

302927

Universidad  
femenina  
de México

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

8  
2es

DIFERENCIACION SEXUAL  
HIPOTALAMICA EN RATAS EN  
DIFERENTES ESTADIOS  
DE MADURACION

TESIS CON  
FALLA DE CENSA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
MARCELA VERGARA ONOFRE



## **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 está 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.

## INDICE

OBJETIVO .....	I
GENERALIDADES .....	1
MATERIAL Y METODOS .....	48
RESULTADOS .....	68
DISCUSION .....	76
BIBLIOGRAFIA .....	85

## **O B J E T I V O**

Realizar estudios que marquen un sustrato básico de conocimientos para precisar los cambios críticos que participan en la determinación del sustrato morfológico y bioquímico sobre el cual deberán actuar los factores determinantes de la diferenciación sexual del hipotálamo en la rata recién nacida. Con este fin se decidió determinar parámetros comparativamente en animales machos y hembras a tres edades diferentes ( 5, 40 y 120 días ), las modificaciones de los siguientes parámetros basales del hipotálamo aislado; peso, número de células, viabilidad, actividad funcional y las concentraciones (DNA), (RNA) y (PROTEINAS).

# H I P O T A L A M O

## MORFOLOGIA DEL HIPOTALAMO

La constitución y la histología del hipotálamo han sido objeto de numerosos trabajos, que aunque no han agotado el tema, si han acelerado algunos datos esenciales que consideramos de gran interés revisar por lo menos someramente como parte de la introducción de este trabajo.

## LOCALIZACION DEL HIPOTALAMO.

El hipotálamo es la estructura mas ventral del diencéfalo. En el hombre pesa alrededor de cuatro gramos. Este pequeño, pero importantísimo órgano, no puede ser limitado anatómicamente de una manera clara y precisa, por lo que se han tomado algunas referencias para poder establecer sus límites anatómicos. Se extiende en sentido anteroposterior desde la lamina terminalis hasta un plano vertical que pase inmediatamente dorsal a los cuerpos mamilares y lateralmente, desde el surco hipotalámico de un lado al surco hipotalámico del otro lado. Comprende entonces, las estructuras que existen en la parte ventral de las paredes laterales y del suelo del tercer ventrículo.

No existe un límite claro y preciso entre el hipotálamo y las estructuras que se sitúan por delante y por detrás de él. En esta forma, sin demarcación precisa, se pasa, por delante, hacia el área olfatoria y por detrás hacia el mesencéfalo. Tampoco existe un límite claro entre el hipotálamo y el subtálamo. Por arriba, en cambio, encontramos al tercer ventrículo. Sin embargo, es posible tratar de aislar el hipotálamo anatómicamente y estructuralmente, si establecemos algunas referencias fácilmente observables sobre la superficie del encéfalo. Situraremos al hipotálamo entre un corte perpendicular que pase inmediatamente por detrás del quiasma óptico y otro corte perpendicular que pase dorsal a los cuerpos mamilares, por debajo del tercer ventrículo.

En la parte inferior se delimita por el tuber cinereum, con sus eminencias (media y lateral) y el tallo del infundíbulo, que se continúa con el lóbulo posterior de la hipófisis.

El fornix (trigono cerebral) atraviesa al hipotálamo, para alcanzar al cuerpo mamilar y sirve como un punto de referencia para un plano sagital que divida al hipotálamo en:

#### 1.- ZONA MEDIAL.

Que a su vez se subdivide en tres regiones:

- 1.1 Región Supraquiasmática.
- 1.2 Región Tuberal.
- 1.3 Región Mamilar.

#### 2.- ZONA LATERAL.

El hipotálamo es un órgano sumamente complejo y tiene inmensa importancia funcional. Se encuentran en él, numerosas neuronas agrupadas en núcleos que están conectados o interconectados por numerosos haces fibrilares de complicado trayecto. Por tal razón se han propuesto muchas clasificaciones y sub-divisiones, de los núcleos hipotálamicos considerando ciertos conceptos filogenéticos, citoarquitectónicos, histoquímicos, etc. Sin embargo, la más ampliamente utilizada es la citada anteriormente y será la que nosotros sigamos en este trabajo.

#### 1.- ZONA MEDIAL

##### 1.1.- REGION SUPRAQUIASMATICA.

Contiene tres núcleos:

- 1.1.1.- Anterior.
- 1.1.2.- Supraóptico.
- 1.1.3.- Paraventricular.

Por delante de esta región encontramos una zona llamada Área preóptica, que aunque como ya se dijo no pertenece al hipotálamo, tiene con él una gran relación fisiológica, por lo que muchos autores lo consideran incluido dentro del hipotálamo. Nosotros también lo consideramos así en esta introducción.

## AREA PREOPTICA O CONTINUM HIPOTALAMICO

Se deriva embriológicamente del telencéfalo medio, que no se en-  
vagina al formarse los hemisferios cerebrales y queda limitando por delante por el tercer ventrículo. Esta situada entre el receso supraquiasmático por abajo, la lámina terminal hacia adelante, y la comisura anterior hacia arriba, esta última estructura la separa de las columnas anteriores del Fornix.

Caudalmente se continua con la parte anterior del hipotálamo con quien esta en estrecha relación tanto anatómicamente como funcionalmente. Se le han descrito dos núcleos: MEDIAL y LATERAL. El núcleo medial esta conectado con las áreas septales del lóbulo frontal, constituidas por el area para-olfatoria, la cual se continua dorsalmente con el septum pelucidum, llegando ventralmente hasta el espacio perforado posterior. También recibe fibras del epítálamo a través de la estria medular, de las áreas septales y de la estria terminalis.

El núcleo lateral está estrechamente relacionado con el haz medio del cerebro anterior y se continúa con el hipotálamo lateral.

El area preóptica en general parece estar involucrada en la correlación de los impulsos olfatorios y viscerales. Durante muchos años a esta región se le consideró el centro responsable de la conducta sexual tanto masculina como femenina. Así mismo se le consideró como la zona en la cual radica la diferencia entre ambos sexos.

### 1.1.1.- NUCLEO HIPOTALAMICO ANTERIOR.

Citológicamente este núcleo es semejante al area preóptica y no hay un límite preciso entre ellos por lo que muchos autores no lo describen.

### 1.1.2.- NUCLEO SUPRAOPTICO.

Se localiza dorsal de la parte lateral del quiasma óptico.

### 1.1.3.- NUCLEO PARAVENTRICULAR.

Este núcleo se extiende desde el surco hipotalámico hasta la proximidad del núcleo supraóptico. Estos núcleos poseen características semejantes tales como: verdadero lecho vascular en torno a sus células e incluso en algunas ocasiones se han reportado vasos sanguíneos en relación directa con el citoplasma de las neuronas.

Esta formado por células grandes. Sus axones descienden a través del tallo hipofisiario posterior formando el tracto hipotalámico-hipofisiario (Cajal y Ramon 1911) y terminan en los capilares de la neurohipófisis. Presenta numerosas sinapsis que establecen con fibras que llegan a ellas procedentes de sitios no determinados, lo que podría indicar que posiblemente estén bajo la influencia de otros centros que liberen hormonas.

Su citoplasma contiene material coloide estructurado en forma de gránulos que a veces se hallan entre las neuronas, por consiguiente se trata de una neurosecreción. Con colorantes especiales ha sido posible teñirlos y observar que estos gránulos descienden a lo largo de los axones hasta el lóbulo posterior de la hipófisis: en algunos casos se han visto a estos axones distendidos por grumos de neurosecreciones. Al llegar a la neurohipófisis, los axones terminan formando pequeñas dilataciones que se disponen en empalizada sobre los capilares y contienen acúmulos de secreción que constituyen los cuerpos llamados de Herring, así como numerosas vesículas claras cuyo significado fisiológico aún no se conoce, las terminaciones axónicas quedan en contacto directo con la pared de los capilares sin interposición de células gliales. Los núcleos-supraópticos y paraventriculares están relacionados con las hormonas antidiurética y la oxitocina. La hormona antidiurética parece ser sintetizada en el núcleo supraóptico y la oxitocina en el paraventricular. Estas dos hormonas son conducidas a la hipófisis posterior conjugadas con un octapéptido (neurofisina) que actúa como portador. Hasta ahora no hay acuerdo en la manera como pasan estas hormonas a la sangre, aunque se han reportado la presencia de poros en el endotelio de los capilares. La acción de la vasopresina, es favorecer la absorción del agua a nivel de los túbulos distales y de los túbulos colectores renales, aumentando su permeabilidad, no parece tener efecto importante sobre la musculatura lisa de los vasos.

La supresión de la vasopresina, como ocurre después de lesionar

el tallo hipofisiario, produce eliminación de grandes cantidades de agua por la orina, lo que se conoce como diabetes insípida.

La oxitocina produce contracción de la musculatura del útero y de las células mioepiteliales que rodean los pequeños conductos de la glándula mamaria. La secreción de esta hormona estimulada por la succión del pezón, por la dilatación del cuello uterino y de la vagina, por consiguiente, esta hormona interviene en el parto y en la lactancia.

#### 1.2.- REGION TUBERAL.

Es la más amplia y por ello se considera dividirla en una subzona medial que a la vez se divide en periventricular e intermedia.

Contiene cinco núcleos:

- 1.2.1.- Núcleo Ventromedial.
- 1.2.2.- Núcleo Dorsomedial.
- 1.2.3.- Núcleo Arcuato.
- 1.2.4.- Núcleo Lateral.
- 1.2.5.- Núcleo Posterior.

##### 1.2.1.- NUCLEO VENTROMEDIAL.

Se halla en el tuber cinereum, caudal al supraóptico y rostral al núcleo posterior, sus límites son poco precisos. Está conectado con otros núcleos hipotálamicos y recibe fibras del haz medio del cerebro anterior. Sus células son pequeñas y ovoides. En los últimos tiempos este núcleo ha sido estudiado en forma muy intensa ya que se ha demostrado que podría ser el modulador de las conductas reproductivas; también es posiblemente, el centro responsable de la liberación física o pulsátil de las gonadotropinas en los mamíferos, así como también el responsable de la modulación del apetito.

##### 1.2.2.- NUCLEO DORSOMEDIAL.

Se encuentra colocado dorsalmente al núcleo ventromedial y ventralmente al paraventricular, queda en la parte inferior y lateral de la pared del tercer ventrículo, por fuera de la zona

incerta del subtálamo. Este núcleo también posee células pequeñas de forma ovoide. Su límite de separación con el núcleo ventromedial es bastante impreciso. Posiblemente regula la liberación tónica de gonadotrofinas y constituye, también el centro de la ira.

#### 1.2.3.- NUCLEO ARCUATO.

Está colocado lateralmente al núcleo ventromedial y da origen a fibras que se incorporan al haz tubero-hipofisiario.

#### 1.2.4.- NUCLEO LATERAL.

Está constituido por neuronas situadas en el trayecto del haz medio del cerebro y anterior se extiende desde la región prepéptica hasta el tegmentum mesencefálico, algunas de sus células se agrupan para formar el núcleo infundibular y los pequeños núcleos tuberales.

#### 1.2.5.- NUCLEO POSTERIOR.

Se localiza en parte posteroinferior del tercer ventrículo entre los dos haces mamilotalámicos, se continua con el tegmento mesencefálico y da origen a dos tipos de fibras, unas que se dirigen cuadralmente al tallo cerebral y otras que se incorporan a los núcleos periventriculares.

#### 1.3.- REGION MAMILAR.

Comprende los cuerpos mamilares, en cada uno de ellos hay dos núcleos:

1.3.1.- Núcleo mamilar medial.

1.3.2.- Núcleo mamilar lateral.

### 1.3.1.- NUCLEO MAMILAR MEDIAL.

En cuya parte dorsal se encuentra un pequeño acúmulo de células que forman el núcleo supramamilar.

### 1.3.2.- NUCLEO MAMILAR LATERAL.

Es el más pequeño, en su parte lateral se encuentra el núcleo intercalado, formado por células de gran tamaño.

Los núcleos mamilares reciben fibras del fornix, que provienen de la corteza del hipocampo y dan origen a los haces mamilotalámicos, que se dirige al núcleo anterior del tálamo, y mamilo tegmental, que desciende al tegmentum mesencefálico.

## 2.- ZONA LATERAL

Esta constituida por grandes células nerviosas esparcidas en una región amplia y que de todas maneras han sido consideradas como constituyendo parte del núcleo lateral de la zona medial, así como los núcleos tuberales laterales de la misma región, es decir, esta zona sería parte del núcleo ya descrito.

## 3.- CONEXIONES DEL HIPOTALAMO.

Existen dos tipos de vías del hipotálamo:

3.1.- Aferentes.

3.2.- Eferentes.

### 3.1.- AFERENTES.

Los impulsos hacia el hipotálamo son conducidos por las fibras ascendentes del tegmento del tronco cerebral y de la sustancia gris periacueductal, y por las descendentes del cerebro anterior, además de vías que proceden de otras fuentes.

La mayoría de estas fibras se acompañan de otras que proyectaban impulsos en dirección opuesta. Estos grupos de fibras están así recíprocamente dirigidos. Y son:

- 3.1. 1.- Fibras fascículo medio del cerebro anterior.
- 3.1. 2.- Fibras hipocampo-hipotalámicas.
- 3.1. 3.- Fibras cortico-hipotalámicas.
- 3.1. 4.- Fibras amigdaló-hipotalámicas.
- 3.1. 5.- Fibras talamo-hipotalámicas.
- 3.1. 6.- Fibras del pedúnculo mamilar.
- 3.1. 7.- Fibras palido hipotalámicas.
- 3.1. 8.- Lemnisco interno.
- 3.1. 9.- Fascículo longitudinal dorsal.
- 3.1.10.- Fibras de la formación reticular.
- 3.1.11.- Fibras del pedúnculo cerebeloso superior.
- 3.1.12.- Fibras retino-hipotalámicas.

#### 3.1.1.- FASCICULO MEDIO DEL CEREBRO ANTERIOR.

Aunque reducido en el hombre, constituye el principal sistema de fibras longitudinales que interconecta los centros olfatorios, peri-amigdalinos y septales con el hipotálamo y el tegmento mesencefálico. También se han descrito fibras procedentes de la corteza orbitofrontal. (haz proencefálico).

#### 3.1.2.- FIBRAS HIPOCAMPO HIPOTALAMICAS.

Proviene del hipocampo por el fornix, que es la principal vía de salida del hipocampo. Al llegar a la comisura anterior se dividen sus fibras en dos grupos:

3.1.2.a.- PRECOMISURALES. Que van a los núcleos septales, región preóptica lateral y el hipotálamo dorsal.

3.1.2.b.- POSTCOMISURALES. Que van a las regiones dorsal, lateral y periventricular de hipotálamo principalmente al núcleo interior del cuerpo mamilar.

### 3.1.3.- CORTICO HIPOTALAMICAS.

Viene de corteza prefrontal siguiendo dos vias:

3.1.3.a.- VIA DIRECTA.- Por el fascículo proencefálico interno.

3.1.3.b.- VIA INDIRECTA.- Van primero al núcleo dorsomedial del tálamo donde hacen escala y después al hipotálamo por el sistema periventricular.

### 3.1.4.- AMIGDALO HIPOTALAMICAS.

Vienen de la amígdala al área preóptica, y al mayor de los núcleos del hipotálamo.

### 3.1.5.- TALAMO HIPOTALAMICAS.

Van del núcleo dorso medial del tálamo y de los núcleos talámicos de la línea medial al hipotálamo.

### 3.1.6.- PEDUNCULO MAMILAR.

Este pedúnculo se forma de los núcleos tegmentarios ventral y dorsal y terminal en el núcleo mamilar lateral.

### 3.1.7.- FIBRAS PALIDO HIPOTALAMICAS.

Estas fibras se forman del asa ventricular. La existencia de estas fibras es negada por algunos neuroanatomistas.

### 3.1.8.- LEMNISCO INTERNO.

Estas fibras traen sensibilidad visceral y gustativa conducida por la médula espinal y por el tallo cerebral y llegan al hipotálamo por el pedúnculo mamilar y por el fascículo longitudinal dorsal.

### 3.1.9.- FASCICULO LONGITUDINAL DORSAL.

Estas fibras conectan al hipotálamo con núcleos del tallo cerebral entre los cuáles encontramos el núcleo de Edingerwes-

phal, colículo superior, el núcleo ambiguo, el salivatorio, el núcleo hipoglósico y el núcleo del haz solitario.

### 3.1.10.- FIBRAS DE LA FORMACION RETICULAR.

Del núcleo subtálamo de la zona incerta al hipotálamo.

### 3.1.11.- PEDUNCULO CEREBELOSO SUPERIOR.

Del pedúnculo cerebeloso al hipotálamo. No se conoce muy bien su trayectoria.

### 3.1.12.- RETINO HIPOTALAMICAS.

Se han descrito muy bien en algunos mamíferos, pero no en los primates, van de la retina a la región supraquiasmática.

## 3.2.- VIAS EFERENTES.

La salida de impulsos del hipotálamo se hace a través de fibras ascendentes hacia el cerebro anterior, descendentes hacia el mesencéfalo y vías constituidas tanto por fibras como por vasos sanguíneos hacia la hipófisis (proyecciones efectoras endócrinas). Estas vías eferentes son:

3.2.1.- Mamillo talámicas.

3.2.2.- Mamillo tegmentarias.

3.2.3.- Periventriculares.

3.2.4.- Tubero hipofisiarias.

3.2.5.- Conexiones hipotálamo-hipofisiarias.

### 3.2.1.- MAMILO TALAMICAS.

Parten del núcleo mamilar interno y van a los núcleos anteromedial y anteroventral del tálamo del mismo lado y del núcleo mamilar externo, llegando a los núcleos dorsales de ambos lados.

### 3.2.2.- MAMILO TEGMENTARIAS.

De los núcleos mamilares a la formación reticular del tegmento mesencefálico.

### 3.2.3.- PERIVENTRICULARES.

Se originan del núcleo hipotalámico posterior y de los núcleos de la región supraquiasmática y terminan en el núcleo dorsomedial del tálamo y en los núcleos de la línea media.

### 3.2.4.- TUBERO HIPOFISIARIO.

Nacen de la parte interna del tuber y van al lóbulo posterior de la hipófisis, estas vías han sido ampliamente estudiadas y ya fueron referidas con los núcleos supraópticos y paraventriculares.

### 3.2.5.- CONEXIONES HIPOTALAMO-HIPOFISIARIAS.

Estas conexiones son de tipo vascular y van del hipotálamo, del infundíbulo y de la eminencia medial del tuber al lóbulo anterior de la hipófisis, formando un sistema vascular porta que es de gran importancia. A este sistema llegan los factores liberadores de las hormonas que son elaboradas en el hipotálamo. Estos factores, así como algunos factores inhibidores recientemente descritos, son conducidos hasta la adenohipófisis.

En general, los circuitos neurales asociados con el hipotálamo son numerosos y complejos, además de que existen numerosas y extensas conexiones dentro del mismo hipotálamo, los núcleos hipotalámicos tienen conexiones recíprocas con amplias regiones del cerebro y del tronco cerebral. Estas estrechas interrelaciones, en las que se intercalan numerosas estaciones sinápticas, están de acuerdo con las funciones multifacéticas del hipotálamo.

Se cree que el hipotálamo recibe la mayor parte de sus impulsos aferentes, en forma directa o indirecta, del sistema reticular inespecífico. Los sitios con los cuales el hipotálamo tiene una relación de interconexión recíproca incluyen:

- a.- La formación reticular del tronco cerebral, incluyendo al lóbulo límbico, el hipocampo y el cuerpo amigdalóideo.

- b.- La neocorteza.
- c.- El tálamo.
- d.- El sistema olfatorio.

Existen además importantes conexiones neurales y vasculares con la hipófisis.

Muchas de las características anatómicas del hipotálamo (como por ejemplo la presencia de neuronas isodendríticas) son similares a las de la formación reticular del tronco cerebral; así, el hipotálamo se considera como una extensión rostral de la formación reticulada, especialmente del segmento mesencefálico medial y de la sustancia gris periacueductal. La mayoría de los impulsos sensoriales ascendentes derivan de vías multisinápticas de la formación reticular mesencefálica y de los núcleos reticulares tálamicos.

Las conexiones más importantes con el sistema límbico se realiza a través del tracto medial del cerebro anterior, del sistema del fórnix y de la estria terminal. Los impulsos de la corteza son conducidos directamente al hipotálamo o indirectamente a través del tálamo.

El papel efectos del hipotálamo se realiza a través de vías nerviosas y del sistema endócrino (humoral, hormonal o neurosecretorio). Las vías del sistema nervioso autónomo (primarias), y las del sistema motor simpático, son instrumentos para la expresión de la actividad hipotalámica. De la misma manera tanto manifestaciones conductuales como psíquicas se transmiten a través de las vías que unen al hipotálamo con el lóbulo límbico y la neocorteza.

Las neurosecreciones elaboradas en el hipotálamo son agentes humorales que ejercen su influencia sobre:

a.- El lóbulo anterior de la hipófisis (glándula pituitaria) a través del sistema portal (sistema porta-hipotálamo-hipofisiario).

b.- La neuro hipófisis, a través de las vías supraóptico-hipofisiarias.

En resumen, el hipotálamo esta estrategicamente colocado, tanto anatomica como funcionalmente, entre el cerebro, y el tronco cerebral y la médula espinal.

#### 4.0.- MORFOLOGIA CELULAR HIPOTALAMICA.

Las células hipotalámicas, al igual que las neuronas en general, tiene las mismas cualidades comunes, como son: su especial capacidad para reaccionar a los estímulos, transmitir rápidamente la excitación resultante a otras porciones de la célula, e influir en el funcionamiento de otras neuronas, células musculares y células glandulares.

Esta formado de un cuerpo celular (soma, pericarión) y de delgadas prolongaciones fibrosas -un axón y varias dendritas-. El término soma a menudo se usa en forma combinada, por ejemplo una sinápsis axo-somática es la que se realiza entre un axón y un cuerpo celular. El término pericarión se refiere a la región que rodea el núcleo.

El cuerpo celular constituye una porción esencial para la vida de la célula, y en general se encuentra más allá de la vista humana, pues su tamaño varía entre 4 y 135 micras de diámetro.

Las prolongaciones axónicas y dendríticas tienen un grosor aproximado de 0.1 a 3 micras. El axón y su correspondiente membrana plasmática a menudo reciben los nombres de cilindroeje y axolema, respectivamente.

#### 4.1.- MEMBRANA PLASMÁTICA.

La membrana plasmática es la cubierta exterior del cuerpo celular y de sus prolongaciones: se considera que alrededor del 10 por ciento de la superficie de una gran neurona corresponde al cuerpo celular. Esta delgada membrana celular, de alrededor de 80 a 1000 Angstroms de grosor, es una estructura altamente organizada y muy dinámica, compuesta de tres capas, que en conjunto, reciben el nombre de unidad membranal. Esta membrana trilaminar comprende una capa molecular de lípidos situada entre dos capas proteínicas. Cada una de estas tres láminas mide aproximadamente de 25 a 30 Angstroms de espesor. Sobre la superficie exterior se encuentra una capa glucoproteica, adyacente al espacio intercelular.

La llamada gran membrana neuronal comprende la membrana

plasmática o cubierta celular, y el espacio intercelular circundante. Su organización molecular preciso no se conoce, posiblemente varía en las diferentes regiones y en diferentes estados fisiológicos.

En cierto sentido la actividad funcional de la neurona esta ligada al mantenimiento de la membrana plasmática, que desempeña un papel importante en la generación y conducción de los impulsos nerviosos.

#### 4.2.- CUERPO CELULAR.

Dentro del cuerpo celular se encuentran en núcleo y cierto número de estructuras citoplasmáticas, como:

- 4.2.1.- Núcleo .
- 4.2.2.- Citoplasma.
- 4.2.3.- Mitocondrias.
- 4.2.4.- Sustancia de Nissl.
- 4.2.5.- Sistema de cisternas del reticulo endoplásmico.
- 4.2.6.- Aparato de Golgi.
- 4.2.7.- Inclusiones.
- 4.2.8.- Microtúbulos y Neurofilamentos.
- 4.2.9.- Cilios

Trataremos a continuación algunos aspectos de la estructura celular del hipotálamo que pueden tener importancia para el desarrollo de su función.

#### 4.2.4.- SUSTANCIA DE NISSL.

La sustancia de Nissl (cromofila o cromidial) comprende agregados de partículas intensamente basofílicas que se encuentran en los cuerpos celulares y en las dendritas de todas las células nerviosas, pero no existe ni en el axón ni en su sitio de emergencia.

Al microscopio de luz la sustancia de Nissl aparece formada por pequeñas masas romboides (cuerpos de Nissl). La microscopía electrónica indica que estos cuerpos de Nissl son puntos nodales del reticulo endoplásmico (RE) que atraviezan el cuerpo celular y las dendritas. Cada cuerpo de Nissl comprende las siguientes estructuras:

4.2.4.a.- Extensas laminas de reticulo endoplásmico granular (llamado también reticulo endoplásmico rugoso) con ribosomas agregados a la superficie externa de las cisternas y acomodados unos sobre otros en forma regular.

4.2.4.b.- Ribosomas libres espuestos en racimos o rosetas de 5 a 6 gránulos en torno a un gránulo central (polirribosomas), y colocados en el neuroplasma entre las cisternas del reticulo endoplásmico. Los ribosomas son ricos en gránulos de RNA. El reticulo endoplásmico granular se continúa con el agranular, llamado también reticulo endoplásmico liso, es decir, sin ribosomas.

#### 4.2.5.- SISTEMA DE CISTERNAS DEL RETICULO ENDOPLASMICO.

En general los agregados o cúmulos de la sustancia de Nissl se encuentran en relación directa con las vesículas del reticulo endoplásmico liso, son mayores cerca del núcleo y menores en la vecindad de la periferia de la célula y en las dendritas. La sustancia de Nissl es el organelo de mayor importancia en las biosíntesis de proteínas, y elabora, en un período de uno a tres días, una cantidad de proteínas igual a la que contienen la célula en cualquier momento: una gran cantidad de esta proteína elaborada es transportada hacia el axón mediante el flujo axónico. De las células del cuerpo humano las neuronas más grandes son las que contienen una mayor concentración de estructuras sintetizadores de RNA, sobrepasando inclusive en esta función a las células productoras de enzimas del páncreas. Las células nerviosas en general, requieren grandes cantidades de proteínas para mantener su integridad y llevar a cabo su actividad funcional.

Cuando se lesiona una neurona (por ejemplo al cortar un axón) la sustancia de Nissl da la impresión de desaparecer, por lo que este fenómeno recibe el nombre de CROMATOLISIS. La cantidad total de RNA dentro del cuerpo celular es la misma en cualquier momento: su concentración decrece solo aparentemente debido a que la célula hace una imbibición acuosa para triplicar su volumen. Sin embargo, en el transcurso de unos pocos días, la síntesis de RNA permite la reconstitución de la neurona. Una vez reconstituida la neurona, el cuerpo celular y la sustancia de Nissl recuperan su aspecto original.

La afinidad tintoreal de la sustancia de Nissl está en relación con el estado funcional de la neurona. Se tiñe bien en las neuronas "fisiológicamente inactivas", moderadamente en las células que han sido estimuladas para generar frecuentes impulsos, y en forma muy pobre en las que han sido estimuladas excesivamente durante períodos prolongados.

#### 4.2.6.- APARATO DE GOLGI.

No se sabe por que este organelo abunda en las neuronas. Es posible que ciertos pequeños gránulos localizados dentro de las cisternas, correspondan a gránulos de neurosecreción inmaduros a enzimas asociadas con el sistema lisosómico. En toda neurona lesionada el aparato de Golgi se disuelve, pero cuando la neurona se recupera el aparato de Golgi se reconstituye nuevamente.

#### 4.2.7.- INCLUSIONES.

Se puede presentar que en algunas células se encuentran inclusiones pigmentarias, como la lipofuchina, que ontogenicamente es la primera en aparecer en algunas neuronas de jóvenes adultos y que continua acumulándose a lo largo de la vida. Debido a que el número de estos gránulos, cuyo color va del amarillo al café, se incrementa durante el envejecimiento, se considera como un resultado de "desgaste" y es probable que corresponda a productos de degradación del citoplasma neuronal, ocasionados por actividad lisosómica o bien, que representen una forma alterada de lisosomas. Casi todas las células seniles contienen lipofuchina en cantidades variables. La inclusión es la melanina, que se encuentra en forma de pigmento oscuro en ciertas células, como las neuronas del bulbo olfatorio. Generalmente se encuentra en grandes cantidades alrededor de la cuarta o quinta década de vida en el ser humano.

#### 4.2.8.- MICROTUBULOS Y NEUROFILAMENTOS.

Los microtúbulos (neurotúbulos) y los neurofilamentos (microfilamentos) son proteínas fibrosas que se encuentran en los cuerpos en forma de estructura filamentosas orientadas paralelamente al eje mayor de las prolongaciones de cada célula. Las neurofibrillas pueden observarse en las neuronas vivas y en las teñidas por los métodos de plata. Los microtúbulos son rectos, no presentan nunca ramificaciones, miden alrededor de 200 a 250 Å de diámetro, presentan un núcleo cilíndrico central (en ocasiones un conducto) de 100 a 142 Å de diámetro, y parecen estructuras rígidas que se extienden en forma continua al axón y a las dendritas. Los neurofilamentos tienen un diámetro de 100 Å y son por lo tanto bastante más finos que los microtúbulos. Estas estructuras, especialmente los neurofilamentos, probablemente están asociadas con el transporte rápido (flujo axoplásmico o flujo axónico) del cuerpo celular a las terminaciones nerviosas.

Así mismo, los microtúbulos, pueden conferir a las células nerviosas cierta firmeza y rigidez, sobre todo a lo largo de las

dendritas y de los axones. En general no parece existir una relación cuantitativa entre estas estructuras: algunas neuronas tienen aproximadamente igual cantidad de ellas, otras tienen muchos microtúbulos y pocos neurofilamentos, y un tercer grupo, finalmente, presentan el caso contrario.

#### 4.3.- DENDRITAS Y AXONES.

##### 4.3.1.- DENDRITAS.

Las neuronas tienen dos tipos de prolongaciones: dendritas y axones. La célula tiene dos o más dendritas que se ramifican y se extienden hacia la periferia o lejos del cuerpo celular, y un solo axón. El cuerpo celular y sus dendritas forman la porción aferente, receptora o dendrítica, en tanto que el axón constituye la porción eferente o conductora. La zona receptora recibe y procesa impulsos que producen una respuesta o graduada decrecientemente (no del tipo "todo o nada"). La zona conductora transmite impulsos, potenciales de acción que proceden de la zona receptora y que son de carácter decreciente (del tipo "todo o nada").

Las dendritas son verdaderas extensiones protoplasmáticas del cuerpo celular, tienen el mismo patrón constitutivo y funcional de este y, en cierto sentido son la expresión estructural de la superficie de recepción. Las dendritas poseen el mismo tipo de organelos subcelulares que las células de donde se originan y nunca están mielinizadas. El axón, por el contrario, es una verdadera prolongación de la neurona.

Las células hipotalámicas son de tipo multipolar isodendrítico, es decir, se caracterizan porque cada célula tiene múltiples prolongaciones dendríticas largas y rectas que se ramifican a partir del cuerpo celular en todas direcciones, aunque a veces lo hacen preferentemente en un plano determinado. Las dendritas de las células hipotalámicas muestran un grado mediano de ramificación, con ramas fijas mayores que el tronco de donde se originan; así mismo presentan solo un número moderado de espinas. Las espinas no existen en la base de los troncos largos ni en los cuerpos celulares, y algunas constan de un segmento con terminaciones bulbosas en forma de notas musicales. Como ya se mencionó, se considera que las dendritas y sus espinas incrementa al área de recepción de la neurona, haciéndola habitualmente mayor que la del axón.

#### 4.3.2.- AXONES.

El axón de una neurona hipotalámica multipolar típica se desprende de una región cónica del cuerpo celular llamado COMO AXONICO, el cual llega a alcanzar un diámetro hasta de 100 um. después del cono axónico se encuentra el segmento inicial, el cual termina, normalmente en un aumento ligero del diámetro axónico. Después de este ensanchamiento de diámetro del axón general, se mantiene constante a lo largo de casi todas sus terminales. Generalmente el axón se encuentra envuelto por una capa segmentada, discontinua, llamada envoltura MIELINICA, la cual se interrumpe a intervalos regulares en los sitios llamados MODULOS DE RANVIER. A lo largo de su trayecto y, en particular, a niveles de los nodulos de Ranvier, pueden emerger ramas colaterales del axón. Distalmente cada axón se ramifica de manera profusa y en forma irregular para formar una arborización terminal conocida como telodendrita. La porción inicial o proximal de la telodendrita es el SEGMENTO PRETERMINAL y las ramas distales, constituyen el segmento terminal (sináptico). La punta de cada ramificación recibe el nombre de TERMINAL.

En las células grandes el cono axónico presenta poca sustancia de Nisal, pero en las pequeñas el contenido ribosómico es esencialmente el mismo que en el citoplasma del cuerpo celular. El patrón o carácter de diagnóstico del cono axónico es la disposición en forma de embudo de los fascículos de microtúbulos paralelamente al eje del segmento inicial del axón. En algunas células el axón puede originarse directamente de una dendrita: en estos casos la porción inicial no mielinizada, es el sitio nodal (POTENCIAL DE ACCION). En general no hay ribosomas en el cuello axónico ni en el resto del axón. En las fibras mielinicas, la envoltura característica se inicia justamente en la porción distal al segmento inicial.

El axoplasma contiene neurofilamentos orientados longitudinalmente y también microtúbulos y retículo endoplásmico agranular. La envoltura mielinica puede extenderse hasta cubrir los segmentos preterminales, aunque no necesariamente llega a los segmentos terminales.

#### 4.4.- NEUROPILA.

En la sustancia gris del sistema nervioso central se encuentran redes complejas perfectamente organizadas de terminaciones dendríticas, axónicas y prolongaciones gliales, que actúan, como sustrato estructural de la actividad fisiológica neural.

Esta ordenada red de prolongaciones recibe el nombre de neuropila y la elevada concentración de uniones sinápticas entre esta

plétora de prolongaciones neuronales se encuentra asociada a un complicado procesamiento que se realiza a través de interacciones funcionales entre los componentes de la matriz fibrosa.

#### 5.0.- FLUJO Y TRANSPORTE AXOPLASMICO.

Una neurona es una célula activamente secretora que tiene toda la organización biológica y el alto contenido de RNA necesaria para la manufactura de enzimas, neurotransmisores y para la neurosecreción. Los productos del cuerpo celular se distribuyen a las terminales axónicas por una vía unidireccional constituida por el flujo axoplásmico. Existen pruebas en el sentido que el transporte rápido se lleva a cabo con la participación de microtúbulos y microfilamentos.

El flujo axoplásmico somatofugal del cuerpo celular, a través del axón puede realizar varias funciones:

- a.- Mantenimiento de la integridad neural.
- b.- Distribución de gránulos y neurosecreciones.
- c.- Transporte de enzimas y sustancias químicas relacionadas con la formación de neurotransmisores.
- d.- Distribución de sustancias relacionadas con la actividad trófica.

Existen además pruebas de que algunas sustancias químicas pueden moverse en sentido contrario, es decir, hacia el cuerpo celular, lo que sugiere la presencia de un flujo bidireccional en el axón.

#### 6.- ARCOS REFLEJOS DEL HIPOTALAMO.

El hipotálamo está integrado por cierto número de arcos reflejos complejos, muchos de los cuales varían considerablemente de los arcos reflejos clásicos.

- 6.1.- Arco reflejo neural que utiliza un receptor periférico.
- 6.2.- Arco reflejo neural que utiliza un receptor hipotalámico intrínseco

### 6.3.- Reflejo neurohumoral.

#### 6.1.- ARCO REFLEJO NEURAL QUE UTILIZA UN RECEPTOR PERIFERICO.

El arco reflejo neural con receptor periférico sigue el patrón clásico del arco reflejo. Los receptores periféricos situados en el seno carotídeo y en la aorta envían estímulos a través del nervio glosofaríngeo y del tegmento mesencefálico hacia el hipotálamo, que a su vez proyecta impulsos eferentes a los centros cardiovasculares de la médula oblongada, y a través del nervio vago hacia el corazón.

#### 6.2.- ARCO REFLEJO NEURAL QUE UTILIZA UN RECEPTOR HIPOTALAMICO INTRINSECO.

Para permitir al hipotálamo cumplir con su papel de integrados de la temperatura corporal, un receptor intrínseco situado en el hipotálamo registra la temperatura de la sangre que circula a través de los capilares de esta estructura. La rama eferente de este arco incluye vías descendentes autónomas a las glándulas sudoríparas y vasos sanguíneos periféricos y vías somáticas descendentes hacia la musculatura del tronco.

#### 6.3.- REFLEJO NEUROHUMORAL.

Este arco utiliza los sistemas nerviosos y vascular para llevar a cabo su papel en el metabolismo del agua. El hipotálamo emplea un receptor hipotalámico intrínseco que registra la presión osmótica de la sangre que fluye a través del cerebro. Este receptor es estimulado para elaborar una neurosecreción conducida a través de las vías neurales hacia la neurohipófisis, donde es liberada dentro del sistema sanguíneo y transportada a las estructuras correspondientes del riñón.

Para el análisis del papel funcional del hipotálamo es necesario tener en cuenta que los arcos reflejos están integrados dentro de circuitos de retroalimentación negativa de cadena cerrada. Por ejemplo, las hormonas sexuales femeninas que fluyen por la corriente sanguínea actúan sobre receptores hipotalámicos, que a

su vez secretan factores liberadores de las hormonas hipofisiarias dentro del sistema porta hipofisiario. Estos factores influyen en la actividad secretora del lóbulo anterior de la hipófisis.

Cuando la concentración sanguínea de hormona sexual se eleva, la reacción hipotalámica puede deprimir la secreción de hormonas gonadotróficas en la hipófisis; cuando ocurre lo contrario el hipotálamo puede elevar esa secreción. La actividad reproductiva de los mamíferos parece estar determinada, al menos en parte, por la respuesta del sistema nervioso central a la estimulación por hormonas gonádicas (Morin Georges, 1980, Cardenas Juan, 1965).

#### **7.0.- HIPOTALAMO Y SUS FUNCIONES VEGETATIVAS.**

El hipotálamo ha sido considerado como la porción más craneal del sistema nervioso vegetativo. su estimulación y sus lesiones repercuten sobre numerosas funciones. La estimulaciones son más fáciles y más precisas desde que se utiliza el método estereotáxico, ya sea en experimentación aguda o experimentación crónica.

Este tipo de experimentación aguda y crónica, ha permitido comprobar la participación del hipotálamo en un conjunto de funciones vitales, que se enumeran a continuación, y que en realidad son los componentes de reacciones globales completas, las cuales se integran en vista de una orientación de conjuntos, con miras a mantener una homeostásis y un comportamiento adecuados:

- 7.1.- Circulación sanguínea.
- 7.2.- Regulación térmica.
- 7.3.- Movimiento del agua.
- 7.4.- Control de las funciones prehipofisiarias.
- 7.5.- Comportamiento.
- 7.6.- Influencia del hipotálamo sobre el metabolismo y la nutrición.

#### **7.1.- CIRCULACION SANGUINEA.**

Las experiencias de estimulación eléctrica permiten distinguir tres regiones hipotalámicas encargadas de su regulación:

- 7.1.1.- Región Presiva.
- 7.1.2.- Región Depresiva.
- 7.1.3.- Región vasodilatadora.

#### 7.1.1.- REGION PRESIVA.

Comprende la zona latero-posterior del hipotálamo. Su estimulación provoca una fuerte hipertensión, por vasoconstricción nerviosa y liberación adrenalínica con intensificación de la actividad cardíaca y de otras respuestas de tipo sanguíneo.

#### 7.1.2.- REGION DEPRESIVA.

Comprende una zona más reducida situada en el hipotálamo dorsal. Su activación inhibe las descargas aceleradoras del corazón y las vasoconstrictoras.

#### 7.1.3.- REGION VASODILATADORA.

Su estimulación en animales narcotizados provoca una vasodilatación de la musculatura esquelética, como consecuencia de la activación del relevo diencefálico de un sistema vasodilatador colinérgico. En realidad, la vasodilatación muscular, no es más que un elemento de respuesta compleja, en el dominio circulatorio.

#### 7.2.- REGULACION TERMICA.

##### Sensibilidad del hipotálamo.

La confrontación de resultados sugiere una relación directa entre los efectos de la estimulación localizada para el calor o para el frío y los de las lesiones situadas en la parte anterior o posterior del hipotálamo.

Los animales que resisten pero ya sea el calor o el frío, tienen respectivamente, lesiones anteriores (región del termodetector del calor) o posteriores (región del termodetector del frío).

El hipotálamo interviene también, para ajustar la producción de dos hormonas cuyo papel es importante en la regulación térmica: la hormona antidiurética, posthipofisiaria y la hormona tireotropa del lóbulo anterior de la hipófisis.

El hipotálamo interviene también, para ajustar la producción de dos hormonas cuyo papel es importante en la regulación térmica: la hormona antidiurética, posthipofisiaria y la hormona tireotropa del lóbulo anterior de la hipófisis.

### 7.3.- MOVIMIENTO DEL AGUA.

Según la experimentación reciente, el hipotálamo elabora la hormona antidiurética y regula su circulación. La puesta en circulación de la hormona está influida por factores como la temperatura, trabajo muscular, estímulos nociceptivos, anestesia, etc, pero todavía depende más de las variaciones del volumen de fluido circulante. Estas reacciones son desencadenadas por la estimulación de receptores de volumen, que radican en los vasos de presión baja, principalmente en la aurícula izquierda.

### 7.4.- CONTROL DE LAS FUNCIONES HIPOFISIARIAS.

El hipotálamo es el lugar de elaboración de la hormona antidiurética, iniciador por lo tanto de la función endócrina del lóbulo posterior, también controla la secreción del lóbulo medio y ejerce una influencia reguladora importante sobre la función del lóbulo anterior.

Dentro de los controles principales tenemos:

- 7.4.1.- Control de la secreción de las hormonas gonadotrópicas.
- 7.4.2.- Control de la secreción de la tiroestimulina.
- 7.4.3.- Control de la secreción de A.C.T.H.
- 7.4.4.- Control de la secreción de la hormona de crecimiento.

#### 7.4.1.- CONTROL DE LA SECRECIÓN DE LAS HORMONAS GONADOTROPAS.

La actividad gonadotropa de la prehipófisis está sometida al menos parcialmente, al control del hipotálamo.

##### 7.4.1.a.- Demostración del control hipotalámico.

La actividad gonadotropa de la hipófisis está influida por numerosos estímulos que actúan directamente sobre el hipotálamo de este modo actúan la luz, las variaciones climáticas, los estímulos sensoriales, el olfato y los estímulos genitomamarios y psíquicos.

La destrucción o lesión de estructuras tales como la parte posterior del tálamo, de las eminencias media y de los núcleos ventromediales, produce atrofia de las gónadas.

En hembras con ovulación provocada, esta mismas lesiones, la sección del tallo hipofisiario o el bloqueo de la circulación portalhipofisiaria, impide la ovulación. Inversamente, en una hembra normal la estimulación hipotalámica puede desencadenar la pu bertad y por consiguiente la ovulación.

##### 7.4.1.b.- Interpretación: Mecanismo.

La prehipofisis segrega tres hormonas gonadotropas. La foliculostimulina o F.S.H., necesaria para el desarrollo del folículo: la hormona luteinizante o L.H. que provoca la ruptura del folículo, y la hormona luteotropa (L.T.H. o prolactina).

#### SECRECIÓN DE LA F.S.H.

Es relativamente independiente del hipotálamo. Después de la destrucción de este, los ovarios contienen folículos en todos los estados de maduración.

#### SECRECIÓN DE LA L.H.

La secreción de la L.H. está estrechamente controlada por el

hipotálamo. La implantación de la hipófisis aislada es capaz de provocar la abertura vaginal de las hembras páberez, pero no aparecen cuerpos amarillos si no se adiciona una implantación hipotalámica, indispensable para que la hipófisis injertada segregue la L.H.

#### SECRECIÓN DE LA L.T.H. O PROLACTINA.

La secreción de la hormona L.T.H. está controlada por el hipotálamo, pero en el sentido de un drenaje, la exclusión del hipotálamo intensifica y prolonga su producción por la prehipófisis.

La existencia de un mediador hipotalámico hipofisiotropo que ejerciera este control inhibitorio ha sido sugerido por las experiencias recientes. La prehipófisis puesta a incubar libera cantidades mesurables de prolactina, fenómeno impedido por la adición de un extracto salino total del hipotálamo. Está admitida la existencia de un factor que inhiba la emisión de prolactina (P.I.F.).

#### 7.4.2.- CONTROL DE LA SECRECIÓN DE LA TIROESTIMULINA.

El delicado control de la secreción hipofisiaria de la T.S.H. por el hipotálamo parece efectuarse gracias a un mediador, la T.R.F. (Thyrotropin Releasing Factor), elaborado principalmente en el hipotálamo anterior.

#### 7.4.3.- CONTROL DE LA SECRECIÓN DE A.C.T.H.

El control de la secreción de A.C.T.H. revela un mecanismo humoral, la elaboración por el hipotálamo posterior de un mediador de acción específica, la C.R.F. (Corticotropin Releasing Factor).

#### 7.4.4.-CONTROL DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO.

Según las investigaciones recientes, la secreción de la hormona hipofisiaria de crecimiento (G.H.), está influida por dos factores hipotálamicos, uno que intensifica el G.R.F. (Growth Releasing Factor) y el otro que inhibe, G.I.F. (Growth Inhibit Releasing Factor), la liberación de la hormona de crecimiento. Se ha observado que estas acciones se realizan sin modificar la secreción de las otras hormonas prehipofisarias.

#### 7.5.- HIPOTALAMO Y COMPORTAMIENTO.

La patología, las experiencias de estimulación con electrodos permanencia sin anestesia y la observación de los animales portadores de lesiones experimentales asépticas, indican que el hipotálamo desempeña un importante papel en el comportamiento, en el ritmo cardíaco, en el humor, y en las expresiones afectivo-emotivas, en la eclosión de las necesidades y en la satisfacción de los instintos.

7.5.1.- Sueño.

7.5.2.- Necesidades alimenticias.

7.5.3.- Comportamiento emocional.

##### 7.5.1.- SUEÑO.

Parece que el hipotálamo posterior no contiene las estructuras esenciales necesarias y suficientes para el mantenimiento del estado de vigilia, sino que contribuye a reforzar la acción vigilante de la formación reticular.

##### 7.5.2.- NECESIDADES ALIMENTICIAS.

Algunos hechos anatomoclinicos y experimentales demuestran la intervención del hipotálamo en las orientaciones alimentarias del comportamiento, tales como:

- control de la ingesta alimentaria
- control de la ingestión hídrica.

Las estructuras hipotálamicas, integrando las informaciones periféricas y centrales, consecuencia principalmente del metabolismo, cuya intervención desencadena secuencias apropiadas características del hambre o de la sociedad. A esta regulación homeostática fundamental se añaden factores de motivación positiva o negativa, por convergencia sobre el hipotálamo del impulso procedentes de los centros superiores.

### 7.5.3.- COMPORTAMIENTO EMOCIONAL.

Las lesiones realizadas sobre el hipotálamo son capaces de modificar el comportamiento de los animales: su manera habitual de reaccionar a los estímulos internos y externos (humor, reacciones de defensa, satisfacción de las necesidades). Las modificaciones son distintas según que las lesiones afecten a los núcleos posterolaterales o a la región ventromedial. También intervienen en el ajuste de las reacciones instintivas y emotivas como respuesta a una serie de estímulos externos e internos, recibidos de la periferia, de los centros neocorticales y rinencéfalicos, que forman parte del sistema de regulación de todos los componentes del comportamiento, somáticos y vegetativos, nerviosos y endócrinos.

### 7.6. INFLUENCIA DEL HIPOTALAMO SOBRE EL METABOLISMO Y LA NUTRICION.

La obesidad ha sido producida, experimentalmente en la rata, el gato y el mono, mediante la destrucción de algunos núcleos pertenecientes al hipotálamo medio (lo cual puede producir más raramente un síndrome adiposogenital verdadero). Se cree, que esta obesidad puede deberse a una hiperfagia, es decir, a un vicio por exceso del instinto alimentario, a un trastorno del comportamiento.

Además, se ha observado que la estimulación del hipotálamo lateral ha producido hiperglucemia, que parece justificarse por la activación del sistema simpático-adrenal (Cardenas Juan 1965).

## CARACTERISTICAS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

El cerebro en general sigue las mismas reglas con respecto a la diferenciación sexual que el aparato reproductivo. La determinación genética (la expresión del modelo cromosomal XX y XY) se deja en los niveles de las gonadas. Subsecuentemente, el desarrollo sexual a través de las líneas sexuales dimórficas, son dependientes de la influencia de las hormonas gonadales.

En los mamíferos, la determinación de hembras y machos es decidido en el momento crítico de unificación de las células germinales para producir el cigoto. En el curso de la filogénesis, los dos cromosomas homólogos primarios. En el primer gonosoma, que se refiere al cromosoma Y como factor determinante del sexo, el segundo gonosoma, referido a cromosoma X. Así en mamíferos las hembras son homogaméticas (XX), mientras que el macho es heterogamético (XY).

Es muy claro profundizar en el proceso reproductivo en la diferenciación de dos individuos que serán capaces de reproducirse cuando alcancen su madurez, aunque los conceptos de diferenciación sexual del sistema reproductivo es bien conocido de los órganos internos y los genitales externos, este mismo concepto se aplica a las funciones del cerebro. Con respecto al sistema reproductivo periférico, en un periodo de desarrollo tanto las hembras como los machos son indiferenciados. Después de la subsecuente diferenciación de las gonadas análogas en testículos como en ovarios, la actividad secretora de las gonadas masculinas aparece para ser crítico para la diferenciación masculina de tanto órganos internos como genitales externos. Este concepto puede ser aplicable también a las funciones cerebrales. Es bien conocido que el cerebro de ratas hembras y machos difieren funcionalmente, sin embargo, estas diferencias en cerebro, no son determinadas directamente en el genoma neural, mejor dicho, estas diferencias sexuales en la funcionalidad del cerebro están establecidas por el desarrollo hormonal durante el periodo temprano perinatal testicular.

Inherentemente al cerebro, como el sistema reproductivo, es femenina, si no se expone a hormonas gonadales a un periodo crítico en su desarrollo, y permanece a pesar de todo del sexo genético (Brown y Grant, K. 1972).

La diferenciación sexual del control nervioso de las funciones reproductivas en mamíferos, esa través del resultado de la

exposición del cerebro a andrógenos testiculares durante el período de diferenciación neural. Afortunadamente, para el trabajo de los investigadores en este campo, en la rata la diferenciación del sistema reproductor ocurre antes del nacimiento, mientras que, en el cerebro ocurre en el período neonatal temprano, durante los primeros 5 días postnacimiento, por lo que experimentalmente, uno puede modificar al cerebro sin modificar los genitales. Sin embargo, en el hombre, que es una de las especies, en donde el proceso ocurre prenatalmente, por lo que uno solo puede hacer inferencias de observaciones de ciertos tipos de patología, aún así, el entendimiento puede ser entendido del fenómeno observado en experimentos con ratas, que son en algunos aspectos aplicables al hombre (Gorski, R. A. 1970).

El mejor estudio, y por supuesto, la más clara diferencia entre animales hembras y machos, son aquellas involucradas en la fisiología reproductiva.

Las hembras de mamíferos se caracterizan porque exhiben marcadamente fluctuaciones gonadotrópicas y niveles hormonales, mientras que los machos no lo presentan, es decir, que en las hembras se caracterizan por un ciclo de secreción hipofiseal gonadotrópica durante la madurez sexual, mientras que los machos muestran una liberación tónica de gonadotrofinas. Un ciclo de secreción gonadotrófica puede ser demostrada indirectamente por la presencia de cuerpo lúteo en ovarios o por cambios cíclicos en el epitelio vaginal (Everret, <J. W. 1969). Por ejemplo, los ovarios infantiles trasplantados en ratas castradas postpuberalmente forman un cuerpo lúteo, y la vagina de estos animales muestran alteraciones cíclicas en el epitelio, de otro modo, trasplantes ováricos en roedores intactos o castrados postpuberalmente fallan para desarrollar cuerpo lúteo, además, el trasplante de vagina en adición con ovarios en ratas machos exhiben persistente OESTROS (Davidson, J. 1969).

Por lo tanto, ratas hembras y machos nacen con la capacidad latente de secreción cíclica de gonadotrofinas. Si los testículos están presentes durante los primeros días de vida, a una diferenciación masculina que llevará lugar a una elevación de la secreción tónica de gonadotrofinas en la edad adulta. La ausencia de testículos durante el período de desarrollo crítico, de otra manera, conducirá a la diferenciación femenina, sin tener en cuenta la presencia o ausencia de ovarios.

## DIFERENCIA DE LA DEPENDENCIA ANDROGENICA EN LA SECRECION DE GONADOTROFINAS.

Se ha observado la permanente esterilidad en ratas hembras tratadas con testosterona durante el periodo de vida postnatal. Los ovarios de hembras postnatalmente androgenizadas no contenian ningun cuerpo luteo, y las vaginas mostraron persistente OESTRO. (Masa, F. G. and Martini I. K. 1971).

Experimentos realizados para determinar el efecto de cantidades diferentes de androgenos, en ratones hembras durante diferentes periodos pre y/o postnatal, han demostrado que la administracion de 1.25 mg. de propionato de testosterona (TP) en los dias 20. 50. 100. y 200. dias de vida, demostraron que los ovarios de todos los animales que habian recibido la administracion en los dias 20. y 50. no desarrollaron cuerpo luteo y mostraron atresia folicular e hipertrofia en el tejido de los ovarios, mientras que solo el 40% de las hembras androgenizadas en el dia 105 presentaron cambios y las inyectadas el dia 200. no presentaron cambios, por lo que se concluyen que el periodo sensitivo critico ocurre en ratones hembras entre el nacimiento y los dias posteriores, ademas que la administracion androgenica durante este periodo resulta una esterilidad permanente.

Finalmente se concluye, que la diferenciacion hipotalamica ocurre por la dependencia de androgenos. En presencia de testosterona producida por los testiculos fetales, son organizadas las regiones, un "Centro sexual Tónico", localizada en el hipotalamobasomedial y un "Centro de union masculino" en el hipotalamo anterior-preptico. Un "Centro de Union Femenino" en el hipotalamo medio existe solo como rudimento. Como resultado, de la secrecion tónica de gonadotropinas hipofisarias y la conducta sexual masculina se observan post-puberalmente.

En ausencia de androgenos testiculares, sin embargo, la organizacion femenina del hipotalamo ocurre independientemente de la presencia o ausencia de ovarios. En relacion con un centro sexual tónico hipotalamico, un centro ciclico sexual, es posteriormente diferenciado en la amigdal medial del continuum hipotalamico antero-posterior. Un centro de union femenino es organizado en el hipotalamo medio (region nuclear ventromedial), por esta razon, la ovulacion ciclica induce la secrecion de gonadotropinas hipofisarias y la conducta sexual femenina son observadas post-puberalmente.

Es aseptado, que las diferentes funciones son debido a la diferencia de sustratos neurales que regulan la actividad de la pituitaria y la conducta sexual.

La diferenciación sexual en otros parámetros de funcionalidad cerebral, tales como la regulación de alimento y peso corporal, agresión y conducta social, limitación de territorio, conducta agresiva, son también características cualitativas de diferencia entre los sexos. (Gorski, R. A. 1979).

En relación a la regulación de hormonas reproductivas tales como hormona luteinizante, LH y prolactina, difieren entre machos y hembras por ejemplo el estradiol es más efectivo en la supresión de LH después de la gonadectomía en ratas hembras que en machos. Estas diferencias sexuales por ejemplo en la regulación de lordosis persiste siempre que los niveles hormonales en el plasma sean los mismos entre los sexos después de la gonadectomización y reemplazar esteroides. Por lo tanto, la respuesta de diferenciación parece ser debida a la diferencia de sexos y la conexión neuronal de circuitos que regulan estas conductas y secreciones de la pituitaria (Barraclough, C. A. and Gorski, R. A. 1962).

Un análisis del dominio temporal de los esteroides sexuales, revelan tres distintos tipos de respuesta:

#### 1.- RESPUESTA DE CORTA LATENCIA Y DURACION.

Los esteroides sexuales (estrógenos, andrógenos y progestinas) pueden inducir con latencias breves (milisegundos) cambios en la excitabilidad de las neuronas. La característica temporal de esta respuesta en relación con la participación de síntesis de proteínas <Davidson, J. M. 1968>. Así, estas respuestas pueden involucrar directas acciones en los niveles membranales que alteren la conductancia iónica o modular el efecto de neurotransmisores inhibitorios.

#### 2.- RESPUESTA DE LATENCIA MEDIA Y DURACION.

Los esteroides sexuales también inducen efectos que son apreciables en horas o días. Estos efectos usualmente involucran la adición de esteroides sexuales y la presencia de receptores intracelulares en el núcleo. La activación de estos receptores facilita la interacción del complejo receptor-hormona con el genoma, por lo que se incrementa la transcripción de RNAs y el resultado de síntesis de proteínas. Este tipo de efectos de esteroides sexuales, que es típico de algunos órganos sensitivos a esteroides periféricos, como por ejemplo el útero (Edward, D. A. and Whale, R. W. 1968).

### 3.- RESPUESTA TRANSITORIA, SEGUIDA DE UNA ALTERACION DE LA CAPACIDAD PARA RESPONDER A LOS ESTEROIDES.

El análisis del dominio temporal de la acción de los esteroides sexuales revela una respuesta característica que puede ser crucial para entender el efecto de esteroides sexuales sobre la organización cerebral. Una respuesta transcendental inicial puede ser seguida por una alteración prolongada del tejido blanco, que se manifiesta como un cambio en la capacidad del tejido para responder al mismo estímulo hormonal. Tal efecto ha sido descrito para varias respuestas estrogénicas de tejidos. Estos efectos consisten en un acortamiento de la latencia y un aumento de la respuesta a una segunda administración de la hormona. En los niveles celulares, este cambio en menos sensibilidad están relacionados a los persistentes cambios en la estructura de la cromatina que sigue al complejo receptor-hormona para interactuar más eficientemente con sitios específicos sobre el DNA. Este tipo de efecto es obviamente relevante en la diferenciación sexual del cerebro. Los esteroides gonadales perinatales, producen cambios observables en la conducta, fisiológica, que no ocurren en la primera administración de hormonas, pero que se manifiestan en ellas mismas por varias semanas o meses después de una segunda aplicación de la hormona estimulante. Probablemente los esteroides perinatales producen inmediatamente cambios celulares que no se manifiestan hasta mucho más tarde, cuando las condiciones hormonales son apropiadas en el presente por ejemplo, la producción de cantidades adecuadas de esteroides sexuales, empiezan en la pubertad (Edward D. A. 1968).

La diferencia sexual en el modelo sináptico ha sido demostrado en todas las regiones cerebrales relacionadas con el control de la reproducción, como por ejemplo el núcleo arcuato, el núcleo supraquiasmático, el MBH, el mPOA y el núcleo amigdal medial (Dorner and Staudt 1968). Cada neurona, recibe un promedio de 1000 contactos sinápticos de otras neuronas, porque estos contactos están relacionados con su alta especificidad en su localización (asta dendrítica, espinas, soma o axón). Es improbable, que ellas resulten de unas prolongaciones neuríticas después de la estimulación con esteroides sexuales. Sin embargo, variaciones en la organización sináptica en estructuras dimórficas sexuales no puede todas ser resultado de una acción directa de esteroides sexuales en el desarrollo neuronal, por ejemplo, el núcleo supraquiasmático tiene pocos o no presenta receptores hormonales, pero muestran diferencia sexual.

Algunos estudios demuestran también la importancia de entradas aferentes a las células diferenciadas del hipotálamo, en donde se observó que las células neurosecretoras inmaduras pueden desarrollarse en cultivos organotípicos del hipotálamo fetales de 40. día en puerco de guinea, por ejemplo, en la ausencia de blancos

especificos, estas células aparecen pobramente diferenciadas con un soma de Golgi, restringida y no presenta gránulos secretores, después de 105 días in vitro, las sinápsis aferentes, aparecen 5 días más tarde los gránulos se presentan en el complejo de Golgi, estos resultados sugieren que es indispensable las fibras aferentes de entrada para la completa diferenciación de células hipotalámicas magnoceulares.

Las diferencias morfológicas, funcionales y bioquímicas entre el sistema nervioso femenino y masculino existen claramente a través de las correlaciones de estas diferencias que no son siempre claras. El sexo diferencial ha sido reportado en la morfología del núcleo del hipotálamo ventro medial (VHM), en el modelo de las terminales sinápticas en la area preóptica, el núcleo arcuato, y el núcleo amigdalóideo. El dimorfismo sexual de este núcleo es fácilmente detectado por inspección visual con un microscopio de bajo poder, el volumen de este núcleo es tres a cinco veces más grande en machos que en hembras (Gorski, R. A. 1979).

La concepción eléctrica entre el VHM y el MCG puede diferenciarse entre hembras y machos, basado sobre estudios Santidromic (Levine S. and Mullin, R. F. 1964).

La influencia de estradiol sobre receptores progestagenos acetiltransferasa es reportado como una gran diferencia entre hembras y machos (Feder, H.H. 1967).

Estas diferencias sexuales en conducta y morfología son debido enormemente a la diferencia sexual en niveles hormonales en periodos críticos, como ya se mencionó anteriormente. Si los machos son gonadectomizados el 3o. día de nacimiento en adultos ellos presentan una respuesta lordótica en la presencia de estradiol. Todas las diferencias discutidas anteriormente morfológica y conductuales muestran similar dependencia sobre la presencia de testosterona en los primeros días después del nacimiento. La testosterona es cada vez inefectiva en la masculinización del sistema nervioso después del 6o. día, y después del 11o. días casi no tienen efecto permanentemente cuando se implanta intracerebralmente. Estos datos sugieren que el sistema nervioso femenino conforma a un Modelo Neutral Hormonal, y la presencia de esteroides sexuales puede convertir el modelo en un modelo masculino.

sin embargo, ni el estradiol ni la testosterona, parecen ser los agentes encargados para inducir completamente la diferenciación

sexual. La testosterona es convertida a estradiol en el cerebro por aromatasa. Si esta conversión es bloqueada neonatalmente, por inhibidores de enzimas aromatasas en machos intactos, desarrollarían conducta femenina, incluida las respuestas lordóticas y morfológicas neural. Sin embargo, la administración neonatal de estradiol es cerca de 10 veces más efectiva que la testosterona en inducir modelos masculinos en femeninos. Las hembras no desarrollan un modelo masculino porque el estradiol en neonatos es atrapado generalmente por alfa-cetoproteínas por lo que no es accesible al sistema nervioso, mientras que la testosterona no es atrapada, por lo que tiene su libertad en el sistema nervioso, donde es convertido en estradiol, esto es debido a que dos días después del nacimiento, las células del sistema nervioso central concentran y mantienen el moxoestrol, un estrógeno sintético que no atrapa a la alfa-cetoproteína, pero que mantiene el metiltienolone, un andrógeno sintético que no aromatiza a el estrógeno.

Los mecanismos por el que el estradiol induce cambios permanentes en conectividad neural puede involucrar la inducción de factores ya que se ha comprobado que el estradiol induce crecimiento neurítico en cultivos de hipotálamo neonatal de ratón y que estimula el crecimiento dendrítico. Por lo que estos estudios sugieren que el estradiol puede inducir el crecimiento neuronal en las células en las que actúa, que deja a estas neuronas hacer contacto más real con las neuronas blanco apropiadas.

Como los andrógenos sacan irreversiblemente efecto y que los circuitos involucrados están pobremente estudiados. Se incrementa la evidencia, sin embargo, sugiere que el modelo inicial de acción androgénica puede involucrar su aromatización intraneural al estrógeno, en algunos sitios neurales como el área preóptica el hipotálamo y en la amígdala (Pffaf, D. W. 1973).

Estas regiones están pobremente diferenciadas en el nacimiento, sin embargo, la maduración funcional en el área preóptica coincide con el final de la fase del periodo crítico (Mishizuka, M. 1976).

Además Raisma y colaboradores han demostrado la existencia de dimorfismo sexual en la organización sináptica del área preóptica y de andrógenos neonatal es en roedores adultos.

No obstante, esta demostración de plasticidad y reorganización de el neuropil durante el periodo crítico, aspectos morfogenéticos y de bases anatómicas para la diferenciación sexual de estas

regiones límbicas permanecen desconocidas aún.

Se ha demostrado que los efectos morfogenéticos de los esteroides gonadales (estrógeno y andrógenos) en el desarrollo de cultivo organotípicos del hipotálamo (area preóptica) de ratones recién nacidos, presenta una evidencia morfológica del efecto directo de los esteroides sexuales in vitro, en el modelo de desarrollo de neuronas del area seleccionada, por lo que se sugiere que el índice de crecimiento axonal puede ser un factor importante en la neurogénesis de la diferenciación sexual del cerebro.

Los estudios de ontogénica de la diferenciación dendrítica a través del sistema nervioso central, han conducido a los conceptos generales de partes receptoras neuronales, además de la geometría dendrítica y del modelo sináptico han inducido por su diferencia axonal. Sin embargo, han observado in situ, que generalmente, la diferenciación dendrítica entre la diferenciación de dendritas y la aparición de terminaciones axonales en su inmediata vecindad.

Además se ha sugerido que la cantidad de espacio postsináptico disponible parece ser estrictamente limitado y relacionado con tanto por cada tipo neuronal, la repartición de sitios sinápticos entre diferentes grupos de axones que convergen en determinado competitivamente sobre las bases temporales. La distribución espacial de sinápsis, sin embargo, aparecen para reflejar la diferencia de los coeficientes de crecimiento de axones específicos y del número relativo de cada categoría axonal presente en el momento de la sinaptogénesis. El sitio de la terminación de un axón aferente en particular, puede depender también de su rango de maduración de sus terminaciones neurales, desde las diferentes regiones de la superficie receptiva en diferentes tiempos.

El índice de desarrollo axonal, sin embargo, muestra ser crítico en el establecimiento de las interacciones neuronales in situ, que parece ser influenciada por los esteroides gonadales in vitro. La naturaleza neurítica de esta respuesta in vitro, especialmente sus aspectos temporales, sugieren que la diferenciación sexual inducida por esteroides en el crecimiento neuronal, parece tomar un papel importante en la neurogénesis de la diferenciación sexual. En ambos casos, podría estar influenciada por la diferenciación dendrítica y la distribución sináptica de neuronas blanco como el resultado de la diferencia fundamental, sexo específico y el modelo de organización neuronal.

Aunque los requerimientos de la diferenciación sexual a nivel del aparato reproductivo constituye un concepto bien conocido cuando se aplica a las glándulas secretoras sexuales, testículos y ovarios, o a los caracteres sexuales secundarios (Wilson, 1978, Wilson y col. 1981, MacEwen, 1981, Ehrhardt y Meyer-Bahlburg, 1981).

En relación al sistema reproductor propiamente dicho, deberecordarse que en el curso del desarrollo embrionario, las hembras y los machos son morfológicamente indistinguibles durante un espacio mas o menos largo de tiempo. Sin embargo despues de la diferenciación de la gonada indiferenciada para originar el testículo o el ovario, la actividad secretora de la gonada masculina parece ser indispensable para iniciar el desarrollo normal de los organos reproductores masculinos y cambiar el destino de un individuo que se supone ser inherentemente femenino.

Después de que la organización de las gónadas y de los conductos genitales ha terminado, se inicia la diferenciación de los genitales externos, del seno urogenital y de las glándulas mamarias. Los genitales externos se originan del tubérculo-genital, los surcos uretrales y las eminencias genitales, las cuales se encuentran inicialmente iguales en las hembras que en los machos (Wilson, 1981).

En presencia de niveles altos de andrógenos, cuya presencia se debe a que son normalmente secretados por el testículo fetal, o a que administrados exógenamente, se orientará la diferenciación a la formación del pene, la uretra masculina y la prostata, todo ello sin importar el genoma de individuo. Por el contrario si los niveles de andrógenos son bajos, como sucede normalmente en la hembra o artificialmente en el macho castrado, la diferenciación se realizará siguiendo el patrón femenino. Se formará clítoris, vulva, uretra corta, introito vaginal y finalmente mamas (Geroge y Wilson, 1978).

Estas misma dependencia de la presencia de andrógenos parece ser indispensable para determinar la diferenciación sexual del cerebro. Actualmente se sabe que el cerebro de los machos y de las hembras muestra importantes diferencias en su funcionamiento y que estas diferencias no son determinadas directamente por el genoma celular sino que son determinadas por el ambiente hormonal presente durante el periodo perinatal, aparentemente por la modificación de un patrón de desarrollo que es también, inherentemente femenino (Gorski, 1971; Beach, 1975). Nótese, entonces, que si el desarrollo ocurre en la ausencia de hormonas gonadales ( por ejemplo en la hembra intacta o en el animal de cualquier sexo privado de sus gonadas en el periodo neonatal inmediato) el funcionamiento del animal adulto será de características

femeninas, sin importar la constitución genética del animal. Por el contrario, si la diferenciación ocurre en presencia de esteroides gonadales, endógenos, o aplicados exógenamente durante el mismo período crítico de la diferenciación, el animal desarrollará un funcionamiento cerebral de tipo masculino (Gorski, 1979; McLusky, y Naftolin, 1981; McEwen, 1981; Ehrhardt y Meyer-Bahlburg, 1981).

Desde el punto de vista reproductivo, las hembras adultas de los mamíferos se caracterizan por un patrón cíclico de secreción de gonadotrofinas (Brown-Grant, 1974), mientras que los machos exhiben una liberación tónica y continua, de estas hormonas hipofisiarias (Brown-Grant, 1974). La característica cíclica de las hembras se manifiesta fácilmente en la aparición del ciclo estral al iniciarse la pubertad, el cual puede estudiarse fácilmente mediante las variaciones cíclicas de epitelio vaginal o por la aparición de cuerpos luteos en el ovario.

A los resultados relacionados con el patrón tónico o cíclico de secreción de gonadotrofinas, deben agregarse las observaciones posteriores realizadas sobre la conducta sexual. Es bien sabido que la rata hembra adulta además de la liberación cíclica de gonadotrofinas indispensable para provocar la ovulación, presenta una conducta sexual caracterizada por la adopción, frecuentemente durante el estro, de la posición de lordosis para facilitar la copulación (Harris, 1964; Taleisnik y col. 1971; Brown-Grant, 1974, Gorski 1974). Por el contrario, el macho es incapaz, normalmente, de adoptar la posición de lordosis y su conducta sexual esta orientada a la monta, la intromisión del pene y la eyaculación (Sax y Meisel, 1988).

#### DETERMINANTES NEUROENDOCRINOLÓGICOS DE LA CONDUCTA SEXUAL.

Tomando como modelo al patrón de conducta sexual de la rata, encontraremos que en general, la conducta masculina consiste en una serie de patrones estereotipados de monta, intromisión y eyaculación.

El patrón de monta se reconoce por un acercamiento a la parte posterior de la hembra, la palpación de los flancos con los miembros delanteros, acompañado de movimientos pélvicos cortos y repetitivos.

El patrón de intromisión consiste en una monta seguida por un movimiento pélvico bastante acentuado en dirección anterior.

El patrón de eyaculación consiste en una intromisión en la que el movimiento pélvico característico se mantiene en su extremo más rostral por algunos segundos, mientras se producen movimientos receptivos de flexión en los miembros posteriores.

Para que se produzca todo este patrón de conducta debe integrarse todo un cortejo de factores, en donde una estimulación sensorial es decisiva en ella. La información que sobre lo anterior se tiene no es muy amplia todavía y se ha obtenido de manera muy heterogénea.

#### PRIMERO:

La naturaleza de dichos estímulos presenta una variación muy importante en función de la especie, así, por ejemplo, en la rata, la estimulación olfatoria es mucho menos importante que otras especies de roedores, como el ratón y el hámster.

#### SEGUNDO:

Cada estímulo sensorial tiene dos efectos: uno específico, que provocaría una respuesta en particular; y otro, no específico, que influencia la capacidad de respuesta del individuo a cualquier otra estimulación, y viceversa como lo demuestran las observaciones obtenidas al aplicar estímulos dolorosos de tipo periférico y que incrementan la conducta sexual.

#### TERCERO:

Las experiencias previas condicionan en gran parte el tipo de estimulaciones que posteriormente produzcan conducta sexual en el adulto.

La conducta sexual de la hembra tiene una caracterización conductual bien precisa: atractividad, proceptividad y receptividad (Sax y Meisel 1988).

La atractividad, relacionada con la capacidad de la hembra para provocar conducta sexual en el macho y que incluye cambios de tipo anatómico en ocasiones (como cambios de coloración de los genitales por ejemplo) y la producción de sustancias odoríferas.

Proceptividad, se refiere al conjunto de patrones motores que la hembra realiza como un medio de comunicación al macho que se encuentra receptivo.

Receptividad, implica la adopción de una postura que facilita la penetración del pene y la eyaculación. En el caso de los roedores dicha postura es la lordosis.

Las gónadas de las hembras producen tres diferentes tipos de estrógenos: estrona, estradiol y estrol. Es el estradiol seguido de la estrona, el esteroide más importante para inducir conducta sexual.

Aún en altas dosis, el estrógeno no activa la conducta sexual sino hasta después por lo menos de 24 hrs. de su aplicación. La progesterona es una condición necesaria para la producción de la conducta sexual de la rata y en general de todas aquellas especies que necesitan de una acción secuencial hormonal para producir este efecto.

El mecanismo mediante el cual los estrógenos y la progesterona interactúan en la producción de conducta sexual no se encuentra bien comprendida todavía, aunque se han propuesto varios modelos para intentar explicarlo. Apparently los estrógenos prepararían el terreno a la progesterona vía la producción de receptores membranales para esta y probablemente con la sintetización de proteínas en forma inactiva que se encontrarían en forma latente en el citoplasma neuronal hasta que la progesterona a través de mecanismos membranales inducidas directamente por ella o a través de otras substancias (neurotransmisores o prostaglandinas) induce la activación de estas proteínas, vía AMP cíclico y fosforilasas. Apparently la producción de conducta sexual dependería de estas proteínas activas de una manera directa o indirecta.

La rata hembra presenta un ciclo estral de 4 o 5 días de duración. Por lo tanto, desde nuestro punto de vista será necesario analizar aunque sea muy someramente. Durante este ciclo estral se suceden los siguientes acontecimientos endócrinos. La iniciación de los niveles sanguíneos de estrógenos desencadena la presentación de un estímulo neurohumoral cíclico que activa la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por hipotálamo (Kelly y col. 1984; Everett, 1988). Esto acontece habitualmente, en el ambiente del laboratorio, dos horas después de medio día, en el día en que la citología vaginal indica proestro (Everett y Nichols, 1968). La secreción de GnRH estimula la secreción de la hormona luteotrófica (LH) por la hipófisis, lo cual resulta en la puesta ovular, lo cual ocurre un poco después

de la medianoche del mismo día. La elevación brusca de la concentración sanguínea de LH ("LH surge") es seguida por un aumento notable en la secreción de progesterona y, unas horas después, por la aparición de la conducta sexual femenina típica y la adopción de la posición de lordosis en el momento de ser montada por el macho (Gorski, 1979). Es posible que la secuencia de altos niveles de estrógenos, seguidos por altos niveles de progesterona constituya el estímulo para provocar en la hembra la posición de lordosis, puesto que tal conducta no se presenta en ningún otro punto del ciclo estral (McEwain y col. 1987). Es pues bien claro, que en el caso de la rata hembra, las fluctuación cíclica en los niveles de hormonas culmina con la ovulación, la presentación de la conducta sexual y la preparación para el embarazo. En contraste, en el macho no se presenta ninguna de estas características cíclicas, ni en los niveles de hormonas, ni en la evocación de la conducta sexual ya que el macho es capaz de mostrar conducta de monta en cuanto se le presenta cualquier oportunidad de copular (Meyer y col. 1980).

La siguiente es una lista de las funciones cerebrales que se han propuesto como participantes en este concepto de diferenciación sexual en diversas especies animales (Beatty, 1979; MacLusky y Naftolin, 1981; Gorski, 1979 ):

- Regulación de la función endócrina de la hipófisis.
- Conducta sexual, tanto femenina como masculina.
- Conducta de defensa y de agresión.
- Conducta social y de juego.
- Postura para la micción en el perro.
- Consumo de alimentos y distribución de la grasa, particularmente en la relación con la actividad de las hormonas sexuales.
- Algunos aspectos de la conducta de aprendizaje.
- Territorialidad.
- Desempeño social como macho o como hembra.
- Fotoperíodo.
- Vocalización de las aves.
- Respuesta a la estimulación sexual y la succión del pezón.

Si nos referimos ahora específicamente al hipotálamo, debemos considerar como acontece la diferenciación, andrógenos dependiente, de este importante organelo. En presencia de testosterona, producida por el testículo fetal o administrada exógenamente, se organiza en la parte baso-medial del hipotálamo un "Centro Sexual Tónico" y en la región hipotalámica anterior y la parte medial de área preóptica un "Centro de Cópula Masculino". Al mismo tiempo el "Centro de Cópula Femenino", presente en el hipotálamo medio, queda solamente como un rudimento (Barraclough y Gorski, 1961; Gorski y Barraclough,

1963). Esta diferenciación da como resultado, en el animal adulto, el patrón tónico de secreción de gonadotropinas característico de los machos, así como el patrón conductual masculino durante la cópula.

En ausencia de andrógenos, como sucede normalmente en la hembra, o artificialmente, en el macho castrado, independientemente de la presencia o ausencia de ovarios, el hipotálamo se organizará de manera de desarrollar un "Centro Cíclico Sexual" en el Continuum Hipotalámico, area preóptica y amígdala media; también se desarrollará el "Centro Copulatorio Femenino" en la región ventromedial del hipotálamo. Esto se acompaña de la falta de desarrollo del "Centro Copulatorio Masculino", aunque el "Centro Tónico Sexual", mencionado anteriormente, también se desarrolla (Barraclough y Gorski, 1961; Gorski y Barraclough, 1963; Docke y Dorner, 1969; Nadler 1973). Este tipo de diferenciación da ovulación y secreción de gonadotropinas característico de las hembras, así como la aparición de la conducta sexual femenina después de la pubertad.

Como mencionamos anteriormente, las hembras adultas de los mamíferos se caracterizan por un patrón cíclico de secreción de gonadotropinas, mientras que los machos exhiben una liberación tónica continua de estas hormonas hipofisiarias. La característica cíclica de la secreción gonadotrópica en las hembras se manifiesta a partir del momento en que se inicia la pubertad con la aparición del ciclo estral y con él, las variaciones cíclicas del epitelio vaginal, la ovulación y la aparición de cuerpos lúteos en el ovario. Por ejemplo, si se transplantan los ovarios inmaduros de una hembra prepúber, a una hembra adulta previamente ovariectomizada, puede observarse que estos ovarios infantiles serán capaces de formar cuerpos lúteos y de inducir la ciclicidad del epitelio vaginal (Goodman, 1934). Por el contrario si estos ovarios son transplantados a animales machos adultos, castrados, no serán nunca capaces de mostrar cambios cíclicos, ni de desarrollar cuerpos amarillos (Yasaki, 1960). Si al mismo tiempo se trasplantan la vagina y los ovarios a un macho castrado, la vagina mostrará la presencia de un estro persistente, sin ningún signo de ciclicidad (Yasaki, 1960).

Los experimentos cruciales para demostrar la diferenciación sexual específica del hipotálamo fueron realizados por Pfeiffer en 1936. Este investigador castró a un grupo de hembras recién nacidas y cuando llegaron a la edad adulta les implanto ovarios, observando que estos ovarios mostraron la aparición de cuerpos lúteos y fueron capaces de inducir los cambios típicos del ciclo estral en la vagina de las hembras transplantadas. En un segundo experimento, inmediatamente después de la ovariectomía se les injertó a las ratas recién nacidas fragmentos de testículo. Al

llegar a la edad adulta, estas ratas, androgenizadas en el periodo perinatal, mostrarán anovulación y por lo tanto esterilidad y la presencia en el estudio del epitelio vaginal de estró persistente. Además, fueron incapaces de inducir los cambios cíclicos arriba anotados cuando les fueron trasplantados ovarios.

En experimentos complementarios de los descritos arriba, Pfeiffer (1936) demostró que la castración de machos recién nacidos induce una diferenciación de tipo femenino, puesto que si a estos animales se les trasplantaban ovarios en la edad adulta, estos ovarios mostrarían la aparición de cuerpos lúteos. También fue demostrado que la aplicación de hormonas esteroides, tanto estrógenos como testosterona, a macho recién nacidos en cantidades no excesivas, es incapaz de modificar el patrón normal del desarrollo masculino.

De los experimentos de Pfeiffer, comprobados y extendidos después por numerosos investigadores (MacLusky y Naftolin, 1981; McEwen, 1981; Gorski 1979), se postuló que las ratas, machos y hembras; sin importar el sexo genético del animal, nacen con la capacidad de desarrollar una secreción cíclica de gonadotropinas al llegar a la pubertad. Sin embargo, si durante un periodo crítico del desarrollo, que va desde unos pocos días antes hasta unos días después del nacimiento, existen niveles adecuados de hormonas esteroides, habitualmente testosterona por la presencia de testículos, entonces se induce una diferenciación de tipo masculino quedará como consecuencia la aparición de un patrón tónico de secreción de gonadotropinas al llegar a la edad adulta. La ausencia de testículos, normal o inducida artificialmente, dar' como resultado la aparición de un patrón de desarrollo femenino, sin que la ausencia o presencia de ovarios tenga ninguna importancia.

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

En efecto, los machos castrados durante este periodo crítico,

mostrarán en la edad adulta un patrón conductual de tipo femenino: proceptividad, atractividad y adopción frecuente de la posición de lordosis (Beach, 1966). Por el contrario la hembra gonadectomizada en la etapa crítica no sufrirá alteraciones en su conducta y se comportará, desde luego, después del tratamiento hormonal adecuado, como hembra (McLusky y Naftolin, 1981; MacEwen, 1981; Ehrhardt y Meyer-Bahlburg, 1981). Estos resultados indican que la presencia de ovarios en el animal recién nacido no desempeña ninguna función en la determinación de la conducta sexual del adulto normal.

La administración exógena de esteroides durante este período crítico ( en la rata este período se extiende desde el nacimiento hasta el día 85, aproximadamente, con diversas modalidades que después precisaremos) no provoca en el macho ninguna modificación de la conducta sexual de la edad adulta. Por el contrario las hembras tratadas con esteroides gonadales durante este período de tiempo, no mostrarán en la edad adulta la conducta femenina típica, prefiriendo la conducta de monta a la posición de lordosis, aún después del tratamiento hormonal adecuado (Dorner y Hinz, 1975).

Todos los efectos anteriores, que se han demostrado fundamentalmente en la rata, han sido extendidos a numerosas otras especies animales, incluyendo al hombre (Ehrhardt y Meyer-Bahlburg, 1981). Sin embargo, debe mencionarse que se encuentran grandes diferencias en cuanto a la relación del período crítico con el desarrollo en general del individuo, así como también a la susceptibilidad a la aplicación exógena de esteroides gonadales, incluyendo el tipo de esteroide, la dosis aplicada y el esquema de tratamiento (Pfaff, 1986). Por ejemplo en la rata este período crítico de sensibilidad neuronal se presenta en el período neonatal temprano, extendiéndose, con algunas fluctuaciones, del nacimiento hasta el día ocho de la vida extrauterina, mostrando el animal mayor susceptibilidad entre los días 30. y 50. de vida (McLaren, 1972; Goy y McEwen, 1980). Aunque la experimentación es muy difícil, las observaciones de conducta sexual en sujetos afectados por algunas enfermedades congénitas que afectan la actividad de los esteroides gonadales (Ehrhardt y Meyer-Bahlburg, 1981), ha permitido concluir que, en el hombre, el período crítico se presenta antes del nacimiento.

RELACION ENTRE EL PERIODO DE GESTACION Y EL PERIODO CRITICO DE DESARROLLO PARA LA DIFERENCIACION SEXUAL DEL SNC.

ANIMAL INCUBACION	GESTACION O (DESPUES DE LA CONCEPCION)	PERIODO CRITICO
-----		
<b>MAMIFEROS.</b>		
Rata	20 a 22	18 a 27 días
Raton	19 a 20	Postnatal
Hamster	16	Postnatal
Conejo de Indias.	63 a 70	30 a 37 días
Huron.	42	Postnatal
Perro.	58 a 63	Prenatal + postnatal
Oveja.	145 a 155	30 a 90 días
Mono Rhesus	146 a 180	40 a 60 días

**AVES**

Codornis Japonés.	17 A 18	PREANIDACION
Pollo domestico	22	PREANIDACION
Zebra	12 A 14	POSTANIDACION
Pigeón	14	POSTANIDACION

(\*) El valor de estos datos, son de especies en donde la duración del periodo critico ha sido estudiados sistemáticamente.

Algunas dudas permanecen para algunas especies enlistadas, para precisar la hora del periodo sensitivo del SNC a las hormonas gonadales.

En estos casos, la información dada (pre o post nata, pre o post anidación) indican cuando las hormonas gonadales han estado mostrando efectos externos de organización sobre el SNC.

\*\* Goy, R. W. Ed. Sexual differentiation of the brain (Mit Press, Cambridge, Mass, 1980).

MacLaren, A. Reproduction in Mammals, Austin, C. R. Eds. (Cambridge Univ. Press. New York, 1972) vol. 2 p. 1.

Es importante considerar cuales hormonas esteroides son capaces de inducir los cambios descritos con anterioridad y tal vez revisar, muy someramente, sobre que estructuras cerebrales e hipotalámicas ejercen su acción. También haremos algunas consideraciones sobre la relación dosis/tiempo de administración de las hormonas sobre la diferenciación cerebral. Aunque en los primeros experimentos se uso casi exclusivamente la testosterona, originandose los conceptos de androgenización o masculinización, actualmente se sabe que el estradiol es tan efectivo, o más efectivo, que la testosterona para producir estos efectos de "masculinización hipotalámica" (Gorski, 1966; Sutherland y Gorski, 1972). Estos resultados se han confirmado por que algunos compuestos anti-estrogénicos o inhibidores de la aromatización son inhibidores muy eficaces de la actividad masculinizante de la testosterona (McEwen y col. 1977; Vreeburg y col. 1977). También se ha comprobado que el encéfalo, particularmente el hipotálamo, como muchos tejidos periféricos, es capaz de metabolizar los esteroides, una de estas reacciones implica la aromatización de la testosterona para formar estradiol (Selmanoff y col. 1977).

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

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

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

Por otro lado, los progestágenos son antagonistas del efecto que los andrógenos y los estrógenos poseen sobre la diferenciación cerebral. Los cambios permanentes provocados en el patrón de secreción de gonadotrofinas por la inyección neonatal de andrógenos o estrógenos pudieron ser prevenidos, al menos en parte, por la administración simultánea de dosis elevadas de progesterona (Dorfman, 19677; Dörner y Fatschel, 1970). Por lo tanto, los progestágenos parecen tener un efecto protector sobre la especificidad sexual de la diferenciación cerebral, la cual se ha adscrito a su actividad de competencia sobre los receptores hormonales intracelulares (Etgen, 1984).

Experimentos realizados para demostrar el efecto de una misma dosis de androgenos aplicados en diferentes días del llamado periodo crítico, han demostrado que, la aplicación, a ratas y ratones hembras, de 1.25 mg de propionato de testosterona (TP) en los días 2o. 5o. 10o. y 20o.; de edad provocarán los siguientes cambios: 100% de los animales mostraron androgenización completa, con esterilidad y estro persistente, cuando la aplicación se realizó en los días 2o. y 5o.; 40% de los animales mostrarán androgenización total o parcial cuando la TP fue aplicada en el día 10o., de vida y finalmente ausencia casi total de efecto en los animales inyectados a los 20 días de edad (Barraclough, 1967). De estos experimentos se concluyó que el periodo crítico en los ratones, y en las ratas, se extiende del nacimiento al día 10o. de edad, siendo los animales más susceptibles entre el día 2o. y el 5o.

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

Se ha observado, los siguiente efectos en ratas hembras androgenizadas neonatalmente:

- 1.- La administración de TP durante los primeros 3 días de vida inhiben o demora la apertura vagina, en contraste, la administración durante los siguientes días puede provocar apertura vaginal precoz.

- 2.- El contenido de gonadotropinas hipofisarias y secreción de gonadotropina son disminuidas en hembras altamente androgenizadas.
- 3.- La androgenización de ratas hembra neonatales muestran un incremento en el desarrollo corporal.
- 4.- La fijación de oestrol en el hipotálamo medio y anterior es significativamente reducida en ratas hembras androgenizadas.
- 5.- La ovulación puede ser inducida en las ratas hembras androgenizadas por la administración de gonadotropinas, un efecto similar fue observado por la estimulación eléctrica del hipotálamo.
- 6.- Los ovarios de ratas hembras androgenizadas muestran incremento en la producción de andrógenos.
- 7.- Una sola aplicación de TP en los primeros días de vida causa cambios permanentes del metabolismo en el hígado y en la glándula pituitaria (Dorner, G. 1981).

## MATERIAL Y METODOS

Se trabajaron con ratas Wistar, hembras y machos de tres diferentes edades.

1.- Ratas con 5 días de edad.

2.- Ratas con 40 días de edad o púberes.

Las ratas hembras presentaron apertura vaginal y fueron intactas.

3.- Ratas con 120 días de edad o ratas adultas.

Las ratas hembras fueron intactas.

Estas ratas fueron obtenidas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Las condiciones a las que estuvieron sometidas son condiciones estándar de bioterio, alimento y agua ad libitum.

Se trabajaron en grupos de 20 ratas de cada edad, tanto hembras como machos, en donde a su vez, cada grupo se subdivide en 4 subgrupos ( de 5 animales cada uno).

Las ratas fueron decapitadas, el cerebro fué disecado y colocado sobre su superficie dorsal. Después de lavar brevemente con agua fría la superficie basal del hipotálamo, para quitar la sangre contaminante, se procedió a quitar el quiasma óptico y las meninges. En seguida se procedió a disecar el hipotálamo incidiendo en la parte frontal inmediatamente por delante del quiasma, en la parte posterior por delante del borde anterior del núcleo mamilar, lateralmente por las fisuras hipotalámicas y por arriba al nivel de la comisura anterior. El procedimiento habitual fue disecar el hipotálamo de cinco ratas, separar cada hipotálamo en dos mitades, cortando a través del infundíbulo y hacer una poza con cada grupo de cinco mitades, de manera que cada poza constituye un efectivo control de la otra, y dio seguridad a la realización de todas las determinaciones practicadas.

Cada una de las pozas constituidas por 5 mitades del hipotálamo fue pesada con una exactitud de décimas de mg en una balanza analítica Mettler, colocado en buffer PBSA y cortando en pequeñas piezas (aprox. de 1 mm<sup>3</sup>). Se centrifuga ligeramente, se decanta la solución sobrenadante y se agrega una solución de tripsina al 0.25% en CMF, manteniendo la relación de 1 ml de solución de tripsina por cada 100 mg de tejido. La solución de tripsina debe prepararse siempre en el momento de usarse.

## PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

### CONTEO CELULAR

Se sacrificaron 20 animales de cada grupo, por dislocación cerebral, se realizaron grupos de 5 ratas. A cada rata se le extrae el cerebro, y se enjuaga con PBSA.

Una vez extraído el hipotálamo, se divide en dos partes, derecho e izquierdo, cada mitad se pesa y posteriormente se pasa a una solución de tripsina de 0.25% en CMF, una vez reunido los posos de 5 mitades derechas y 5 izquierdas, ambas por separado, se procede a incubar a 40C por 24 horas (Freshney Ian).

Una vez transcurrido el tiempo, se elimina la solución de tripsina, dejando únicamente la residual, y se incuba a 36.50C por una hora, pasado el tiempo, se centrifuga a 2500 rpm para obtener únicamente el paquetito celular, y se realizaron dos lavados, con un volumen 10 veces su peso.

Una vez realizado los dos lavados, el paquete celular del último lavado, se aforo a 1 ml. de PBSA y se realizó el conteo celular y la medición de viabilidad (Hugh J. Phillips, 1973).

El conteo se realizó en pipetas de glóbulos blancos siliconizadas (Linch, 1975), y se aforo hasta la marca de 0.5 con la suspensión celular y el último aforo de 1.0 se realiza con solución de azul tripan, se agitan mecánicamente 2 minutos, se procede posteriormente a contar las células (en donde las células teñidas con azul, son no viables, y las células no teñidas son viables).

## DETERMINACION DE DNA, RNA Y PROTEINAS

Para determinar las concentraciones de RNA, DNA y PROTEINAS se utilizaron grupos de 10 ratas hembras y machos de de 40 días y de 120 días, para las ratas de 5 días, se utilizaron grupos de 20 ratas tanto hembras como macho.

Se sigue la metodología inicial, de extracción del cerebro, disección del hipotálamo, pesada. Posteriormente se realiza las pozas 5 mitades de hipotálamo en 1 ml. de solución de PBBA, y se procede a homogenizar y seguir la metodología de Munro (1962), para la extracción de las fracciones donde se procedía a determinar DNA, RNA Y PROTEINAS.

# ESQUEMA DE TRABAJO

RATAS HEMBRAS Y MACHOS

SACRIFICADAS

DISECCION

CORTE ANTERIOR QUIASMA OPTICO

CORTE POSTERIOR CUERPOS MAMILARES

CORTE LATERAL SURCOS HIPOTALAMICOS LATERALES

CORTE SUPERIOR COMISURA ANTERIOR

DISGRAGACION CON TRIPSINA

FRIA (FRESHNEY 1971)

CONTEO DE CELULAS

MEDIR VIABILIDAD  
(HUGH 1973)

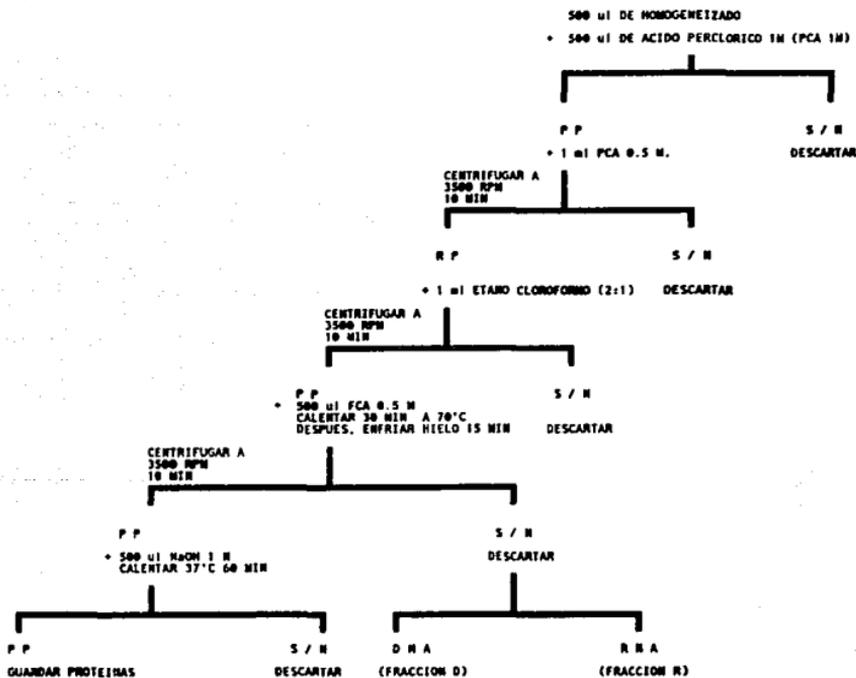
HOMOGENEIZAR

(MUNRO 1966)

DETERMINAR

DNA (GILES 1965) RNA (MEJBAUM 1939) PROTEINAS (LOWRY 195')

MECANISMOS DE LA EXTRACCION PARA DETERMINAR:  
 DNA RNA PROTEINAS  
 ( MUNRO 1966 ).



**EQUIPO UTILIZADO:**

- 1.- Espectrofotómetro Cary 219.
- 2.- Material de cristalería.
- 3.- B.M. A 37°C.

**REACTIVOS:**

- 1.- Solución de DNA 1.05 mg/ml. en ácido perclórico 0.5 M. (hidrolizado previamente a 70°C/15 min.).
- 2.- Ácido perclórico.
- 3.- Acetaldehído a 1.6 µg/ml.
- 4.- Difenilamina al 4% en ácido acético glacial.

**METODO:**

Se utilizó el método de Giles y Myers (1965).

**SOLUCION ESTANDAR**

Se utilizó una solución estándar de DNA a una concentración de 1 mg/ml en ácido perclórico, y se hidrolizó a 70°C por 15 min. Para que fuera utilizada en la curva estándar, se diluyó 1:10 para tener una concentración de 100 µg/ml.

Se utilizaron alícuotas de 40, 80, 120, 160, 200, µl. se aforaron a 200 µl. de ácido perclórico 1 M, se agitó, y se le adicionó 200 µl. de PCA 2M, se agitó, y posteriormente se le adicionó difenilamina, se agita y se tapan para incubar a B.M. a 37°C por 24 horas.

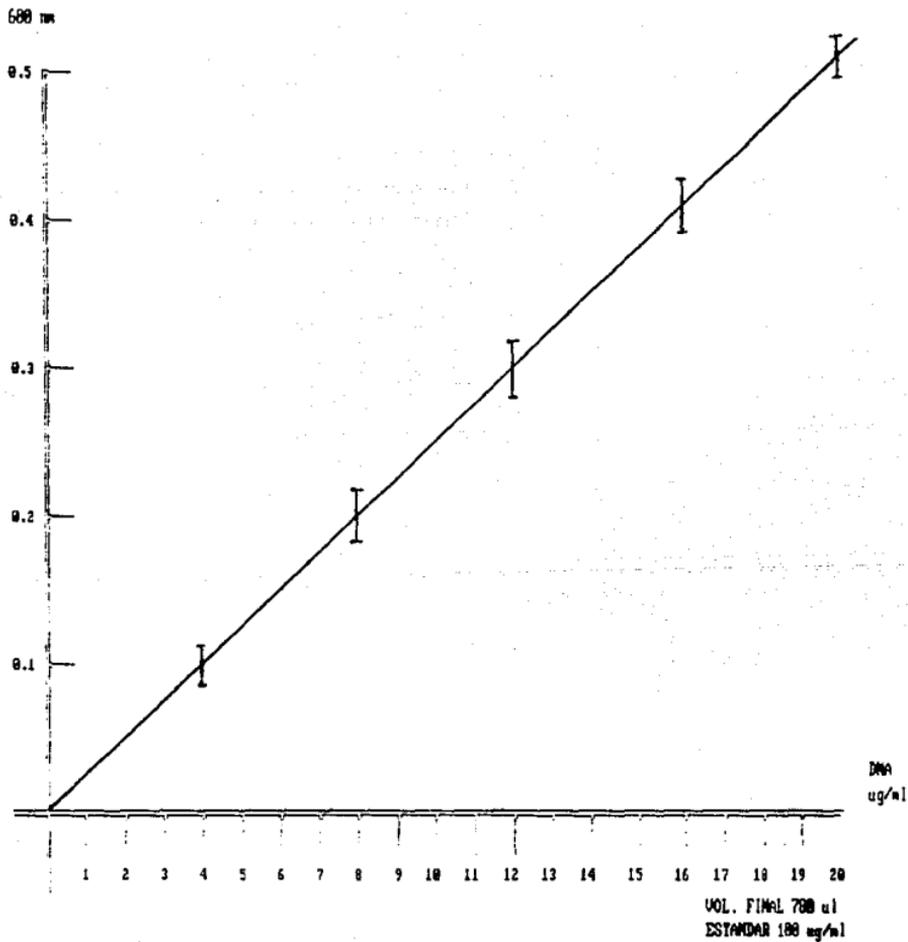
## SOLUCIONES PROBLEMAS:

Se tomarón alicuotas de la fracción D de la fig. 1 de 100 ul., se aforarón a 200 ul, con PCA 1 M, se agita, se le adiciona 200 ul. de PCA 2 M, se agita, se le adiciona 30 ul, de acetaldehido, se agita, se le adiciona 250 ul, de difenilamina, se agita y se tapan para incubar en B.M. a 37°C por 24 horas.

La curva se leyo, transcurrido el tiempo a una absorbancia a 600 nm. en un espectrofotómetro Cary 219.

# CURVA ESTANDAR DE D.N.A.

EF CARY 219.



## EQUIPO UTILIZADO:

- 1.- Espectrofotómetro Cary 219.
- 2.- Parrilla.
- 3.- Vortex.

## REACTIVOS:

- 1.- RNA. Se preparó una solución de 0.5 ug/ml. en ácido perclórico 0.5 M, se hidrolizó calentando a 70°C por 15 min., posteriormente se diluyó 1:5 para obtener una concentración de 100 ug/ml.
- 2.- Ácido perclórico 0.5 M.
- 3.- Acetato cáprico al 0.5% en ácido acético glacial.
- 4.- Orcinol al 1% en ácido clorhídrico concentrado. (prepararse al momento de usarse).

## METODO:

Se utilizó por el método de Mejbaum (1939).

## CURVA ESTANDAR

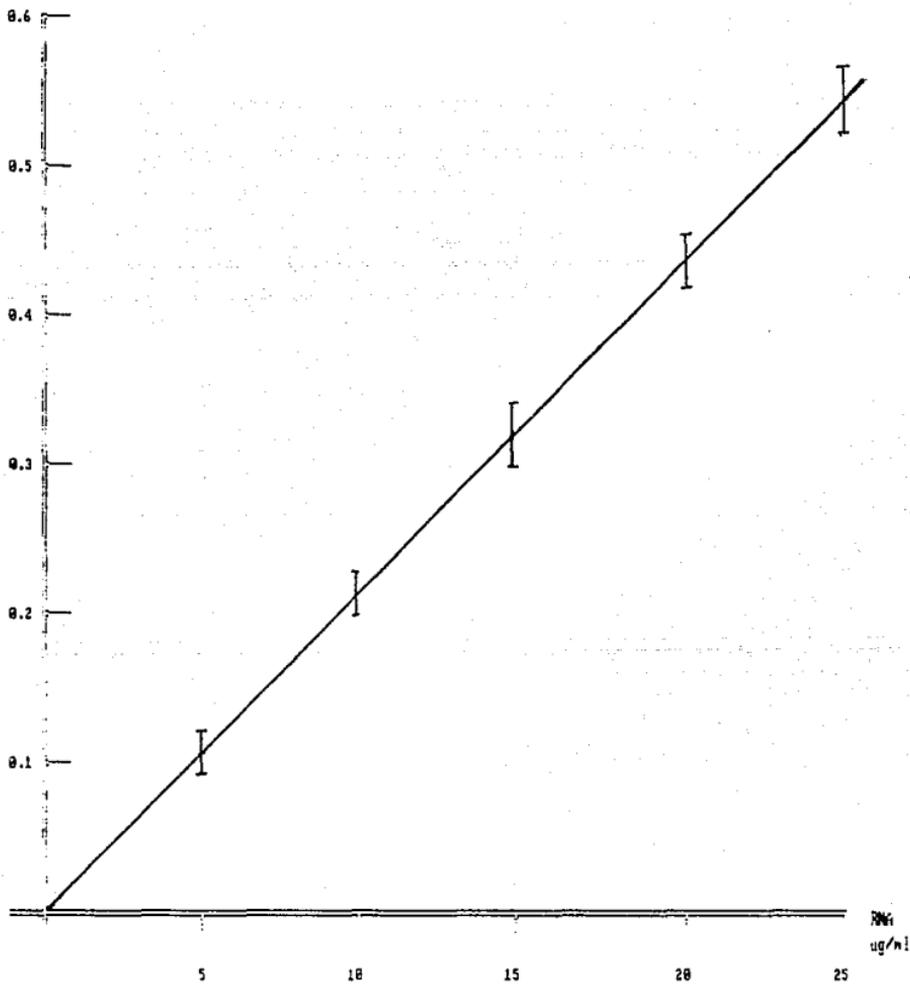
Se utilizó una solución estándar de RNA a una concentración de 100 ug/ml., se tomaron alícuotas de 50, 100, 150, 200 y 250 ul., se aforaron a 250 ul. de PCA 0.5 M, se agita, se adiciona 50 ul. de acetato cáprico, se agita y se adiciona la solución de orcinol en HCl al 10%, se calienta a 92°C por 20 minutos y se leyó a 660 nm.

## SOLUCIONES PROBLEMA

Se tomaron alícuotas de 50 ul. de la fracción R de la fig. 1, se aforaron a 250 ul. de 0.5M, se agita, se adiciona 50 ul. de acetatocáprico, se agita, y se adiciona la solución de orcinol, se calienta a 92 °C por 20 minutos, se leyó a 660 nm, en un espectrofotómetro Cary 219.

Lectura E.F.  
CARY 219 a  
668 nm

# CURVA ESTANDAR DE RNA



vol. final = 700 ul  
ESTANDAR 100 ug/ml

## PROTEINAS

### EQUIPO UTILIZADO:

- 1.- Espectrofotómetro CARY 219.
- 2.- Material de critaleria.

### REACTIVOS:

- 1.- Solución A:  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%  
Tartrato de sodio y potasio al 0.02%  
NaOH al 0.1%
- 2.- Solución B:  
CuSO<sub>4</sub> al 0.5%
- 3.- Solución C:  
Mezclar 50 partes de sol. A por 1 parte de sol. B.
- 4.- Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:3

### METODO:

Se utilizó el método Lowry, (1951)

### SOLUCION ESTANDAR.

En la curva, se utilizó como estándar albúmina de suero bovino a una concentración de 1 mg/ml en agua desionizada. La curva de calibración se realizotomando alícuotas de 10, 20, 30, 40 ul, llevado a 200 ul. de agua desionizada, se le adiciona 500 ul, de sol. C, se gita inmediatamente y se deja reposando 10 min., posteriormente se le adiciona 50 ul, de sol. D, mezclando inmediatamente y se espera 20 min.

La solución colorida se leyó a 550 nm en un espectrofotómetro Cary 219, ajustandose el aparato a cero de absorbarcia con un blanco.

## SOLUCION PROBLEMA.

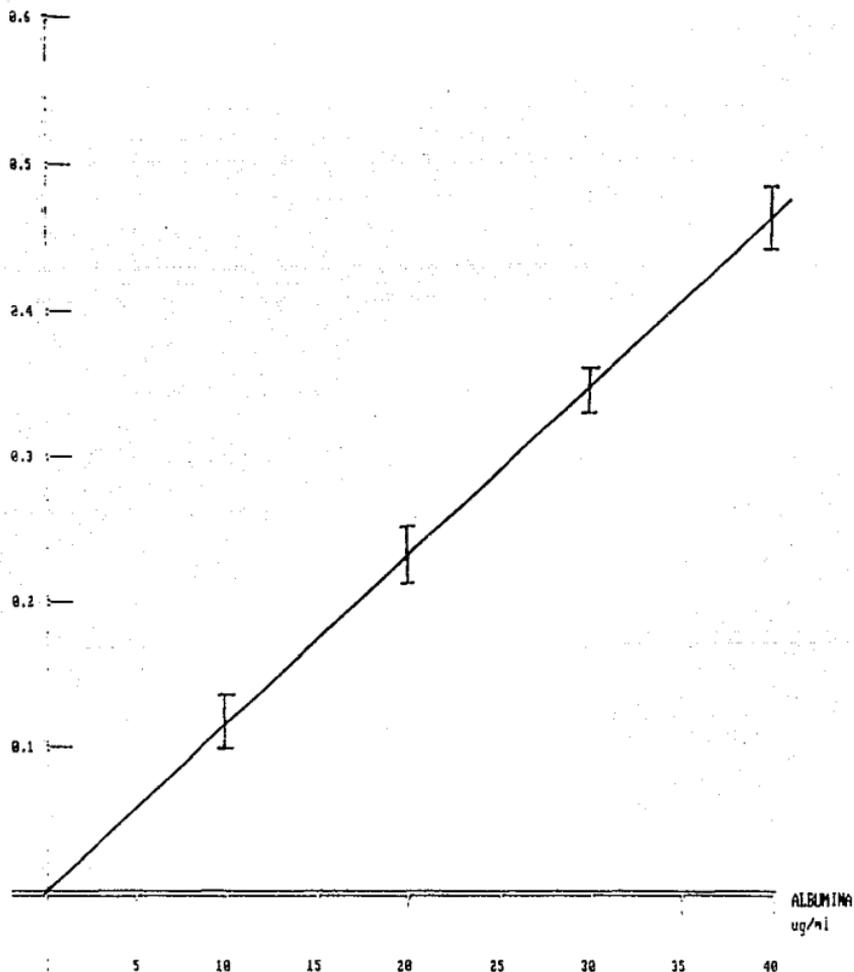
Se tomarón 5 ul. de la fracción P, se llevaron a un volúmen de 200 ul, de agua desionizada, se le adicionó 500 ul. de sol. C, se agita, y se deja reposar 10 min., posteriormente se le adicionó 50 ul. de sol. D, mezclando inmediatamente, y se esperó a 20 minutos para ser leída en las mismas condiciones que la curva estándar.

# CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS

LECTURA EN E.F.

CARY 219 a

558 m



vol. final = 750  $\mu\text{l}$   
ESTANDAR 1  $\mu\text{g/ml}$

ESQUEMAS REALIZADOS PARA DETERMINAR EL RENDIMIENTO DE  
LA TECNICA DE EXTRACCION PARA LA DETERMINACION DE  
ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS

ESQUEMA No. 1.

2 HIPOTALAMOS  
100 ul DE HEPARINA  
900 ul DE BUFFER



SE HOMOGENIZARON Y SE TOMARON ALICUOTAS DE 500 ul  
PARA REALIZAR TODA LA SECUENCIA DE EXTRACCION PARA  
DETERMINAR ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS.  
( MUNRO 1965 ).

FRACCION  
1a.

ESQUEMA No. 2.

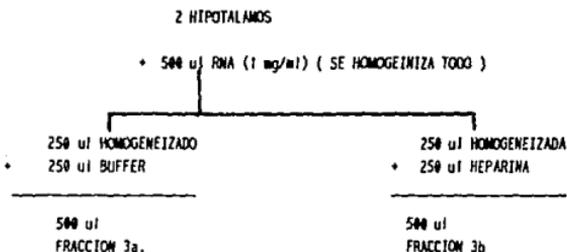
2 HIPOTALAMOS  
+ 1 000 ul BUFFER



SE HOMOGENIZARON Y SE TOMARON ALICUOTAS DE 500 ul  
PARA REALIZAR TODA LA SECUENCIA DE EXTRACCIONES  
PARA DETERMINAR ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS  
( MUNRO 1965 ).

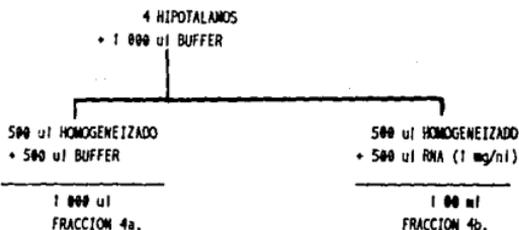
FRACCION  
2a.

ESQUEMA No. 3.



SE TOMARON LAS ALICUOTAS DE 500  $\mu$ l. PARA REALIZAR TODA LA SECUENCIA DE EXTRACCIONES PARA DETERMINAR ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS

ESQUEMA No. 4.

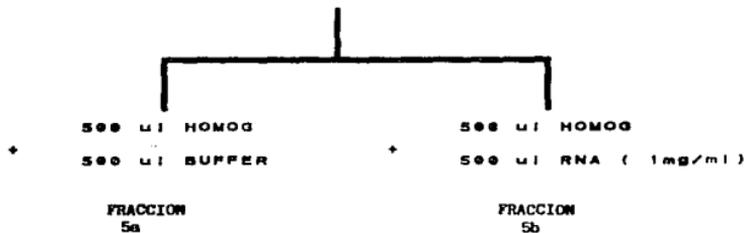


SE TOMARON LAS ALICUOTAS DE 500  $\mu$ l DE CADA FRACCION PARA REALIZAR TODA LA SECUENCIA DE EXTRACCIONES PARA DETERMINAR ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS

ESQUEMA No. 5

4 HIPOTALAMOS

+ 1 000 HEPARINA EN BUFFER (1:5)



SE TOMARON LAS ALICUOTAS DE 500 ul. DE CADA FRACCION  
PARA DETERMINAR ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS

6 HIPOTALAMOS

+ 1 000 ul HEPARINA EN BUFFER (1:5)

HOMOGENEIZAR

500 ul HOMOGENEIZADA  
+ 500 ul BUFFER

500 ul HOMOGENEIZADA  
+ 500 ul HEPARINA 1:2.5

500 ul  
+ 500 ul BUFFER

500 ul  
+ 500 ul RNA

500 ul  
+ 500 ul BUFFER

500 ul  
+ 500 ul RNA

1 000 ul

1 000 ul

1 000 ul

1 000 ul

FRACCION 6a.

FRACCION 6b.

FRACCION 6c.

FRACCION 6d.

SE TOMARON 500 ul DE CADA FRACCION PARA  
REALIZAR TODA LA EXTRACCION, PARA MEDIR  
ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEINAS

ESQUEMA No. 6.

## RESULTADOS

Ha sido previamente descrito que el manejo del tejido encefálico modifica los resultados obtenidos al determinar la concentración de ácidos nucleicos (May y Grenell, 1956). Es inicialmente importante el eliminar, hasta donde sea posible, la contaminación con sangre, para ello es aconsejable lavar con agua fría, de manera de provocar la lisis de los eritrocitos y por lo tanto facilitar su eliminación. Ha sido también descrito que la presencia de una actividad alta de 5'-nucleotidasa y de ribonucleasa (Palladin y Waelach, 1955) produce degradación del ARN y por lo tanto resultados que serán menores que los reales.

Esto debe tenerse tanto más en cuenta, cuanto ha sido demostrado que los niveles de estas enzimas son particularmente altos en el cerebelo y en el hipotálamo (May y Grenell, 1956). Muestras de cerebelo y de hipotálamo que son almacenadas en el congelador, aún a -200C, tienen significativamente menor cantidad de ARN que las muestras procesadas frescas. Nuestros resultados preliminares, realizados con el fin de establecer correctamente nuestra metodología, demostraron que el contenido de ARN del hipotálamo se reducía casi un 50% después de almacenarlo a -200C durante una semana. Aún después de la precipitación con ácido perclórico una disminución del 15% en la concentración de ARN del hipotálamo podía ser observada.

Para evitar esta pérdida del ARN se decidió procesar el tejido no más tarde del siguiente día de sacrificadas las ratas y agregar un inhibidor de la ribonucleasa al buffer en el cual se realiza la homogenización (se utilizó heparina), de esta manera pudo lograrse la determinación de la cantidad real de ARN presente en el tejido hipotalámico, el establecimiento de esta metodología requirió la práctica de cuidadosos estudios de recuperación de ARN agregado exógenamente. Nuestros resultados finales aseguran que la recuperación del ARN es consistentemente mayor al 95% (Tabla I).

Para la determinación de ADN y de proteínas, las pruebas de recuperación y estabilidad, realizadas de la misma manera, no mostraron ningún cambio después de una semana de congelación, por lo cual estas determinaciones pudieron ser realizadas algunos días después de obtenidas las muestras.

En la figura 1, pueden apreciarse los cambios que experimenta el peso húmedo del hipotálamo durante el crecimiento de la rata. Puede observarse que las ratas machos recién nacidas poseen un

hipotálamo significativamente mayor que las hembras, pero que esta diferencia se anula durante el crecimiento de manera que a los cuarenta días ya no existe ninguna diferencia en el peso del hipotálamo entre las hembras y los machos. Esto indica que el hipotálamo de las hembras tiene una velocidad de crecimiento mayor que el de los machos lo cual puede apreciarse en la figura 1, ya que en las hembras el peso del hipotálamo prácticamente se duplica entre los 5 y los 120 días de edad. Debe decirse que el peso del hipotálamo del animal adulto ha sido reportado por otros investigadores (May y Grenell, 1956) igual a 40 mg de peso húmedo, en nuestros resultados el peso del animal adulto, considerando todos los animales estudiados, machos y hembras, fue de 34.5 +/- 2.2 mg.

La determinación del número de células por conteo en un hemocitómetro ofreció al principio algunas dificultades, fundamentalmente por la presencia de las ramificaciones de las neuronas, no obstante, un entrenamiento adecuado y la realización de la cuenta utilizando un microscopio de contraste de fases, permitió realizar con bastante seguridad el conteo, como lo demuestra la escasa variabilidad encontrada en el conteo celular de las mitades hipotalámicas las cuales como ya dijimos, fueron procesadas por separado.

El número de células hipotalámicas, obtenidas por conteo directo del tejido disociado con tripsina (Figura 2), mostró un número mayor de células en el hipotálamo del macho a los 5 y a los 40 días de edad. A los 120 días de edad, el número de células no fue diferente estadísticamente entre los machos y las hembras. Lo más importante de los datos parece ser el aumento en el número de células observado en los machos entre los 5 y los 40 días de edad y en las hembras, en las cuales el número de células del hipotálamo no dejó de aumentar hasta después de los 40 días de edad. Nuestros datos parecen un poco más altos que los referidos alcanzan los 20 millones de células por hipotálamo.

En apoyo a nuestros resultados podemos decir, que cuando el contenido de ADN se utiliza para calcular el número de células en el hipotálamo, tomando como referencia la cantidad de 6.5 pg de ADN por células (May y Grenell, 1956) y la cantidad de ADN por hipotálamo en el animal adulto de 113 +/- 10.5 ug. nos da, aproximadamente, 18 millones de células por hipotálamo, lo cual está bastante cerca del número obtenido por observación directa.

Es necesario observar, así mismo, que la concentración de ADN fue también mayor en los machos que en las hembras a los 5 días y a los 40 días de edad, sin que exista ninguna diferencia significativa a los 120 días de edad. Sin embargo, también es

necesario señalar que no se encontró ninguna diferencia, que fuera estadísticamente significativa, en la concentración de ADN del hipotálamo dentro de un mismo sexo en las diferentes edades (Fig. 3), lo cual contrasta claramente con el conteo celular realizado bajo el microscopio.

En la figura 4 puede observarse que la concentración de ARN sólo fue diferente entre hembras y machos a los 40 días de edad. Esta misma diferencia fue observada en la concentración de proteínas, la cual fue bastante mayor en el macho que en la hembra a los 40 días de edad. Estos resultados son llamativos porque indican una mayor actividad metabólica del hipotálamo en el macho cuando a los 40 días, recién iniciada la pubertad, uno podría esperar lo contrario. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que ha sido descrito que la testosterona estimula la síntesis de ARN mensajero en el hipotálamo (Park y col. 1988), también debe recordarse que una de las principales acciones de los estrógenos parece relacionarse más con la estabilización del mensajero existente (Brock y Shapiro, 1983), que con su síntesis.

Las figuras 4 y 5 también indican la importante disminución en la concentración de ARN y proteínas que se observa en el animal adulto, así como la ausencia de diferencias significativas en la concentración de estos parámetros en las ratas adultas y en las de 5 días de edad.

Las relaciones ARN/DNA (fig. 7) y ARN/Proteínas (fig. 6) que nos hablan de la actividad sintética y funcional del hipotálamo, expresan con claridad las escasas diferencias encontradas entre machos y hembras en estos importantes parámetros, lo cual indica que, a pesar de notables diferencias en otros parámetros la actividad funcional, por célula, del hipotálamo es aproximadamente igual en los animales de ambos sexos. Esto hace que las diferencias encontradas tengan mayor importancia fisiológica. Así podemos observar que en los animales de 5 días de edad las células hipotalámicas de las hembras son más activas metabólicamente que las células del macho (Fig. 7), a pesar de que esta diferencia se pierde a los 40 y 120 días de edad, mientras que en la relación de RNA/PROT, (fig. 6), se ve disminuida a los 40 días y se ve favorecida, a los 120 días.

RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DE RNA DE LA TECNICA PARA EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS  
Y PROTEINAS

FRACCION	1a.	2a.	3a.	3b.	4a.	4b.	5a.	5b.	6a.	6a'	6b.	6b'
CONCENTRACION DE RNA (mg/g tej.).	2.55	2.46	3.79	3.81	2.72	5.80	2.08	4.27	1.82	3.27	1.35	3.88
1 SEMANA DESPUES	1.07	1.10	-	-	1.64	2.32	1.05	1.90	0.94	2.33	0.86	2.45
PORCENTAJE DE VARIACION	57.82	55.19	-	-	40.5	60.85	49.43	54.18	49.3	29.68	36.32	38.16
CONCENTRACION DE DNA (mg/g tej.).	0.84	0.95	0.28	0.37	0.53	0.76	0.50	0.56	0.57	0.54	0.54	0.61
1 SEMANA DESPUES	0.43	0.36	-	-	0.44	0.33	0.28	0.35	0.40	0.31	0.52	0.50
PORCENTAJE DE VARIACION	37.98	61.18	-	-	16.7	55.9	43.52	38.25	28.36	42.51	6.0	28.86
CONCENTRACION DE PROTEINAS (mg/g tej.).	77.89	26.6	11.94	24.92	29.78	40.2	30.16	14.7	27.63	19.14	25.06	22.51
1 SEMANA DESPUES	37.81	33.66	-	-	33.09	39.35	24.51	21.99	28.65	26.1	20.47	26.61
PORCENTAJE DE VARIACION	+34.54	+26.25	-	-	+11.1	+2.24	18.76	+49.65	+3.72	+36.36	17.46	+18.2

Para realizar esta parte del estudio se utilizaron ratas macho adultas.

La solución de RNA utilizada para este proceso tenía una concentración de 1.01 mg/ml.

**PESOS DE LOS HIPOTALAMOS EN RATAS  
(DIFERENTES EDADES)**

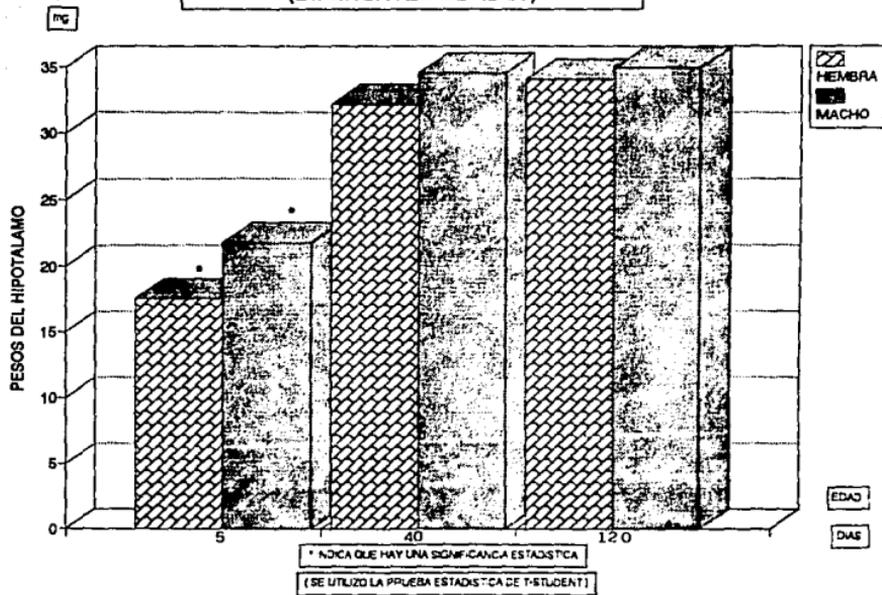


Fig. 1

NUMERO DE CELULAS DE HIPOTALAMO EN RATAS A DIFERENTES EDADES

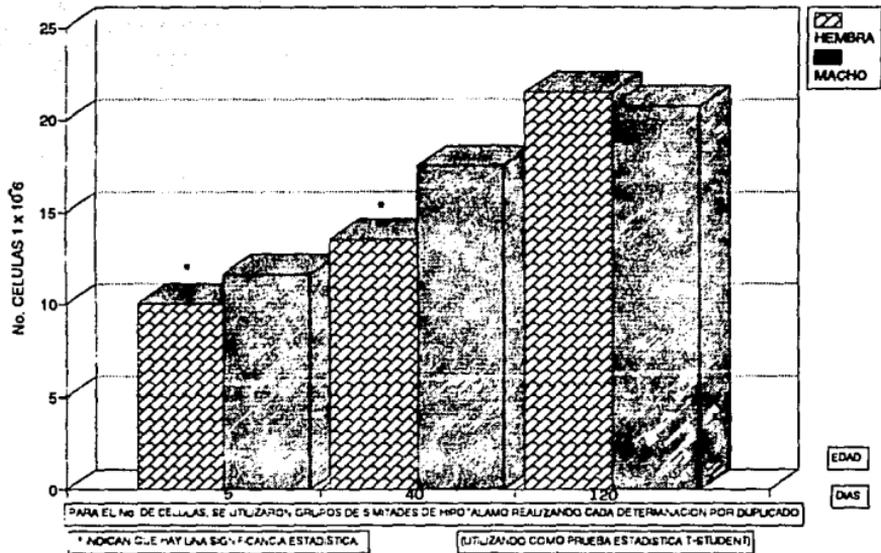


Fig. No. 2

**CONTENIDO DE DNA EN CELULAS DE HIPOTALAMO EN RATAS (DIFERENTES EDADES)**

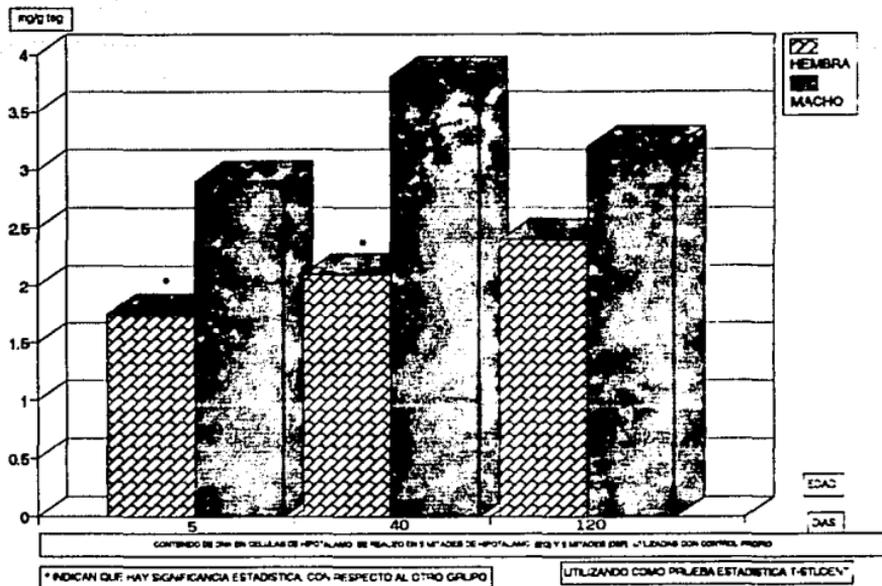


Fig. No. 3

**CONTENIDO DE RNA EN CELULAS DE HIPOTALAMO EN RATAS (DIFERENTES EDADES)**

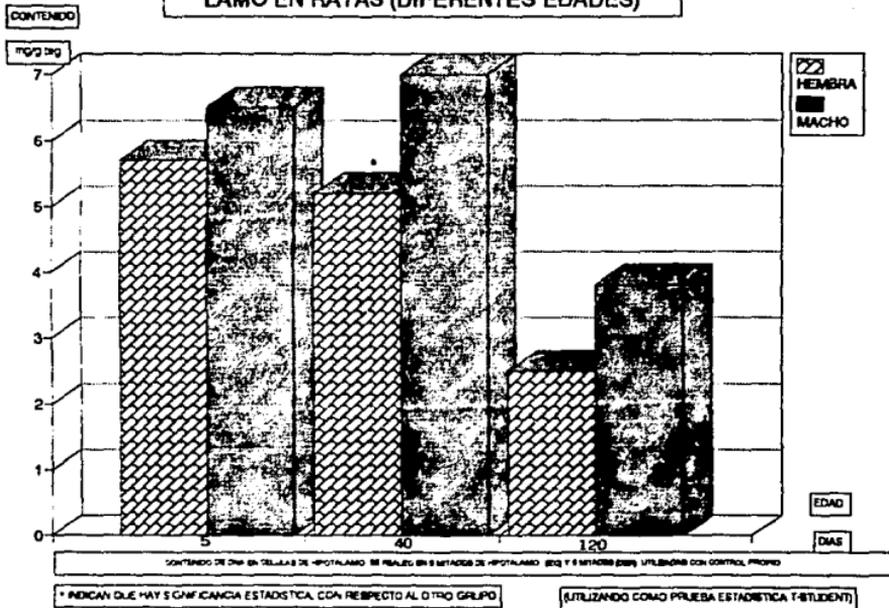


Fig. No. 4

**CONTENIDO DE PROTEINAS EN CELULAS DEL HIPOTALAMO EN RATAS (DIFERENTES EDADES)**

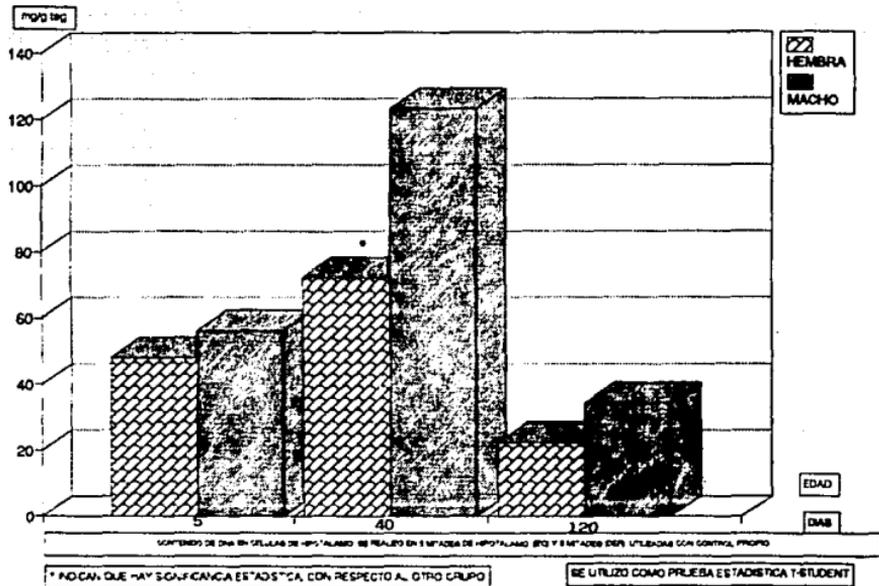


Fig. No. 5

RELACION RNA/PROTEINAS DE HIPOTALAMO  
EN RATAS (DIFERENTES EDADES)

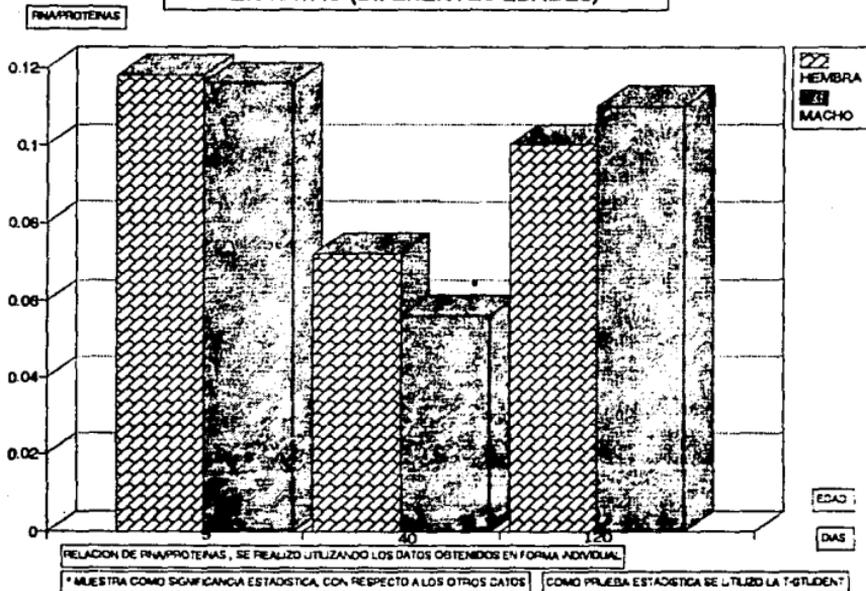


Fig. No. 6

RELACION DE RNA/DNA EN CELULAS DEL HIPOTALAMO EN RATAS (DIFERENTES EDADES)

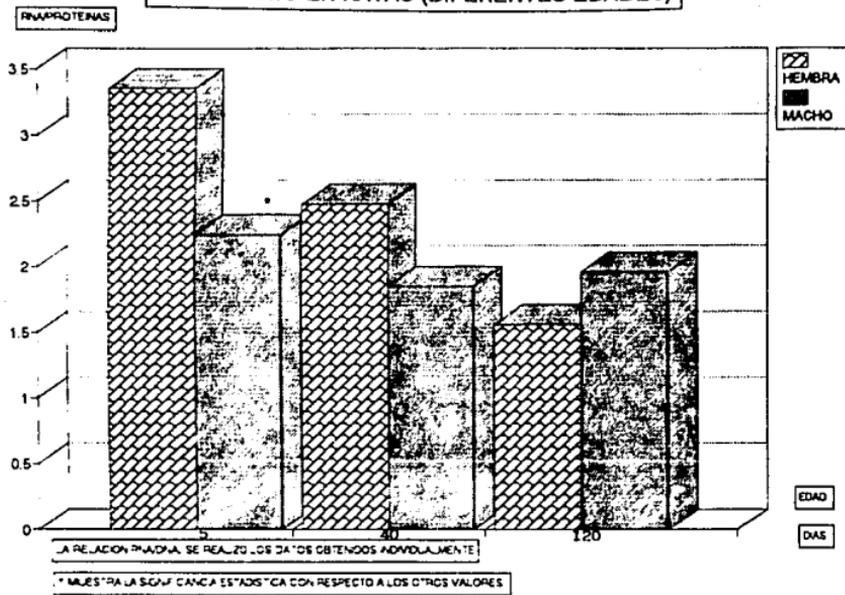


Fig. No. 7

## DISCUSION

Hemos ya revisado con anterioridad los numerosos trabajos de investigación que han precisado, sin lugar a dudas, el papel crítico que desempeña el ambiente hormonal, específicamente los andrógenos en condiciones normales, como factores de la diferenciación de un sustrato inherentemente femenino, a un cerebro e hipotálamo funcionalmente masculinos. Sin embargo, a pesar de la existencia de numerosos datos experimentales, no hay el mismo entendimiento acerca del mecanismo de acción de estas hormonas para provocar dicho efecto. Sorprendentemente, al revisar la literatura relacionada es difícil encontrar estudios que marquen un sustrato básico de conocimientos sobre los cuales sea después difícil estructurar una hipótesis sobre dicho mecanismo de acción.

En efecto, sorprende que existan teorías que elaboran, como veremos después, sobre el número de células en determinados núcleos, sobre la conectividad dendrítica de las células del hipotálamo o sobre el efecto que la síntesis de macromoléculas tienen sobre el proceso y que no sea posible encontrar referencias sobre algunos parámetros básicos que señalen si existen diferencias en el desarrollo del hipotálamo femenino y masculino durante el mencionado período crítico de la diferenciación sexual hipotalámica, tales como: diferencias en peso, diferencias en número de células, constitución bioquímica, actividad funcional general, etc.

Debemos empezar por considerar que existe una diferencia pequeña, pero significativa, en el peso del hipotálamo en los animales de 5 días de edad (fig. 1). En efecto, el macho posee un hipotálamo levemente mayor (21,7 +/- 1.6 mg) que la hembra (17.5 +/- 2.0 mg). Este dimorfismo sexual, que estaría perfectamente de acuerdo con lo sugerido por Gorski (1979) y por otros investigadores (Tobet y col, 1986), ha sido pasado por alto debido, sin lugar a dudas, a la falta de experimentación sobre este importante parámetro. Cuando se considera el animal adulto, en el cual este tipo de determinación se ha hecho con frecuencia (May y Gredell, 1956; Murnberger y col. 1956), ya no se encuentra ninguna diferencia, como puede ser también observado en los resultados presentados en esta tesis (fig. 1).

Existen pocos trabajos que traten sobre la evaluación de los parámetros bioquímicos basales del hipotálamo y aparentemente, ninguno solo que haya tratado de establecer los cambios que suceden en estos parámetros basales como consecuencia de la

diferenciación sexual de este órgano. Sin embargo, es posible correlacionar nuestros resultados con los de algunos otros investigadores, de manera de validar nuestra metodología. Murnberger y Gordon (1957) encontraron que el número de células del hipotálamo de la rata adulta, calculada con base en el contenido de ADN, fué de  $14.5 \times 10^6$ , nuestros resultados indican un número de células de aproximadamente  $21.5 \times 10^6$  en el animal adulto y de aproximadamente  $10 \times 10^6$  en el animal de 5 días de edad. Resultados similares han sido reportados también por May y Grenell (1956) en la rata adulta. Para estos datos se utilizó un equivalente de  $65 \times 10^{-8}$  ug de ADN-P por célula (Gray y de Luca, 1936).

La relación ARN/ADN del hipotálamo de la rata adulta ha sido reportada por May y Grenell (1956) igual a  $1.9 \pm 0.7$ , nuestros resultados indican para este mismo parámetro, en el animal adulto,  $1.95 \pm 0.20$  para el macho y  $1.55 \pm 0.15$  para la hembra, esta diferencia fue estadísticamente significativa. La concentración de ADN del hipotálamo encontrada por estos mismos autores, a pesar de la diferente metodología usada y del diferente sistema de cálculo caen dentro de la dimensión de los valores encontrados por nosotros.

Esta bien establecido que el peso promedio del cerebro es mayor en el hombre que en la mujer y que el peso del cerebro no puede ser fácilmente correlacionado con el peso corporal o con la estatura. Una diferencia semejante ha sido precisada en el caso del peso del cerebelo en el hombre, así como en el caso de la médula espinal en el gato. (Calaresti y Henry, 1971). Diferencias más localizadas han sido precisadas en los núcleos relacionados con el canto en las aves (Nottebohm y col. 1976) y en el caso de los centros eyaculatorios de la médula espinal en las ratas (Breedlove y Arnold, 1980). Es pues posible admitir que existen diferencias significativas, dependientes del sexo, en algunos parámetros basales como peso y tamaño de algunas estructuras encefálicas.

Aunque estas diferencias se han encontrado fundamentalmente en animal adulto, no parece que haya habido mucho interés por estudiar si durante el desarrollo también se presentan este tipo de diferencias con relación al sexo. Nuestros resultados indican que existe una diferencia significativa en el peso del hipotálamo entre los individuos de sexo masculino y femenino que puede ser encontrada solamente en los animales de 5 días de edad, pero que desaparece al llegar a la edad adulta (Fig. 1).

Para explicar estas diferencias en peso y volumen deben tomarse en consideración por lo menos los siguientes cuatro factores: (i) diferencias en el número de neuronas, (ii) diferencias en el

volumen de las neuronas, (iii) la existencia de números diferentes de células gliales, y (iv) una diferencia en el desarrollo de las dendritas, factor que es considerado dentro de la razón neuropila/pericarión.

En el caso del cerebelo humano (Jerison, 1969) y de la médula espinal del gato (Caleresti y Henry, 1971) ha quedado bien demostrado que las diferencias en peso y volumen son debidas fundamentalmente a la presencia de un mayor número de células en el macho que en la hembra. Nuestros resultados indican que este también sería el factor determinante en el caso del hipotálamo de las ratas recién nacidas. En la figura 2 queda demostrado que el número de células del hipotálamo en el macho de 5 y 20 días de edad es significativamente mayor en el macho que en la hembra.

Estos resultados obtenidos por cuenta directa del número de células en hipotálamos disociados por tratamiento con tripsina, fueron confirmados después por la determinación del contenido de ADN de los hipotálamos aislados. Esta determinación demostró que la cantidad de ADN por gramo de tejido hipotalámico es significativamente mayor en el macho que en la hembra (figura 3).

Puesto que la metodología empleada hace difícil o, en el caso de la determinación de ADN, imposible distinguir con precisión neuronas de microneuronas y aún de células gliales, nuestros resultados no pueden precisarse con seguridad que tipo de células es el que se encuentra en mayor número en el hipotálamo de las ratas recién nacidas pero los resultados son concluyentes para señalar que una diferencia importante, observable en el llamado período crítico, y que por lo tanto puede ser relacionada con la diferenciación sexual del hipotálamo, es un número mayor de células en el hipotálamo del macho.

Nuestros resultados están de acuerdo con el creciente número de observaciones que indican la presencia de diferencias sexuales en la morfología del sistema nervioso central (Gorski, 1979; MacLusky y Naftolin, 1981). Estas diferencias son sobre todo notables en el caso del sistema nervioso que controla el canto en las aves, en el cual los 5 núcleos involucrados son notablemente mayores en el macho que en la hembra. (Nottebohm y Arnold, 1976). El grupo de Gorski (Christensen y Gorski, 1978; Gorski y col. 1978; Gorski, 1979) ha señalado la existencia de diferencias fácilmente reconocibles en algunas estructuras hipotalámicas entre los animales machos y las hembras. Este fenómeno, que comprende fundamentalmente el área anterior del hipotálamo y el área preóptica, ha sido llamado dimorfismo sexual hipotalámico. Estos autores han encontrado que a partir del nacimiento puede observarse un aumento en el número y el tamaño de las neuronas de esta área en la rata macho, continuando durante los primeros 10-15 días de edad.

La observación de células nerviosas en mitosis es poco frecuente, si acaso existe, en el animal adulto. Por esta razón se ha considerado que la neurogénesis termina antes del nacimiento. Este es un principio que ha sido dominante en el pensamiento anatómico desde hace mucho tiempo, a pesar de que ahora se sabe que el número de células de algunas estructuras encefálicas continúa creciendo por tiempos variables después del nacimiento. Se sabe, por ejemplo, desde los trabajos de Cajal, que un tipo de neuronas pequeñas, las llamadas células granulosas, muestran una gran actividad mitótica en los animales jóvenes. Se conoce igualmente, desde principios de este siglo, que el número de células nerviosas de la corteza cerebral en la rata aumenta notablemente después del nacimiento. Este fenómeno se prolonga hasta el día 20 de vida.

Más recientemente (1965), Altaman y Das, encontraron por estudios autoradiográficos, utilizando timidina marcada con tritio, que una gran proporción de las células nerviosas de axones cortos presentes en varias estructuras encefálicas se forman después del nacimiento en las ratas. Estos autores encontraron que las microneuronas de algunas regiones aparecen particularmente marcadas con el isótopo, entre estas regiones se encuentran el giro dentado del hipocampo, en los núcleos relacionados con la función olfatoria, el cerebelo y algunos núcleos del área hipotalámica.

Los experimentos de Gorski y sus colaboradores (Christensen y Gorski, 1978; Gorski 1979), también indican el aumento en el número de neuronas de áreas particulares del hipotálamo que pueden prolongarse hasta el día 10-15 de la vida extrauterina. Sin embargo, debe señalarse que los cambios demostrados por este grupo de investigadores han sido también relacionados con la migración o rearrreglo de células pre-existentes. Esta última conclusión se ha basado en los estudios de Weiz y Ward (1979), quienes demostraron que la incorporación de timidina tritiada en el área preóptica hipotalámica termina alrededor del día 20 del embarazo y por lo tanto antes del nacimiento (MacLusky y Naf-tolin, 1981).

Nuestros resultados (Fig. 2) indican que, después del nacimiento, el hipotálamo parece tener un aumento significativo en el número de células. Este aumento es particularmente notable en el macho entre los días 5 y 20 de edad; durante este período el número de células aumenta de  $11.6 \times 10^6$  por hipotálamo a los 5 días de edad, hasta  $17.5 \times 10^6$  células a los 40 días de edad, este número de células permanece constante hasta la edad adulta. Un aumento semejante se observa en las hembras, aunque en este caso, el aumento en el número de células parece ser más lento y prolongarse más allá del día 40 de vida, puesto que el número de células del adulto sólo se alcanza después de esta edad. Es

notable el hecho de que este aumento en el número de células del hipotálamo, obtenido por cuenta directa de las células disociadas por tratamiento con tripsina, no concuerda con la concentración de ADN (Fig. 4), puesto que en este caso no existen diferencias significativas en la concentración de esta macromolécula, calculada por gramo de tejido. Es pues necesario aceptar que la síntesis de ADN necesaria para la multiplicación celular se lleva al cabo antes del día 5 de edad y que la mitosis se presenta tiempo después, tal vez bajo el estímulo hormonal adecuado. Tal conclusión es del todo aceptable si se considera que la poliploidia ha sido frecuentemente encontrada en neuronas. Resultados que pueden confirmar la anterior hipótesis han sido reportados por Dorner y Staudt (Dorner y Staudt, 1968; Staudt y Dorner, 1968; Dorner y Staudt, 1969; Staudt y Dorner, 1976).

Estos autores han demostrado, utilizando un método de carimetría sugerido por ellos (Dorner y Staudt, 1968) que: (i) los núcleos de las neuronas presentes en la región medial del área preóptica y en el núcleo hipotalámico ventromedial de las ratas hembras adultas son significativamente más grandes que los núcleos de las neuronas de las ratas machos adultas. En cambio, no hay ninguna diferencia entre el tamaño de los núcleos de las neuronas del núcleo dorsomedial del hipotálamo: (ii) las ratas machos castradas entre el día 14 y 22 de edad, es decir, después de que ha pasado el período crítico de la diferenciación hipotalámica, no mostraron ningún cambio en el tamaño de los núcleos hipotalámicos, arriba mencionados durante la edad adulta: (iii) las ratas machos castradas durante el primer día de edad demostrarán un aumento del volumen nuclear de las neuronas de los núcleos mencionados, de manera de alcanzar un tamaño semejante al de las ratas hembras: (iv) el efecto referido en el inciso anterior fué totalmente prevenido por la administración en el día 3 de vida de una sola dosis de 1.25 mg de propionato de testosterona. Dosis más pequeñas de PT (20 ug) tuvieron solo un efecto parcial en evitar el efecto de la castración previa: (v) de la mayor importancia fue el hecho de que se pudo establecer una correlación entre el volumen nuclear de las neuronas de estos centros hipotalámicos y la frecuencia de presentación de conducta sexual de tipo femenino. Es pues completamente posible que el volumen nuclear pueda ser correlacionado con la posible presencia de poliploidia de las neuronas femeninas, lo cual contribuiría a explicar la ausencia de diferencias en la concentración de ADN de las células hipotalámicas entre los animales machos y las hembras, a pesar de la presencia de una diferencia significativa en el número de células (Fig. 2 y 3). En la rata y el ratón recién nacidos la síntesis de ARN ocurre de una manera más efectiva en las cortezas del cerebro y el cerebelo, en las paredes de las vesículas del cerebro anterior, en el complejo talámico y en las áreas nucleares del sistema límbico (Mackinnon y col. 1969). En los primeros días de vida y hasta la pubertad nuevos centros de actividad sintetizadora de ARN aparecen, fundamentalmente en

el sistema extrapiramidal y en el hipotálamo (Mackinnon y col. 1969). Según estos autores, desde la edad neonatal hasta la edad senil, la síntesis de ARN disminuye en el cerebro como un todo. Esto está de acuerdo con los resultados de otros grupos (Hyden, 1967) que indican que la síntesis disminuye progresivamente desde la niñez hasta las últimas décadas de la vida en las neuronas motoras del cerebro humano y con los resultados de Richter (1958) y de Guroff y Udenfriend (1964), en los cuales la síntesis de proteínas es mayor y más rápida en el animal recién nacido que en el adulto.

Estos datos pueden ser correlacionados con nuestros resultados en los cuales puede verse (fig. 4) que el contenido de ARN del hipotálamo del macho aumenta un poco entre los días de edad (p-0.05) para después disminuir notablemente en el hipotálamo del animal de 120 días de edad. La conducta de la concentración de ARN en el hipotálamo de las hembras es diferente a la del macho en que en las hembras no existe ninguna modificación en el contenido de ARN entre los 5 y los 40 días de edad, sin embargo la disminución en el contenido de ARN de las hembras adultas, es probablemente, más importante que la observada en los machos, ya que llega a ser únicamente la mitad de la concentración encontrada en los animales de 5 días de edad (fig. 4).

Esta misma tendencia se encuentra cuando se consideran los cambios en la concentración de proteínas (fig. 5). Sin embargo en este caso se observó, en los animales de 40 días de edad, un aumento en la concentración de proteínas que fue significativo en los animales de ambos sexos, aunque fue mucho mayor en el macho.

Clayton y col. (1970) fueron los primeros en demostrar que la inyección de testosterona a ratas hembras recién nacidas produce una disminución significativa de la incorporación de uridina marcada con carbono 14 en la mayoría de las áreas encefálicas estudiadas, con dos notables excepciones, la amígdala y la región anterior del hipotálamo, en las cuales, por el contrario, la inyección de testosterona indujo un ligero aumento en la incorporación del sustrato marcado al ARN. De estos resultados los autores concluyen que uno de los efectos de la testosterona como regulador de la diferenciación hipotalámica es la inducción de un aumento en la síntesis de proteínas específicamente en las neuronas involucradas en este proceso. Kobayashi y Gorski (1970) observaron que la aplicación de actinomicina D o de Puromicina, conocidas como inhibidores de la síntesis de ARN o de proteínas, respectivamente, actúan de manera antagónica a los andrógenos durante la inducción de la diferenciación hipotalámica. Salaman (1974) demostró después que la administración de estos inhibidores, incluyendo el 5-fluorouracilo, era antagonista solo contra las dosis bajas de andrógenos (30 ug). Sin embargo la

Alfa-amanitina, que inhibe la síntesis solo de ARN mensajero, proporcionó una protección casi total, incluso contra dosis altas de testosterona (200 ug). Los inhibidores de la síntesis de ADN, hidroxiaurea, tuvieron un efecto semejante contra las dosis moderadas y altas de andrógenos.

Estos hallazgos sugieren que uno de los mecanismos de acción de los andrógenos durante la diferenciación sexual se ejerce al nivel de la traducción y la transcripción del mensaje genético, iniciando la secuencia de síntesis de ARN mensajeros específicos y por lo tanto la síntesis de las proteínas requeridas para la diferenciación posiblemente de enzimas, como la aromatasas (Morali y col. 1977), los receptores específicos para hormonas requeridos por las células hipotalámicas (MacLuski y McEwen, 1980), la síntesis de tubulina y/o actina necesarias para la transmisión del impulso nervioso (Dokas, 1983) o finalmente, la síntesis de receptores específicos para los neurotransmisores (Mendex y col. 1980). Estos resultados y esta hipótesis puede ser confirmados por nuestros resultados, ya que como hemos mencionado se observa en el macho entre los días 5 y 40 de edad, un aumento pequeño pero significativo en la concentración de ARN, acompañado de un aumento mucho más notable en la concentración de proteínas (fig. 4 y 5).

En suma, nuestros resultados estarían de acuerdo con alguno, o todos, los esquemas propuestos para explicar el mecanismo de acción de las hormonas esteroides como impulsoras de la diferenciación sexual del hipotálamo durante el llamado "período crítico". Estas teorías, que han sido recientemente revisadas por Gorski (1979), pueden agruparse en tres grupos, los cuales no deben ser considerados como mutuamente excluyentes:

a).- El efecto irreversible y permanente de las hormonas esteroides sobre la diferenciación del hipotálamo, sugirió desde un principio que la actividad de los esteroides debía realizarse a través de una verdadera reorganización de la estructura de los núcleos hipotalámicos involucrados. Este mecanismo que en principio pareció uno de los menos probables, ha sido apoyado por numerosas evidencias que apoyan la existencia de un dimorfismo sexual bien aparente, no solo en el tamaño y el número de células de algunos núcleos (Gorski, 1979; Staudt y Dörner, 1976), sino también en la estructuración de las ramificaciones dendríticas y en el número de conexiones establecidas por diferentes células durante el proceso de diferenciación (Torand-Allerand, 1980). En la actualidad, puede decirse que el dimorfismo sexual se manifiesta a varios niveles, desde las diferencias de tamaño y número de células reportados en este trabajo, hasta variaciones pequeñas en la organización (Raiman y Field, 1973) y en la

morfología de las sinápsis (Matsumoto y Arai, 1976).

b).- Modificación en la actividad metabólica de las neuronas del hipotálamo, particularmente relacionada con cambios en la respuesta a los esteroides hormonales. Varios investigadores han señalado diferencias en la captación de esteroides, número de receptores específicos, particularmente a estrógenos (MacLusky y col. 1980; MacLusky y McEwen, 1980). Esta acción deberá ser traducida finalmente por la acción genómica de los esteroides, induciendo síntesis de RNA y consecuentemente, de proteínas específicas, tales como la aromataza, que serán indispensables para la realización correcta de la diferenciación hipotalámica. Este efecto, para poder explicar la característica persistencia del efecto, deberá implicar el establecimiento irreversible de mecanismos de control de la síntesis de estos receptores o la síntesis de proteínas que modifiquen permanentemente el metabolismo del hipotálamo.

c).- Iniciación de una cascada fisiológica de características permanentes relacionada con los requerimientos de transmisión del impulso nervioso y su regulación. Este mecanismo requeriría la iniciación de la síntesis de algunas proteínas específicas, tales como la llamada S-100 (Stewart, 1975), la tubulina y la actina (Dokas, 1983), o los receptores a algunos neurotransmisores, tales como los sistemas adrenérgicos y colinérgicos. Por ejemplo ha sido descrito que la androgenización del hipotálamo de la rata hembra elimina definitivamente el ciclo de recambio de la dopamina que es tan característico de la hembra adulta (Gorski, 1979).

Para establecer el método más adecuado de disgregación de las células se hicieron experimentos utilizando varios métodos de incubación con tripsina.

Fueron dos los métodos de disgregación que se utilizaron para escoger finalmente uno. Uno de los métodos de disgregación fue el de tripsina caliente, que consistía en: se extrae el hipotálamo y se pica finamente, para posteriormente pasarlo a un matraz Erlen Meyer y se adiciona 10 ml. de tripsina al 0.25%. Se incuba 4 horas a 37°C con agitación en un agitador magnético a 200 rpm. Cada 30 minutos se dejarán sedimentar los fragmentos sustituyendo la solución de tripsina por una nueva solución hasta completar las 4 horas. Después de este tiempo se eliminará la tripsina por centrifugación a 500 g durante 5 min. De esta manera se obtendrá un paquete celular al cual se le determinará el porcentaje de

células viables por la tinción de azul tripan.

El otro método es el que se menciona en material y métodos, que consiste en incubar el tejido con solución de tripsina al 0.25% por 24 horas a 40C.

Se decidió escoger el método de tripsina fría, por que obteníamos viabilidad del 92% +/- 2.5 mientras que con la técnica de tripsina caliente obteníamos viabilidades del 83 +/- 3.8, además que nos permitía organizarnos perfectamente para sacrificar, extraer, disgregar las células, y 24 horas después hacer el el conteo celular y medir la viabilidad.

Para completar la disgregación provocada por la acción de la tripsina, el tejido hipotalámico fué cuidadosamente pipeteado hacia dentro y hacia afuera de una pipeta Pasteur, cuya punta estrechada hasta medir unos 500  $\mu$ m de diametro, había sido pulida por el calor. La suspensión celular se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos para obtener unicamente el paquete celular, el cual es lavado dos veces con PBSA, utilizando cada vez un volumen igual a 10 veces el peso inicial del tejido hipotalámico.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Altman, J. et. al. (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207, 953-956.
- 2.- Barraclough, C. A. and Gorski, R. A. (1961) Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68, 68-79.
- 3.- Barraclough, C. A. (1967) Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In *Neuroendocrinology*, L. Martini, W.F. Ganong (Eds) Vol. II Academic Press. New York and London, 61-99.
- 4.- Beach, F.A. (1975). Hormonal modification of sexually dimorphic behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 1,3-23.
- 5.- Beatty, W.W., (1979) Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and - - activational influences. *Horm. Behav.* 12, 112-118.
- 6.- Benda, P. et. al. (1975) Dissociated Cell cultures from fetal mouse hypothalamus patterns of organization and
- 7.- Beyer, C., Velázquez, J. (1980) Androgen regulation of the motor copulatory pattern in the male New Zealand rabbit. *Horm. Behav.* 14,179-190.
- 8.- Breedlove, S. M. and Arnold, A. P. 1980 Conference on Reproductive Behavior, New York. Abstr. No. 3. *ibid.* Abstr. No.40.
- 9.- Brock, M. L. and Shapiro, D. J. (1983) Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. *Cell*, 34,207-204.
- 10.- Brown-Grant, K. (1974) Steroid hormone administration and gonadotrophin secretion in the gonadectomized rat. *J. Endocrinol.* 62,319-332.

- 11.- Cajal y Ramon. 1911. Histologie du Systeme Nerveux, Vol. II. Consejo Superior de Investigacion. Madrid.
- 12.- Calaresti, R. F., Henry, J. L., (1971) Sex difference in the number of sympathetic neurons in the spinal cord of the cat. Science 173,343-344.
- 13.- Clayton, R. B., Kogura, J., (1970) Sexual differentiation of the brain RNA metabolism in newborn female rats. Nature 226,810-812.
- 14.- Crews, D. (1979) Neuroendocrinology fo lizard reproduction. Biol. Reprod. 20. 000-000.
- 15.- Davison, J. M. and Smith, E. R. (1968) Relative thre sholds of behavioral and somatic responses to estrogen. Physiol. Behav. 3,227-229.
- 16.- Docke, F. and Dorner, G. (1969) A possible mechanism by which progesterone facilitates ovulation in the rat. Neuroendocrinology 4, 139-149.
- 17.- Dohler, K. D., (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. Endocrinology 94, 1003-1010.
- 18.- Dohler, K.D. and Wuttke, W. (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. Endocrinology, 898-907.
- 19.- Dorfman, R. I (1967) The antiestrogenic and antiandrogenic activities of progesterone in the defense if a birnak fetus. Anat. Rec. 157, 547-557.
- 20.- Dorner, G. and Staudt, J. (1968) Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. Neuroendocrinology 3, 136-140.
- 21.- Dorner, G. and Staudt, J. (1969) Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat, following

- neonatal castration and androgen substitution. Neuroendocrinology 4, 278-281.
- 22.- Dorner, G., Docke, F. and Hinz, G. (1969). Homo- and hypersexuality in rats with hypothalamic lesions. Neuroendocrinology 4,20-24.
  - 23.- Dorner G., and Pastschel, J. (1970) Wirkungen neonatal verabreichteter Androgene und Antiandrogene auf Sexualverhalten und Fertilität von Rattenweibchen. Endokrinologie 56, 29-48.
  - 24.- Dorner, G. and Hinz, G. (1975) Androgen-dependent brain differentiation and life span. Endocrinology 65, 378-380.
  - 25.- Ehrhardt, A. A. and Meyer-Bahlburg, F. L. (1981). Effects of prenatal sex hormones on Gender-related behavior. Science 211,1312-1318.
  - 26.- Etgen, A.M., (1984). Progesterin receptors and the activation of female reproduction behavior: A critical review. Hormones and Behavior 18,411-430.
  - 27.- Everett, J. W. (1972) Brain, pituitary gland, and the ovarian cycle. Biol. Reprod., 6,3-12.
  - 28.- Feder, H. H. (1984) Hormones and sexual behavior. Ann. Rev. Physiol. 35,165-200.
  - 29.- Freshney Ian. 1978. Manual de Cultivos de Tejidos, Accademic Press.
  - 30.- George, F. W. and Wilson, J. D. (1978). Estrogen formation in the early rabbit embryo. Science 199,200-208.
  - 31.- Giles, K. W. and Myers, A., (1965) An improved diphenylamine method for the estimation of desoxiribonucleic acid. Nature (London) 206, 93-114. J. Bioche. (1956) 62,315-324.
  - 32.- Goodman, L. (1934) Observations on transplanted immature

ovaries in the eyes of adult male and female rats. *Anat. Rec.* 59, 223-251.

- 33.- Gorski, R.A. and Barraclough, C.A. (1963) Effects of low dosages of androgen on the differentiation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. *Endocrinology* 73,210-216.
- 34.- Gorski, R. A. (1971) Gonadal hormones and the perinatal development of neuroendocrine function. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* (L. Martini and W.F. Ganong, eds). Oxford University Press, New York. 237-290.
- 35.- Gorski, R.A. (1974). The neuroendocrine regulation of sexual behavior. In: *Advances in psychobiology*, Vol. II (G. Newton and A. H. Reisen, eds). John Wiley and Sons. New York, 1-58.
- 36.- Gorski, R. A. (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148,333-346.
- 37.- Gorski, A.R., (1979) The neuroendocrinology of reproduction: An Overview. *Biology of reproduction* 20, 111-127.
- 38.- Goy, R. W. and McEwen, B.S. 1980. Eds., *Sexual Differentiation of the Brain* (MIT press, Cambridge, Mass).
- 39.- Guroff, G, and Undefriend, S. (1964) The uptake of aromatic-amino acids by the brain of mature and newborn rats. *Prog. Brain Res.* 9,187-197.
- 40.- Harris, G. W. (1964). Sex hormones, brain development and brain function. *Endocrinology* 75,627-648.
- 41.- Hugh J. Phillips. 1973. *Tissue Culture. Method and applications.* Editor. Paul F. Kruse. Academic Press 1973.
- 42.- Hyden, H. (1967) Environmental factors affecting the biochemical response of neurons and glia, studied by microchemical techniques. In *Regional Development of the Brain in Early Life*, p.174. Ed. A. Minkowski. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- 44.- Kelly, M. J., (1984) Identification fo Estrogen-Responsive LHRH Neurons in the Guinea Pig Hypothalamus. Brain Research Bulletin 12, 399-407.
- 45.- Levine, B. and Mullin, R. F. (1964) Estrogen administered neonatally affects adult sexual behavior in male and female rats. Science 144, 185-187.
- 46.- Lynch R. 1975. Metodos de laboratorio, 2o. edic. edti. Interamericana, pp. 101-137.
- 47.- Lowry, O. H., et al. (1951) Protein measurement with the folin phenol J. Biol. Chem. 193, 256-275.
- 48.- López Antuñez Luis. Anatomia del Sistema Nervioso. Ed. Limusa. México. 1979.
- 49.- Mackinnon, P.C.B. (1969). In vivo and in vitro techniques used in the study of RNA synthesis in the brains of rats and mice at various ages from birth to senility. J.Anato. 104,351-360.
- 50.- McLaren, A., Chandley, A. and Koffman-Alfaro, S. (1972) J. Embryol. Exp. Morphol. 27. 27 (No. 3), 515.
- 51.- MacLusky, N. J. Liederburg, I., Krey, L. C., (1980) Progesterin receptors in the brain and pituitary of the bonnet monkey (Macaca radiata): Differences between the monkey and Endocrinology 106,185-191.
- 52.- MacLusky, N. J. and Naftolin F. (1981). Sexual differentiation fo the central nervous system. Science, 211 1294-1303.
- 53.- Masa, F. G. and Martini, I. K, (1971). Effects of Nembutal exogenous gonadotropins Endocrinology 88, 1437,1447.

- 54.- Matsumoto, A. and Arai, Y. (1976) Effect of estrogen on early post-natal development of synaptic formation in the post-natal development of synaptic formation in the hypothalamic arcuate nucleus of female rats. *Neurosci. Lett.*, 2, 79-82.
- 55.- May, L. and Grenell, R. G. (1956) Nucleic acid content of various areas of the rat brain. *P.S.E.B.M.* 12, 235-239.
- 56.- McEwen, B. S., Lieberburg, I. (1977) Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Horm. Behav.* 9, 249-263.
- 57.- McEwen, B. S., (1981) Neural gonadal steroid actions. *Science* 211, 1303-1311.
- 58.- McEwen, B.S., Jones, K. J., (1987) Hormonal control for sexual behavior in the female rat: Molecular, Cellular and Neurochemical studies. *Biology of Reproduction* 36, 37-45.
- 59.- Mejbaum, W., Hoppe-Seyler's. (1939). *J. Physiol. Chem.* 258, 117-123. San Lin, R. I., and Scfride, S. A. (1969) Microestimation of RNA by the cupric ion catalized orcinol reaction. *Annal. Biochem.* 27, 473-483.
- 60.- Morali, G., Larsson, K, and Beyer, C. (1977) Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Horm. Behav.* 9:203-213.
- 61.- Munro, H. N. 1966 In Glickd, Editor, *Methods of Biochem Analysis*, New York, 14:113.
- 62.- Nurnberger, J. and Gordon, M. W. 1957 in Waelsch: *Ultrastructure and cellular chemistry of Neural Tissue*, Hoeber, N. Y., 1957, 100.
- 63.- Nadler, R.D. (1973) Further evidence on the intrahypothalamic locus for androgenization of female rats. *Neuroendocrinology* 12, 110-119.

- 64.- Nottebohm, F, and Arnold, A. P. (1976). Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194, 211-213.
- 65.- Ojeda, S. R., (1975). Further studies on the maturation of the estrogen negative feedback on gonadotropin release in the female rat. *Neuroendocrinology* 18,242-255.
- 66.- Pfaff, D.W. (1986) In situ hybridization technique to localize rRNA and mRNA in mammalian neurons. *J. Histochem. Cytochem* 34,45-50.
- 67.- Palladin, A. V., in H. Wawlsch. 1955. *Biochemistry of the developing Nervous System*, Academic Press. N.Y. 177.
- 68.- Flapinger, L., McEwen, B.S. (1973). Ontogeny of estradiol-binding macromolecule. *Endocrinology* 93,1129-1139.
- 69.- Raisman, G. And Field, P.M., (1973) Sexual dimorphism in the neuropil area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Research*, 54.1-29.
- 70.- Raynaud, J. P., Mercier-Bodard, C. and Baulieu, E.E. (1971). Rat estradiol binding plasma protein (EBP). *Steroids* 18,767-788.
- 71.- Richeter, D. (1958). Protein metabolism of the brain. *Proc. IV Int. Congr. Biochem.* pp 173-183. London Pergamon Press.
- 72.- Selmanoff, M. K., Brodtkin, L. D. (1977) Aromatization and 5 alpha reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. *Endocrinology* 101, 841-848.
- 73.- Staudt. O. and Dorner, (1968) Untersuchungen über Veränderungen der Zellkerne der Area praesoptica und des vorderen Anteils der Area hypothalamica anterior neonatal kastrierter männlicher Ratte, *Z. Mikrosk.,-anat. Forsch*, 79, 363-372.

- 74.- Stuart, A. T., (1986). Differentiation in Male ferrets of a sexually dimorphic Nucleus of the preoptic/anterior hypothalamic area requires prenatal estrogen. Neuroendocrinology 44,299-308.
- 75.- Sutherland, S. D. and Gorski, R. A. (1972). An evaluation of the inhibition of androgenization of the neonatal female rat brain by barbiturate. Neuroendocrinology, 10, 94-108.
- 76.- Swanson, H. H. and van der Werff the Bosch, J. J. (1964) The 'earkt-androgen' syndrome; differences in response to prenatal and postnatal administration of various doses of testosterone propionate in female rats. Acta endocr. 47,37-50.
- 77.- Taleisnik, S., Caligaris, L. and Astrada. (1971). Sex differences in hypothalamo-hypophyseal function. In Steroid Hormones and Brain Function (UCLA Forum Med. Sci, No. 15), C. H. Sawyer and R. A. Gorski (Eds), Univ. of California Press, Los Angeles, 171-184.
- 78.- Tobet, S.A. (1985). Androgen aromatization and 5-alpha-reduction in ferret brain durin perinatal development: effects of sex and testosterone manipulation. Endocrinology 116,1869-1877.
- 79.- Torand-Allerand, C.D., (1978) Gonadal hormones and brain development: cellular aspects of sexual differentiation, Amer. Zool., 18, 72-86.
- 80.- Torand-Allerand, C. D., (1980). Sex Steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro II. Morphological correlates and hormonal specificity. Brain Research, 189 413-427.
- 81.- Vreeburg, J. T. M., Van der Vaart, (1977). Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. J. Endocrinology, 74,375-382.

- 83.- Wilkinson, M. Et. Al. (1974). Hypothalamic neurons in dissociated cell culture. Brain Research 82,129-138.
- 84.- Wilson, J. D. (1978). Sexual differentiation. Ann. Rev. Physiol, 40,279-306.
- 85.- Wilson, J. D., George, R. F., Griffin, J. E., (1981). The hormonal control of sexual development.. Science 211,1278-1284.
- 86.- Worley, T.S., and Pickering, B.T., (1984). Non-neuronal cells of rat hypothalamus in dissociated cell culture. Cell Tissue Res. 237,16-168.
- 87.- Yasaki, I. (1960) Further studies on endocrine activity of subcutaneous ovarian graft in male rats by daily examination of smears from vaginal grafts. Annot. Zool. Japon. 33, 217-225.