por la hormona del crecimiento (GH), tanto en neuronas hipotalámicas neurosecretoras (GHRH) de núcleo arcuato y paraventricular, como directamente en los somatotropos de pars distalis (Stoffel, Jenke, Block, Zumbansen, y Koebke, 2005).

Nuestros hallazgos, a la par de las evidencias aquí presentadas apoyan la participación directa de CamK2g y Smpd3 en los procesos neurogénicos y sinaptogénicos sexualmente dimórficos observados en el hipotálamo de los roedores.

En el mismo ámbito el gen de la sulfatasa de esteroides (Sts) significa un prospecto importante en la contribución del DS, ya que esta proteína es una enzima convertidora de precursores sulfatados a estrógenos durante su proceso de biosíntesis, específicamente en el paso de Dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) a Dehidroepiandrosterona (DHEA), un mecanismo clave en la síntesis tanto de estradiol como de estrógenos. La Sts se expresa en diversos tejidos, y a nivel de SNC se ha encontrado en tálamo, hipotálamo, hipocampo, corteza, cerebelo y médula espinal de embriones de ratón (E16-E19) (Compagnone, Salido, Shapiro, y Mellon, 1999); por otro lado, tanto DHEA como DHEAS tienen un papel importante en la diferenciación de neuronas neocorticales, la primera promoviendo el crecimiento axonal, y la segunda el crecimiento dendrítico y el reclutamiento celular; además, se ha propuesto que el balance de DHEA y DHEAS controla el crecimiento axonal/dendrítico de las fibras cortico-talámicas durante la organización de la neocorteza de embriones de ratón (Compagnone, Salido, Shapiro, y Mellon, 1997).

Por último, se ha encontrado expresión de Sts en altas concentraciones en placenta por lo que se ha considerado como un recurso importante en el suministro de hormonas esteroideas del feto (Word, 2005). Ahora bien, a diferencia de lo que esperábamos encontrar, solo se obtuvo un receptor (Lepr) lo suficientemente sobreexpresado (50%) para ser incluido en nuestro estudio, además de no ser un receptor hormonal como se esperaba. A pesar de ello consideramos que el receptor de leptina (Lepr) puede ser de gran relevancia para el DS del hipotálamo, ya que se le ha reportado actividad de hormona a la leptina como tal.

Diversos estudios manifiestan que la leptina (Lep), observada en mayor cantidad en la hembra, pudiera estar involucrada en el establecimiento de patrones de conectividad sexualmente.

Como a continuación se comenta, estudios previos muestran que Lep participa directamente en la diferenciación y en el establecimiento de circuitos neuronales, incluyendo aquellos relacionados con las funciones de apareamiento (Simerly, 2004). Más específicamente, evidencias prueban que la Lep es requerida para el establecimiento de conexiones entre los núcleos hipotalámicos arcuato y ventral medial, conexión que es sexualmente dimórfica. Observaciones adicionales al respecto muestran que las Lep participan en los procesos de mielinización, maduración neuronal y glial, y como neuroprotectora en forma dosis-dependiente en el núcleo arcuato de rata en desarrollo y en etapa puberal (Wilson, Bagnol, Kaelin, Ollmann, Gantz, Watson, y Barsh, 1999). En lo referente a la expresión del gen que codifica para el Lepr, ésta ha sido vinculada con la regulación de la reproducción y la fertilidad por (Smith, Jackson, y Foster, 2002; González, Caballero-Campo, Norman, Chardonens, Devoto, y Bischof, 2000), participar en la regulación de la secreción de gonadotropinas (Barb, y Kraeling, 2004), siendo altamente expresado en neuronas de POMC (ProOpioMelanoCortinas) (Balthasar, Coppari, McMinn, Liu, Lee, Tang, Kenny, McGovern, Chua, Elmquist, Lowell, 2004), por lo que se esperaba su expresión en áreas mediales del hipotálamo concordantemente con los resultados obtenidos (figura 11b). Además, se ha relacionado con el desarrollo del cerebro (Steppan y Swick, 1999) y con el establecimiento de circuitos hipotalámicos (núcleos periventricular, dorsomedial y lateral) (Simerly y Bouret, 2004).

Finalmente, se ha visto un papel neuroprotector ante daños citotóxicos al expresarse Lepr sobretudo en hipocampo (Dicou, Attoub, y Gressens, 2001), por lo que esta estructura es un buen control positivo de expresión (figura 12). Además, los estrógenos pueden modular su expresión en hipotálamo (Meli, Pacilio, Raso, Esposito, Coppola, Nasti, Di Carlo, Nappi, y Di Carlo, 2004) y su expresión se ve reducida al androgenizar el cerebro neonatal femenino (Morash, Ur, y Wilkinson, 2001). En breve, la existencia de dimorfismo sexual en la expresión de Lepr subyace a numerosos mecanismos de crecimiento y diferenciación neural relacionados directamente con el establecimiento del fenotipo específico de cada sexo.

Por último, las proteínas señalizadoras que intervienen como inductoras, inhibidoras o direccionadoras de otras proteínas, estableciendo la comunicación intra o intercelular. La Neuromedina (Nmu) por ejemplo, es una proteína considerada como neuropéptido hipotalámico involucrado en la liberación hormonal hipofisiaria, especialmente relacionada a mecanismo de saciedad y gasto energético actuando de manera coordinada con la leptina, y participando en la distribución de la grasa corporal (Jethwa, Small, Smith, Seth, Darch, Abbott, Murphy, Todd, Ghatei, y Bloom, 2005), presuponiendo un papel dimórfico entre los sexos. Además, se ha observado que la administración de Nmu intracerebroventricular en ratas macho adultas (200-250g) afecta respuestas endócrinas de manera importante en relación al eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, causando liberación de la hormona de estrés y por consecuencia incrementando actividad locomotora y activando al sistema nervioso simpático (Kowalski, 2005).

El mensajero que codifica Reticulón 4 (Rtn-4) da origen a una proteína mielínica señalizadora inhibidora del crecimiento axonal en proencéfalo y telencéfalo de ratas y ratones durante el desarrollo intrauterino (Buss, Shellhouse, Wolmsley, Noth, Schwab, y Brook, 2005); así mismo, su presencia restringe la proliferación y crecimiento neuronal del lóbulo frontal en fetos humanos (8, 16, 19, y 21 semanas de gestación) (Halabia, 2005).

Rtn-4 también llamado NOGO, ha sido implicado en la plasticidad sináptica del hipocampo de ratas adultas incrementando su expresión posterior a una lesión (Cai, 2005); y según estudios de resonancia magnética en humanos con epilepsia, se ha sugerido que la expresión de Rtn-4 precede a la neurodegeneración (Bandtlow, 2004). Aunque en la actualidad resulta prematuro inferir el papel exacto que el Rtn-4 en la génesis del hipotálamo murino, parecería razonable sugerir su posible participación en aquellas estructuras hipotalámicas cuyo tamaño se mantiene relativamente estacionario, tal y como ocurre en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica de la hembra (Jacobson y Gorski, 1979).

El gen que codifica para la Sinaptopodina (Synpo) ha sido identificado en neuronas piramidales del hipocampo, especialmente en CA3 y CA1 en el día posnatal 6, y sin expresión en interneuronas (Czarnecki, 2005). Así mismo, la expresión de Synpo se ha visualizado mediante inmunocitoquímica, en cultivos celulares de hipocampo de embriones de rata (E19). En estos estudios se documenta que esta proteína está unida a la actina del citoesqueleto formando espinas dendríticas (Kremerskothen, Plaas, Kindler, Frotscher, y Barnekow, 2005), por lo que se infiere su participación en la plasticidad sináptica hipocámpica (Deller, 2006), o bien, como propone Roth (2001) modulando la forma y motilidad de estas espinas dendríticas durante la formación o eliminación de contactos sinápticos. Claramente, los hallazgos aquí enumerados sugieren que la Synpo parece estar también involucrada en la sinaptogénesis hipotalámica, toda vez que sus núcleos arcuato (Arai y Matsumoto Psychoneuroendocrinology), área preóptica (Raissman y Field, 1973) núcleos preóptico medial (, Larriva-Sahd, 1989) y ventral medial (Matsumoto, Larriva-Sahd, 1983), entre otros, muestran dimorfismo sexual en densidad numérica de contactos sinápticos. Más aún, dicha densidad se adquiere a lo largo del periodo perinatal y está determinada por las hormonas sexuales de origen gonadal (Larriva, Arai, Matsumoto y Larriva Matsumoto).

El gen de la Intersectina (Itsn-1) por su parte, se expresa en neuronas de diferenciación y/o proliferación a lo largo del desarrollo. En efecto, la Itsn-1 se identifica por inmunohistoquímica en neuronas tanto de fetos humanos (18-22 semanas de gestación) como de ratón (día gestacional 16).

En el ratón, la *Itsn-1* se detecta en los cuerpos neuronales del prosoencéfalo en desarrollo, mientras que en la etapa adulta su expresión desaparece (Pucharcos, Fuentes, De la Luna, Alcantara, Arbones, Soriano, Estivill, y Pritchard, 1999). Además, la ausencia de *Itsn* repercute en sinápsis aberrantes presentes en el Síndrome de Down; y finalmente, la *Itsn* constituye una proteína compleja que forma parte de la maquinaria endocítica de las neuronas durante la recaptura y el reciclaje de neurotransmisores (Tong, 2000), motivos suficientes para suponer que la sobreexpresión de *Itsn* en hembra se encuentra directamente vinculada con el DS del SNC a nivel sináptico, estructural y/o organizacional.

A los productos de síntesis de los genes hasta aquí enumerados, cuya participación ocurre fundamentalmente en eventos plásticos y fenotípicos, se adicionan los genes cuya expresión resulta en modificaciones membranales que resultan en variaciones en la generación y propagación de impulsos nerviosos que, como se sabe, corresponden a los efectos transitorios de las hormonas gonadales (vide supra). En este grupo queda inserto el gen que codifica para la Sinaptotagmina 7 (*Syt7*) y que es sobre-expresado en las hembras. Puesto que en el hipocampo del animal recién nacido la *Syt7* está directamente relacionada con la velocidad de reciclamiento de las vesículas sinápticas (Virmani, Han, Liu, Sudhof, y Kavalali, 2003), parece ser adecuado el sugerir que, en el hipotálamo en desarrollo pudiera guardar relación con los procesos de excitabilidad y neurotransmisión asociados con la formación y establecimiento de redes neuronales sexualmente dimórficas (Simerly, Handa y Swanson 1985).

Finalmente, retomando y dentro del mismo contexto genético, los resultados del presente estudio muestran que solamente 2 de los 16 genes mencionados se encuentran ubicados en los cromosomas sexuales (específicamente en el X), mientras que el resto son localizados en autosomas, sugiriendo que el sexo genético del individuo no es fundamental para el establecimiento del DS del hipotálamo. Por otro lado y de acuerdo a lo esperado, algunos genes son de tipo constitutivo mientras que otros son inducibles de expresarse bajo ciertas condiciones o por la influencia de algún inductor específico (factores de crecimiento u hormonas por ejemplo).

Así mismo, dos de los genes fueron elegidos (SOX10 y Lepr) para indagar sobre sus sitios de expresión en hipotálamo y áreas aledañas cubriendo nuestro segundo objetivo particular, y mostrando que las dos técnicas moleculares para la visualización de los mRNA's *in situ* (Hibridación y el PCR *in situ*) aquí empleadas son satisfactorias para continuar con el estudio.

Concordante a la literatura reportada sobre la expresión del gen SOX10, los hallazgos obtenidos con ambas técnicas coinciden en su localización topográfica en macho, principalmente en células de linaje oligodendrocítico (CoAp e hipocampo), en sitios del cerebro en procesos de diferenciación (CoAp e hipocampo) (Kuhlbrodt, Herbarth, Sock, Enderich, Hermans-Borgmeyer, y Wegner, 1998), y más recientemente se reportó la expresión de SOX10 en células GnRHérgicas (hipotálamo ventral) durante su proceso de diferenciación (Whitlock, Smith, Kim, y Harden, 2005). Además, la expresión de SOX10 en la inducción de precursores neurales hacia oligodendrocitos ha sido comprobada en SNC pero no en SN periférico, sugiriendo que una misma proteína puede incurrir en funciones de diferenciación entre el SNC y el periférico (Wegner y Stolt, 2005), y encontrándose expresión de SOX10 en las crestas neurales a lo largo del desarrollo durante todo el proceso de diferenciación neural (Hong y Saint-Jeannet, 2005).

Refiriéndonos a las técnicas empleadas, no se aprecian diferencias aparentes entre ellas en cuanto a señal e intensidad. En ambos casos se obtuvieron patrones de expresión similares para los 2 genes estudiados, lo cual nos refiere tanto a la eficiencia y reproducibilidad de las técnicas como al sitio de expresión del gen. En lo que se refiere a la HIS, resulta una técnica cualitativa sencilla, económica específica y sensible; mientras que la RT-PCR-IS resulta una técnica laboriosa, relativamente cara, requiere de un mayor número de reactivos y equipo específico, y de más cuidados durante la práctica, sin embargo, pudiera ser semicuantitativa si se aplican algunas variantes al protocolo y es sumamente específica. Sin embargo, nuestros datos de diferencias de expresión entre los sexos, al menos para los genes SOX10 y Lepr, son avalados y confirmados por los resultados obtenidos en los PCR tiempo real (datos no mostrados) efectuados, confirándole credibilidad y un mayor peso al trabajo experimental aquí presentado.

## 9. CONCLUSIONES

El DS corresponde una serie de eventos morfofisiológicos y genéticos que actúan sinérgicamente entre ellos de manera secuencial y que se establece durante periodos bien definidos. El caso del SNC no es diferente, y el establecimiento de las diferencias sexuales se manifiestan estructuralmente en: tamaño nuclear, número neuronal, densidad sináptica, arborizaciones y espinas dendríticas, número de fibras, y cantidad de neurotransmisores; procesos que se logran con enzimas limitantes de la biosíntesis de hormonas sexuales, receptores de hormonas no esteroideas, factores de crecimiento, enzimas del ciclo celular, factores pro o anti apoptóticos, factores de transcripción, y factores de diferenciación y maduración celular principalmente.

Como se ha demostrado en este trabajo, los perfiles de expresión genética en el hipotálamo de rata Wistar del día postnatal 6 son sexualmente dimórficos, ya que al menos 64 genes se expresan de manera diferencial, demostrando que existe un factor genético intrínseco independiente al ambiente hormonal presente en el periodo crítico de la diferenciación sexual del SNC. En base a esto, el grupo de trabajo confirma su hipótesis y propone un sinergismo entre los factores hormonales y genéticos involucrados en los procesos de diferenciación sexual del SNC.

Por otra parte, los objetivos generales y particulares fueron satisfactoriamente cumplidos al encontrar toda una gama de genes expresados de manera diferencial con la técnica de MA, y probar las técnicas de biología molecular (HIS y PCR-IS) para la visualización de la expresión de dos de estos genes (SOX10 y Lepr), en donde ambas técnicas resultaron eficientes, específicas y reproducibles para nuestros objetivos, siendo ampliamente recomendable cualquiera de ellas.

Finalmente, se propone el estudio de cada uno de los genes aquí reportados, desde su sitio de expresión, manipulación, interacción con el ambiente hormonal y hasta su posible vínculo con el DS.

## 10. APENDICE 1

### PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

#### **Obtención de las muestras**

- 1.- Sacrificio de los animales (ratas de la cepa Wistar y con seis días de nacidas) por decapitación, sin anestesia previa, y separando hembras y machos.
- 2.- Extracción del cerebro completo, cortando los nervios ópticos para evitar el desgarre del hipotálamo.
- 3.- Localización del hipotálamo por detrás de la cintilla óptica y hasta los cuerpos mamilares con ayuda del microscopio estereoscópico.
- 4.- Corte de la rebanada coronal del tejido hipotalámico (5 mm de espesor aprox. para el hipotálamo completo).

NOTA: Su procesamiento posterior dependerá de la técnica en que se ocupe la muestra.

#### **Extracción de RNA total por el método de Trizol para Microarreglos.**

- 1.- Disecar el tejido fresco (ver protocolo de obtención de muestras) y colocarlo en PBS en cama de hielo, hasta juntar un aproximado de 100 mg de tejido (en este caso se requieren de 5 hipotálamos para completar tal cantidad).
- 2.- Homogenizar los 100 mg en 1 ml. de Trizol, usando una jeringa de 3 ml.
- 3.- Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- 4.- Agregar 0.2 ml. de cloroformo por cada ml, de Trizol.
- 5.- Agitar en vortex e incubar 2-3 min. a temperatura ambiente.
- 6.- Centrifugar a 12000 rpm por 15 min. a 4°C y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
- 7.- Agregar 0.5 ml. de isopropanol por cada ml. de Trizol e incubar a temperatura ambiente 10 min.
- 8.- Centrifugar a 12000 rpm por 15 min. a 4°C y desechar el sobrenadante.
- 9.- Lavar el botón 2 veces con 1 ml. de etanol al 75% (en agua DEPC), centrifugando a 7500 rpm durante 5 min. a 4°C.
- 10.- Secar el botón y resuspender en 30 ml. de agua DEPC.
- 11.- Cuantificar el RNA total en espectrofotómetro.
- 12.- Trabajar con 100 microgramos para cada ensayo de MA.

### **Fijación del tejido para HIS**

- 1.- Obtener la muestra según el protocolo y colocar la rebanada de tejido en un tubo Falcon de 50 ml. con PBS pH= 7.4 en agitación a 4°C toda la noche.
- 2.- Cambiar la solución por sacarosa 10% en PBS e incubar en agitación a 4°C hasta que el bloque de tejido deje de flotar y se deposite en el fondo del tubo (crioprotección).
- 3.- Repetir el paso anterior pero con sacarosa al 20 % en PBS.
- 4.- Repetir con sacarosa 30 % en PBS.
- 5.- Agregar medio de montaje (Tissue-Tek) y congelar el bloque de tejido sumergiendo en Nitrógeno líquido (-70°C)
- 6.- Realizar cortes en crióstato de 16 micras y montarlos sobre laminillas polarizadas.

### **Hibridación *in situ* en cortes adheridos a porta objetos**

Después de la fijación y el reposo de los tejidos, las laminillas se colocan en cámaras de hibridación, en donde se realizan los cambios de soluciones según el protocolo que se detalla a continuación.

**Cuadro 1. Primer día**

<b>Solución</b>	<b>No. repeticiones (rep.)</b>	<b>Tiempo Minutos (min.)</b>	<b>Temperatura de manejo de las muestras (TMM)</b>
*PBT (PBS+Tween 20 0.1%)	2	8	Temperatura ambiente (TA)
Metanol 50 %/*PBT	1	3	TA
Metanol 100%	2	3	TA
Metanol 66%/PBT	1	3	TA
Metanol 50%/PBT	1	3	TA
Metanol 33%/PBT	1	3	TA
PBT	2	5	TA
PBT/Mezcla hibridación 1:1	1	5	TA
*Mezcla hibridación	1	5	TA
Mezcla hibridación	1	3 horas	65°C en cámara de formamida 50%
<b>Sonda</b>	1	16 horas	65°C

\* La preparación de estas soluciones se describe en el apéndice 2.

#### **Sonda:**

Para 8 laminillas:

♀ 1.8 ml de mezcla de hibridación

♀ 200 µl de sonda [1µg/ml] marcada con Digoxigenina-uridin 5´trifosfato (DIG-UTP).

♀ Incubar la mezcla 10 minutos a 65 °C.

♀ Agregar 250 µl de la mezcla sobre cada laminilla.

**Cuadro 2. Segundo día**

Solución	No. rep.	Tiempo min.	Temperatura de la solución	TMM
Mezcla hibridación	2	10	65°C	TA
Mezcla hibridación	2	45	65°C	TA
TBST/ Mezcla hibridación 1:1	1	10	65°C	TA
*TBST	2	15	TA en cámara húmeda	TA
Solución de prebloqueo (Agente de bloqueo 1X diluido en ácido maleico)	1	60	TA	TA
Anticuerpo acoplado a antidigoxigenina unida fosfatasa alcalina (antidig-AP)	1	16 horas	4°C	TA

La preparación de esta solución es descrita en el apéndice 1.

**Preparación del Anticuerpo**

Para 8 laminillas:

- 1) 250µl de solución de prebloqueo 1X (SFB al 10%) + 1µl anticuerpo [1:2000] (antidig-AP)
- 2) Agitar 1 hr a 4° C
- 3) Aforar a 2 ml con TBST
- 4) Agregar 250 µl de solución a cada laminilla

**Cuadro 3. Tercer día (Revelado)**

TBST	2	10 minutos	TA
TBST	2	45 minutos	TA
*NTMT	2	10 minutos	TA
Solución reveladora	1	2-48 horas	TA

\* La preparación de estas soluciones es descrita en el apéndice 2.

**Solución reveladora:**

Para 8 laminillas:

- ♂ 1.6 ml NTMT
- ♂ 4.5 µl NBT (4-nitro azul tetrazolium clorado) + 3.5 µl BCIP (5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato)
- ♂ Agregar 200 µl de solución reveladora por laminilla.

**Cuadro 4. (Lavados)**

Solución	No. rep.	Tiempo min.	TMM
*PBT	3	5	TA
Montar en glicerol al 90% y dejar secar.			

**Observación de los resultados**

Las laminillas se examinan en microscopio óptico, con objetivos 4X, 10X, 20X, 40X y 100X.

## **PCR Convencional**

1.- Efectuar la siguiente mezcla de reacción en tubo Eppendorf de 1.5 ml.:

Buffer de Reacción 10X	4.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.2 $\mu$ l
dNTP's*DIG	2.5 $\mu$ l
Primer sentido	1.5 $\mu$ l
Primer antisentido	1.5 $\mu$ l
Taq 5U	1.0 $\mu$ l
Agua DEPC	28.3 $\mu$ l

2.- Colocar el tubo en el termociclador y programar la reacción a las condiciones siguientes:

94°C por 7 min.	} 35 ciclos
94°C por 1 min.	
Tm= ¿*?°C por 1 min.	
72°C por 1.5 min.	
72°C por 1 min.	
Mantener a 4°C hasta el siguiente paso.	

\*Para estandarizar la T<sub>m</sub> de cada par de primers, se realizan varias reacciones probando temperaturas desde los 55°C hasta los 75°C.

3.- Verificar los resultados corriendo geles de agarosa al 1.8%, en donde la mejor banda revelará la T<sub>m</sub> óptima para el par de primers.

## **Fijación del tejido para RT-PCR-IS**

- 1.- Obtención de la muestra según el protocolo y colocarla en tubo Falcon de 50 ml. con etanol absoluto e incubar a temperatura ambiente por una hora.
- 2.- Incubar 2 veces más con etanol absoluto cambiando la solución cada hora.
- 3.- Cambiar la solución por Xilol e incubar una hora a temperatura ambiente.
- 4.- Incubar 2 veces más con Xilol cambiando la solución cada hora.
- 5.- Inmersión en parafina líquida a 60°C por una hora.
- 6.- Cambiar la parafina e incubar otra hora más.
- 7.- Inclusión en parafina nueva y esperar condensación a temperatura ambiente.
- 8.- Cortar en microtomo a 4-5 micras de espesor y montar los tejidos en laminillas polarizadas.

## **Transcriptasa Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa *in situ* (RT-PCR-IS).**

La técnica de RT-PCR-IS consta de varios pasos que se detallan a continuación:

### **♂Fijación:**

- 1.- Sumergir las laminillas en caja Coplin con xilol e incubar a 37°C por 20 min.
- 2.- Cambiar el xilol e incubar a temperatura ambiente por 5 min. en agitación.
- 3.- Repetir el paso anterior.
- 4.- Cambiar el xilol por etanol absoluto e incubar por 5 min.
- 5.- Cambiar por etanol al 75% en agua DEPC e incubar por 5 min.
- 6.- Cambiar por etanol al 50 % en agua DEPC e incubar por 5 min.
- 7.- Cambiar por etanol al 25 % en agua DEPC e incubar 5 min. 8.- Cambiar por agua DEPC e incubar 5 min.
- 9.- Sacar las laminillas de la caja Coplin y agregar 100 µl de HCl 0.02M sobre cada tejido durante 5 min.
- 10.- Sumergir las laminillas en proteinasa K 100 ng/ml. a 37°C por 20 min.
- 11.- Sacar las laminillas de la caja Coplin y agregar 100 µl de Ácido Acético al 20% sobre cada tejido por 15 segundos.
- 12.- Sumergir en PBS durante 2 min. en agitación.
- 13.- Cambiar por agua DEPC 2 min.
- 14.- Sacar las laminillas de la caja.

### **♂Tratamiento con DNAsa**

- 1.- Realizar la mezcla siguiente en tubo Eppendorf de 0.6 ml.:

Buffer DNAsa 10X	3 µl	por tejido
DNAsa I	3 µl	por tejido
Agua DEPC	30 µl	por tejido

- 2.- Agregar 36 µl de la mezcla sobre cada tejido e incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
- 3.- Agregar 1 gota de EDTA 25mM sobre el tejido para inactivar la DNAsa.
- 4.- Incubar por 10 min. a 65°C.
- 5.- Lavar con PBS por 2 min.

### ♂ **Reacción de Transcriptasa Reversa *in situ***

1.- Realizar la mezcla siguiente en tubo Eppendorf de 0.6 ml.:

Oligo dT (500ng/ml)	1.5 µl	por tejido
Agua DEPC	18 µl	por tejido
Buffer de Transcripción 5X	6 µl	por tejido
DTT 0.1M	3 µl	por tejido
dNTP's 10 mM	1.5 µl	por tejido
M-MLV (200U)	1.5 µl	por tejido

2.- Agregar 31.5 µl de la mezcla sobre cada tejido y colocar el cojinete.

3.- Colocar y sellar el clip sobre cada cojinete.

4.- Colocar las laminillas en el termociclador y programarlo con las siguientes condiciones para la transcripción:

37°C por 60 min.

70°C por 15 min.

Un solo ciclo y mantener a 4°C hasta el siguiente paso.

### ♂ **Tratamiento con RNAsa H**

1.- Remover los clips y cojinetes.

2.- Adicionar 3 µl de RNAsa H sobre cada tejido.

3.- Incubar a 37°C durante 15 min.

4.- Agregar 50 µl de para-formaldehído al 4% durante 5 min a 4°C.

5.- Enjuagar en PBS por 2 min. en agitación.

### ♂ **Reacción en Cadena de la Polimerasa *in situ***

1.- Efectuar la siguiente mezcla de reacción en tubo Eppendorf de 1.5 ml.:

Buffer de Reacción 10X	4.0 µl	por tejido
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.2 µl	por tejido
dNTP's*DIG	2.5 µl	por tejido
Primer sentido	1.5 µl	por tejido
Primer antisentido	1.5 µl	por tejido
Taq 5U	1.0 µl	por tejido
Agua DEPC	28.3 µl	por tejido

- 2.- Agregar 40 µl de la mezcla sobre cada tejido y colocar el cojinete.
- 3.- Colocar y sellar el clip sobre cada cojinete.
- 4.- Colocar las laminillas en el termociclador y programarlo con las siguientes condiciones de transcripción:

94°C por 7 min.	}	35 ciclos
94°C por 1 min.		
*Tm= 62°C por 1 min.		
72°C por 1.5 min.		
72°C por 1 min.		

Mantener a 4°C hasta el siguiente paso.

\*Tm fijada previamente mediante PCR's convencionales, mencionado previamente en el protocolo.

### ♂Revelado

- 1.- Retirar los clips y cojinetes de las laminillas.
- 2.- Lavar con PBS durante 3 min. en agitación.
- 3.- Preparar el Anticuerpo Anti-DIG dilución 1:500 en TBS-Fab y con Suero Fetal Bovino (SFB) al 2%, y adicionar 100 µl sobre cada tejido. (2 µl de Ac. Anti\*DIG + 20 µl SFB + 978 µl TBS-Fab)
- 4.- Incubar en cámara húmeda durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 5.- Lavar 3 veces con TBS por 10 min.
- 6.- Preparar la solución de revelado NBT/BCIP dilución 1:50 en TBS-MgCl<sub>2</sub> y agregar 150 µl sobre cada tejido. (20 µl NBT/BCIP + 980 µl TBS-MgCl<sub>2</sub>)
- 7.- Incubar en cámara húmeda y evitando contacto con la luz durante 30 min.
- 8.- Lavar 3 veces con TBS por 10 min.
- 9.- Enjuagar con agua DEPC.
- 10.- Sumergir las laminillas en el colorante de contraste (Nuclear Fast Red) por 5 min.
- 11.- Enjuagar 3 veces con agua.
- 12.- Lavado rápido en etanol al 96%.
- 13.- Lavado rápido en etanol al 100%.
- 14.- Lavado rápido en xilol.
- 15.- Montar el cubreobjetos con resina de Entellan diluida.
- 16.- Dejar secar.
- 17.- Observar al microscopio con objetivos de 4X, 10X, 20X y 100X.

## **Geles de agarosa al 1.8%**

Geles especiales para corrimiento de primers para PCR, útiles para la estandarización de la Tm.

- 1.- Disolver por calentamiento la agarosa en la solución .
- 2.- Adicionar 5 de Siber Green, cloruro de etidio 1X, u otro marcador fluorescente.
- 3.- Preparar el gel.

Solución:

Agarosa	1.8 gs.
Agua DEPC	98 ml.
TBS 50X	2 ml.

- 4.- Depositar las muestras en los pozos con su respectivo Buffer y el marcador de peso molecular, y correrlo a 100 mVolts durante una hora.

## **11. APENDICE 2**

### **REACTIVOS**

#### **Agua DEPC (DiEtil-PiroCarbamato)**

Por cada litro de agua bidestilada agregar 1 ml. de Dietil-poricarbamato, incubar a 60-65°C toda la noche (para liberarla de DNAsas y RNAsas), y finalmente esterilizar en autoclave (15 min./ 121°C/ 15 lb de presión) para inactivar el DEPC.

#### **Mezcla de Hibridación de la HIS**

Para 300 ml.:	
Formamida al 50%	150 ml
SCC (ácido cítrico 20X pH=4.5)	19.5 ml
EDTA 0.5M pH=8	3.0 ml
RNA de levadura (20 mg/ml)	750 µl
Tween-20 al 10%	15 ml
CHAPS al 10%	15 ml
Heparina (50 mg/ml)	600 µl
Aforar a 300 ml con agua DEPC.	

#### **PBS (Buffer Salino de Fosfatos)**

KCl	0.2 g
NaCl	8.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
NaHPO <sub>4</sub>	1.15 g
Aforar a 1 Lt y ajustar el pH a 7.3 con HCl y/o NaOH.	

**PBT**

Tween-20	1 ml.
PBS	100 ml.

**TBS**

Tris 50 mM	0.61g
NaCl 150 mM	0.88 g

Aforar a 100 ml y ajustar el pH a 7.6 con HCl y NaOH.

**TBS-Fab**

Tris 100 mM	1.22 g
NaCl 150 mM	0.88 g

Aforar a 100 ml y ajustar el pH a 7.5 con HCl y NaOH

**TBS-MgCl<sub>2</sub>**

Tris 100 mM	1.21 g
NaCl 50 mM	0.29 g
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.47 g

Aforar a 100 ml y ajustar el pH a 9.5 con HCl y NaOH.

**TBST**

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Tris-HCl 1M pH=7.5	25 ml
Tween-20	11 g

Aforar un litro con agua DEPC

**NTMT**

NaCl 5M	0.2 ml
Tris-HCl 2M pH=9.5	1.0 ml
MgCl <sub>2</sub> 2M	0.5 ml
Tween-20	0.1 ml

Aforar a 10 ml. con agua DEPC

## 12. TABLA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
Ac	Anticuerpos
AFP	Alfa-FetoProteína
ArcN	Núcleo Acuato
APO	Área Preóptica
APOM	Área Preóptica Media
AvPv	AnteroVentral PeriVentricular
BCIP	5-Bromo, 4-cloro, 3-indol-fosfato (5-bromo,4-chloro,3-idolyI-phosphate)
Bkg	Background o fondo
C	Citosina
Camk2g	Protein-cinasa gamma-2 dependiente de calcio
cDNA	Acido Desoxirribonucleico copia
cRNA	Acido Ribonucleico copia
DIG	Digoxigenina
DNA	Acido DesoxirriboNucleico
DNAp	Acido DesoxirriboNucleico plasmidico
D.O.	Densidad Óptica
DS	Dimorfismo Sexual
E2	Estradiol
ER	Receptor a estradiol
G	Guanina
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
HA	Hipotálamo anterior
HIS	Hibridación <i>in situ</i>

HM	Hipotálamo medio
HP	Hipotálamo posterior
Hprt	Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa
Ins.L-3	Insuline-Like 3 ó tipo insulinoide
Ints-1	Intersectina-1
Lepr	Receptor de Leptina tipo b
Log <sub>2</sub>	Logaritmo base 2
MA	MicroArreglos
Map2k2	Proteín-cinasa 2 activada por mitógenos
mRNA	Acido RiboNucléico Mensajero
NBT	Azul de Tetrazolio (Nitro-Blue Tetrazolium)
Nfib	Factor nuclear I/B
NIHA	Núcleo Instersticial del Hipotálamo Anterior
Nmu	Neuromedina
NSD-APO	Núcleo Sexualmente Dimórfico del Área Preóptica
NSQ	Núcleo SupraQuiasmático
NTP's	Nucleótidos
SFB	Suero Fetal Bovino
Smpd3	Esfingomielina fosfodiesterasa 3
SNC	Sistema Nervioso Central
SOX10	Gen SRY-box SOX10
Sts	Sulfatasa de esteroides
Synpo	Sinaptopodina
Syt7	Sinaptotagmina 7

P6	Día postnatal 6
Pafah1b2	Factor activador de plaquetas acetil-hidrolasa alfa-2
pb	Pares de Bases
PC	Periodo Crítico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-IS	Reacción en Cadena de la Polimerasa <i>in situ</i>
Pol	Polimerasa
POMC	ProOpioMelanoCortina (precursor de hormonas)
Rar-b	Receptor de ácido retinóico beta
RNA	Acido RiboNucléico
Rtn-4	Reticulón 4
RT	Transcripción Reversa
RT-PCR	Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa in situ
T	Timidina
Taq-Pol	Polimerasa de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> .
TE	Testosterona
Tm	Temperatura media de alineamiento
U	Uracilo
Vegfb	Factor B de crecimiento del endotelio vascular
VMN	Núcleo VentroMedial

## 10. REFERENCIAS

- Allen, L.S., Hines, M., Shryne, J.E., Gorski, R.A., Two sexually dimorphic cell groups in the human brain, Journal of Neuroscience, 1989, 9: 497-506.
- Arai, Y., Matsumoto, A., Synapse formation of the hypothalamic arcuate nucleus during postnatal development in the female rat and its modification by neonatal estrogen treatment, Psychoneuroendocrinology, 1978; 3: 31-45.
- Arai, Y., Matsumoto, A., and Nishioka, M., Sexually dimorphic pattern in the hypothalamic and limbic brain, International Journal of Neurology, 1985, 20: 133-143.
- Arai, Y., Murakami, S., Nishizuka M., Androgen enhances neuronal degeneration in the developing preoptic area: apoptosis in the anteroventral periventricular nucleus, Hormonal Behavior, 1994, 28: 313-319.
- Arai, Y., Sekine, Y., Murakami, S., Estrogen and apoptosis in developing sexually dimorphic preoptic area in female rats, Neuroscience Research, 1996; 25: 403-407.
- Arnold, A.P., Breedlove, S.M., Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis, Hormonal Behavior, 1985, 19: 469-498.
- Arnold, A. P., Hormonal and Nonhormonal Mechanisms of Sexual Differentiation of the Zebra Finch Brain: Embracing the Null Hypothesis, Sexual Differentiation of the Brain, 2000, 131-142.
- Bailey, C., Kandel, E., Structural changes accompanying memory storage, Annual Review of Physiology, 1993, 55: 397-426.
- Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Elmquist, J., Lowell, B.B., Leptin Receptor Signaling in POMC Neurons Is Required for Normal Body Weight Homeostasis, Neuron 2004, 42: 983-331.
- Barb, C.R., Kraeling, R.R., Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals, Animal Reproduction Science, 2004, 82-83: 155-167.
- Beyer, C., Estrogen and the developing mammalian brain, Anatomic Embryology, 1999, 199: 379-390.
- Bleier, R., Byne, W., Siggelkow, I., Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamus areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse, Journal Compend of neurology, 1982, 212: 118-130.
- Bowtell, D., Sambrook, J., "DNA Microarrays: A molecular cloning manual", 2002, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
- Buss, A., Shellhouse, B., Wolmsley, A., Noth, J., Schwab, M.E., Brook, G.A., Expression pattern of NOGO-A protein in the human nervous system, Acta of Neuropathology, 2005, 110, 2: 113-119.
- Camacho-Arroyo I, Neri-Gomez T, Gonzalez-Arenas A, Guerra-Araiza C., Changes in the content of steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors in the rat brain during the estrous cycle. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005 Feb;94(1-3):267-72. Epub 2005 Feb 17.
- Carpenter, M.B., "Neuroanatomía, Fundamentos", 1994, 4a ed., Panamericana S.A. de C.V.

Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM., Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development, Development Dynamics, 1997, 208, 3: 313-325.

Chowen, J.A., Busiguina,S., García-Segura, L:M., Sexual dimorphism and sex steroid modulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA and immunoreactivity levels in the rat hypothalamus, Neuroscience, 1995, 69:519-532.

Christensen, L.W., Gorski, R.A., Independent masculinization of neuroendocrine systems by intercerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat, Brain Research, 1978, 146:325-340.

Cohen, R.S. & Pfaff, D.W., Ventromedial hypothalamic neurons in the mediation of long-lasting effects of estrogen on lordosis behavior, Progress in Neurobiology, 1992, 38: 423-453.

Compagnone, N.A., Salido, E., Shapiro, L.J., Mellon, S.H., Expression of steroid sulfatase during embryogenesis, Endocrinology, 1997, 138, 11:4768-4773.

Compagnone, Salido, Shapiro, y Mellon, Expression of steroid sulfatase during embryogenesis, Endocrinology, 1997 Nov;138(11):4768-73.

Connolly, G.P., Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficiency produces aberrant neurite outgrowth of rodent neuroblastoma used to model the neurological disorder Lesch Nyhan syndrome, Neuroscience Letters, 2001, 13, 314: 61-64.

Cox, K.H., DeLeon, D.V., Angerer, L.M., Detection of mRNA's in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes, Developmental Biology, 1984, 101: 485-502.

Czarnecki K, Haas CA, Bas Orth C, Deller T, Frotscher M., Postnatal development of synaptopodin expression in the rodent hippocampus, Journal of Comparative Neurology, 2005 Sep 19;490(2):133-44.

Daniel, W.W., "Bioestadística", 2002, LIMUSA WILEY, 4a ed.

Davis, P.G., McEwen, B.S., Pfaff, D.W., Localized behavioral effects of triated estradiol implants in the ventromedial hypothalamus of female rats, Endocrinology, 1979, 104: 898-903.

Davis, E.C., Popper, P., Gorski, R.A., The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, Brain Research, 1996; 734: 10-18.

Das Neves, L., Duchala, C.S., Tolentino-Silva, F., Haxhiu, M.A., Colmenares, C., Macklin, W.B., Campbell, C.E., Butz, K.G., Gronostajski, R.M., Disruption of the murine nuclear factor I-A gene (Nfia) results in perinatal lethality, hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum, Progress in National Academy of Science U.S.A., 1999, 96, 21: 11946-11951.

Deller T, Bas Orth C, Vlachos A, Merten T, Del Turco D, Dehn D, Mundel P, Frotscher M. , Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion, Journal of Comparative Neurology, 2006 Nov 20;499(3):471-84.

De Luca, C., Kowalski, T.J., Zhang, Y., Elquimist, J.K., Lee, C., Kilimann, M.W., Ludwig, T., Chua, S.C., Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes, 2005, 115, 2: 3484-3493.

De Vries, G. J., A Model System for study of sex chromosome effect on sexually dimorphic neural and behavioral traits, Journal of Neuroscience, 2002, (22) 20: 9005-9014.

Díaz, H., Lorenzo, A., Carrer, H.F., Time lapse study of neurite growth in hypothalamic dissociated neurons in culture: sex differences and estrogens effects, Journal of Neuroscience Research, 1992, 33: 266-281.

Dicou, E., Attoub, S., Gressens, P., Neuroprotective effects of leptin *in vivo* and *in vivo*, Neurochemistry, 2001, 12:18-21.

Ferreira, A., Cáceres, A., Estrogen enhancement neurite growth: evidence for a selective induction of tau and stable microtubules, Journal of Neuroscience, 1991,11: 392-400 .

Frankfurt, M., Gould, E., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gonadal steroids modify dendritic spine density in the ventromedial hypothalamic neurons: a Golgi study in the adult rat, Neuroendocrinology, 1990, 51: 530-535.

Fukuda, M., Ogata, Y., Saegusa, C., Kanno, E., Mikoshiba, K., Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human, Biochemical Journal, 2002, 365: 173-80.

Gall, J.G., and Pardue, M., Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations, Procedures in National Academy of Science, 1969, 87: 7643-7647.

García- Segura, L.M., Baetens, D., Naftolin, F., Sex differences and maturational changes in arcuate nucleus neuronal plasma membrane organization, Developmental, Brain Research, 1985,19:146-149.

García-Segura, L.M., Baetens, D., Naftolin, F., Synaptic remodelling in arcuate nucleus after injection of estradiol valerate in adult female rats, Brain Research, 1986, 366: 131-136.

García-Segura, L.M., Chowen, J.A., Párducz, A., Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms, Progress iNeurobiology, 1994, 44:279-307.

Gokhan S, Marin-Husstege M, Yung SY, Fontanez D, Casaccia-Bonnet P, Mehler MF., Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression, Journal of Neuroscience, 2005, 25, 36: 8311-8321.

González, R.R., Simón, C., Caballero-Campo, P., Norman, R., Chardonens, D., Devoto, L., Bischof, P., Leptin and reproduction, Human Reproduction Update, 2000, (6) 3: 290-300.

Gosrki, R.A., The neuroendocrine regulation of sexual behavior, Advances in Psychobiology, 1974, 2: 1-58.

Gorski, R.A., Gordon, J.H., Shryne, J.E., Southam, A.M., Evidence for morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain, Brain Research, 1978, 148: 333-346.

Gorski, R.A., Csernus, V.J., Jacobson, C.D., Sexual dimorphism in the preoptic area, Advances in physiological sciences, 1981, 15:121-130.

Gorski, R.A., Steroid-induced sexual characteristics in the brain, Neuroendocrine perspectives, 1983, 2: 1-35.

Hansen, S., Köhler, C., Glodstein, M., Steinbusch, H.V.M., Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the rat, Brain Research, 1982, 239: 213-232.

Henderson, Z., *"In Situ Hybridization Techniques for the brain"*, Wiley, Vol. 17, 1996, Caps. 1 y 4., 1-21 y 79-92.

Hofman, M.A., Swaab, D.F., The sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the human brain: A comparative morphometric study, Journal of Anatomy, 1989, 164: 55-72.

Hong, C.S., Saint-Jeannet, J.P., Sox proteins in neural crest development, Cell and Developmental Biology, 2005, 16: 694-703.

<https://svn.r-project.org/R-dev-web/trunk/index.html>.

Innis, M., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., "PCR strategies", 1995, Academic Press, California, U.S.A.

Jethwa, P.H., Small, C.J., Smith, K.L., Seth, A., Darch, S.J., Abbott, C.R., Murphy, K.G., Todd, J.F., Ghatei M.A., Bloom, S.R., Neuromedin U has a physiological role in the regulation of food intake and partially mediates the effects of leptin, American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism, 2005, 289, 2: E301-305.

Jung-Choi, E., Man-Ha, C., Choi, J., Soo, S.K., Sung, W.C., Kyu, S.,P., Kim, K., Ju, B.L., Low density cDNA array-coupled to PCR differential identifies new estrogen-responsive genes during the postnatal differentiation of the rat hypothalamus, Molecular Brain Research, 2001, 97: 115-128.

Kordes U, Cheng YC, Scotting PJ., Sox group E gene expression distinguishes different types and maturational stages of glial cells in developing chick and mouse, Developmental Brain Research, 2005, 157, 2: 209-213.

Kremerskothen J, Plaas C, Kindler S, Frotscher M, Barnekow A., Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin/alpha-actinin binding protein, Journal of Neurochemistry, 2005, 92(3):597-606.

Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Enderich, J., Hermans-Borgmeyer, I., Wegner, M., Cooperative function of FOU Protein and SOX Proteins in Glial Cells, The Journal of Biological Chemistry, 1998, (273) 37:16050-16057.

Lane, M.A., Bailey, S.J., Role of retinoid signalling in the adult brain, Progress in Neurobiology, 2005, 75, 4: 275-293.

Lania, A., Filopanti, M., Corbetta, S., Losa, M., Ballare, E., Spada, A., Effects of hypothalamic neuropeptides on extracellular signal-regulated kinase (ERK1 and ERK2) cascade in human tumoral pituitary cells, Journal of Clinical Endocrine Metabolism, 2003, 88, 4: 1692-1696.

Larriva-Sahd J, Gorski RA, Micevych PE., Cholecystokinin synapses in the sexually dimorphic central part of the medial preoptic nucleus, Experimental Neurology, 1986 Jun;92(3):639-50.

Larriva-Sahd JA, Gorski RA., Ultrastructural characterization of the central component of the medial preoptic nucleus, Experimental Neurology, 1987 Nov;98(2):370-87.

Larsson K., Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior, Index Endocrine Control of Sexual Behavior, Raven Press, 1979, New York, USA, 77-163.

LeVay, S., A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men, Science, 1991, 253: 1034-1037.

Leitch, A. R. *et al.* "*In Situ Hybridization*". BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1994, pp. 1-33.

Lee, H.K., Seo, Y.J., Choi, S.S., Kwon, M.S., Shim, E.J., Lee, Y.J., Suh, H.W., Role of gamma-aminobutyric acid (GABA(B)) receptors in the regulation of kainic acid-induced cell death in mouse hippocampus, Experimental Molecular medicine, 2005, 37, 6 : 533-545.

McEwen, B.S., Lieberburg, I., Chaptal, C., Krey, L.C., Armatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain, Hormonal Behavior, 1977, 9: 249-263.

Marshall, F.H.L., Jolly, W.A., Results of removal and transplantation of ovaries, Transient Real Society, 1907, 45: 589.

Matsumoto, A., Arai, Y., Sexual dimorphism in "wiring pattern" in the hypothalamic arcuate nucleus and its modification by neonatal hormone environment, Brain Research, 1980, 190: 238-242.

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

Matsumoto, A., Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain, Psychoneuroendocrinology, 1991, 16:25-40.

Matsumoto, A., Arai, Y., Sexual Differentiation of neuronal circuitry in the neuroendocrine hypothalamus, Biomedical Reviews, 1997, 7: 5-15.

Meli, R., Pacilio, M., Raso, G.M., Esposito, E., Coppola, A., Nasti, A., Di Carlo, C., Nappi, C., Di Carlo, R., Estrogen and Raloxifene Modulate Leptin and Its Receptor in Hypothalamus and Adipose Tissue from Ovariectomized Rats, Endocrinology, 2004, (145), 7: 3115-3121.

Mendel, G., Gregor Mendel's letter to Carl Nägueli, Genetics, 1950, 35:24-26.

Miller, L.D.P. & Aoki, A., Stereological analysis of the hypothalamic ventromedial nucleus. II. Hormone-induced changes in the synaptogenic pattern, Developmental Brain Research, 1991, 61: 189-196.

Morash, B.A., Ur, E., Wilkinson, M., Pituitary Leptin Gene Expression is Reduced by Neonatal Androgenization of Female Rats, Pituitary, 2001, 4:63-70.

Morescalchi, A., Sex determination and environment in teleosts, Sex origin and evolution, 1992, 6: 137-149.

Müller, H.J., Some genetic aspects of sex, American Nature, 1932, 66: 118-138.

Musazzi, A., Perez, J., Hunt, S.P., Racagni, G., Popoli, M., Changes in signaling pathways regulating neuroplasticity induced by neurokinin 1 receptor knockout, 2005, 21, 5: 1370-1378.

Oomura, Y., Aon, S., Koyama, Y., Fujita, I., Yoshimatsu, H., Central control of sexual behavior, Brain Research Bulletin, 1989, 20: 863-870.

Parmigiani, G., Garret, E.S., Irizarri, R.A., Zeger, S.C., "The analysis of Gene Expression Data: Methods and Software", 2003, Springer, New York, U.S.A.

Parsons, B., Rainbow, T.C., McEwen, B.S., Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progesterin receptors in rat brain, Endocrinology, 1984, 115: 1412-1417.

Pérez, J., Naftolin, F., García-Segura, L.M., Sexual differentiation of synaptic connectivity and neuronal plasma membrane in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus, Brain Research, 1990, 527: 116-122.

Pfaff, D.W. & Sakuma, Y., Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus, Journal of Physiology, 1979, 288: 189-202.

Pfeiffer, C.A., Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads, American Journal of Anatomy, 1936, 58: 195.

Pucharcos, G., Fuentes, J.J., De la Luna, S., Alcantara, S., Arbones, M.L., Soriano, E., Estivill, X., Pritchard, M., Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome, European Journal of Human Genetics, 1999, 7, 6: 704-712.

Raisman, G., Field, P.M., Sexual Dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence of neonatal androgen, Brain Research, 1973, 54:1-29.

Reisert, I., Engele, J., Pilgrim, C., Early sexual differentiation of diencephalic dopaminergic neurons on rat brain, Cell Tissue Research, 1989, 255: 411-417.

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

Shu, T., Butz, K.G., Plachez, C., Gronostajski, R.M., Richards, L.J., Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice, Journal of Neuroscience, 2003, 23, 1: 203-212.

Simerly, R.B., Bouret, S.G., Minireview: Leptin and Development of Hypothalamic Feeding Circuits, Endocrinology, 2004 (145), 6: 2621-2626.

Simerly, Handa y Swanson, Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat, Neuroendocrinology. 1985 Jun;40(6):501-10.

Smith, G.D., Jackson, L.M., Foster, D.L., Leptin Regulation of Reproductive Function and Fertility, Theriogenology, 2002, 57: 73-86.

Sördersten, P., Hansen, S., Srebro, B., Suprachiasmatic lesions disrupt the daily rhythmicity in the sexual behavior of normal male rats and male rats treated neonatally with antiestrogen, Journal of Endocrinology, 1981, 88:125-130.

Steppan, C.M., Swick, A.G., A role for Leptin in Brain Development, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 256: 600-602.

Stoffel, W., Jenke, B., Block, B., Zumbansen, M., Koebeke, J., Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development, 2005, Proceedings of National Academy of Science U.S.A., 2005, 102, 12: 4554-4559.

Swaab, D.F., Fliers, E., A sexually dimorphic nucleus in the human brain, Science, 1985, 228: 151-166.

Swaab, D.F., Hofman, M.A., Sexual differentiation of the human hypothalamus: ontogeny of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, Developmental Brain Research, 1988, 44: 314-318.

Sweeney, K.J., Clark, G.D., Prokscha, A., Dobyns, W.B., Eichele, G., Lissencephaly associated mutations suggest a requirement for the PAFAH1B heterotrimeric complex in brain development, Mechanical Development, 2000, 92, 2: 263-271.

Terasawa, E., Wiegand, S.J., Bindon, W.E., A role for medial preoptic nucleus on afternoon proestrus in female rats, American Journal of Physiology, 1980, 238: E533-E539.

Torrans-Allerand, C.D., Hashimoto, K., Greenough, W.T., Sex steroids and the development of the new born mouse hypothalamus in vitro, Developmental Brain Research, 1983, 7: 97-101.

Torrans-Allerand, C.D., On the genesis of sexual differentiation of the central nervous system: morphogenetic consequences of steroid exposure and possible role of alpha-fetoprotein, Progress Brain Research, 1984, 61: 63-96.

Torrans-Allerand, C. D., Singh, M., and Setalo, G., Novel mechanism of estrogen action in the brain: new players in an old story, Frontiers in Neuroendocrinology, 1999, 20: 97-121.

Torres- Alemán, I., Rejas, M.T., Pons, S., Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acid protein redistribution in hypothalamic astrocytes in vitro: a neuronal mediated effect, Glia, 1992, 6: 180-187.

Ueta, Y., Ozaki, Y., Saito, J., Novel-G protein coupled receptor ligand and neurohypophysial hormones, Journal of Neuroendocrinology, 2004, 16, 4: 378-382.

Vale, J.R., Ray, D., Vale, C.A., The interaction of genotype and exogenous neonatal androgen: agonistic behavior in female mice, Behavior and Biology, 1972, 7: 321-334.

Vawter, M. P., Barrett, T., Cheadle, C., Sokolov, B.P., Wood III, W.H., Donovan, D. M., Webster, M., Freed, W.J., Becker, K.G., Application of cDNA microarrays to examine gene expression differences in schizophrenia, Brain Research Bulletin, 2001, (55) 5: 641-650.

Vigier, B., Picard, J., Bezaud, J., Josso, N., Anti-Müllerian hormone: a local or long- distance morphogenetic factor?, Human Genetics, 1981, 58: 85-90.

Virmani, T., Han, W., Liu, X., Sudhof, T.C., Kavalali, E.T., Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling, EMBO Journal, 2003, 22, 20: 5347-5357.

Wang, T.W., Zhang, H., Parent, J.M., Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway, 2005, 32, 12: 2721-2732.

Wegner, M., Stolt, C.C., From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development, Trends in neuroscience, 2005, (28) 11: 582-588.

Whitlock, K.E., Smith, K.M., Kim, H., Harden, M.V., A role of foxd3 and SOX10 in the differentiation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the zebrafish Danio rerio, Development, 2005, (132) 24: 5491- 5502.

Wilson, J.D., Griffin, J.E., Leshin, M., George, F.W., Role of gonadal hormones in development of sexual phenotypes, Human Genetics, 1981, 58:78-84.

Wilson BD, Bagnol D, Kaelin CB, Ollmann MM, Gantz I, Watson SJ, Barsh GS., Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling, Endocrinology, 1999, 140, 5: 2387-2397.

Wood, C.E., Estrogen/hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain, Journal of Social Gynecology Investigation, 2005, 12, 2: 67-76.

Woodson, J., Gorski, R.A., Structural Sex Differences in the mammalian Brain: Reconsidering the Male/Female Dichotomy, Sexual Differentiation of the Brain, 2000, 13: 229-254.

[www.mature.com/oligonucleotide.html](http://www.mature.com/oligonucleotide.html)

[www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com)

[www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)

[www.pcrlinks.com](http://www.pcrlinks.com)

[www.r-proyect.org](http://www.r-proyect.org)

[www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)

Xu, J., Burgoyne P.S., and Arnold, A.P., Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain, Human Molecular Genetics, 2002, (11) 12: 1409-1419.