



03040  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

**DIMORFISMO SEXUAL EN LA COMISURA ANTE-  
RIOR DE LA RATA: ESTUDIO MORFOLÓGICO Y  
MORFOMÉTRICO**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
**( N e u r o b i o l o g í a )**

**P R E S E N T A :**  
**M.C. ICNELIA HUERTA OCAMPO**

JURIQUILLA, QRO.

2002.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**DIMORFISMO SEXUAL EN LA COMISURA ANTERIOR DE LA  
RATA: ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO**

Presenta:

Ignelia Huerta Ocampo  
Médico Cirujano

Para obtener el grado de:  
Maestra en Ciencias (Neurobiología)

Tutor:  
Dr. Jorge Larriva Sahd

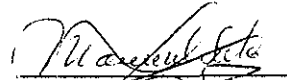
Centro de Neurobiología  
Universidad Nacional Autónoma de México

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Neuromorfología del Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr Jorge Larriva Sahd, con el apoyo de una beca para estudios de Maestría otorgada por el CONACyT y una beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

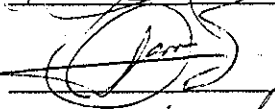
Los miembros del jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Icnelia Huerta Ocampo, cuyo título es: "Dimorfismo sexual en la comisura anterior de la rata: Estudio morfológico y morfométrico" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México

Firma

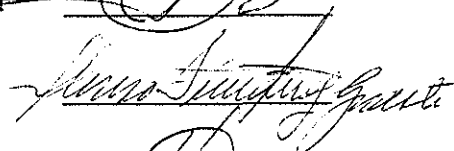
Presidente Dr Manuel Salas Alvarado



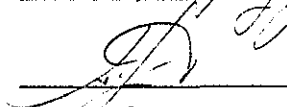
Secretario Dr. Jorge Antonio Larriva Sahn



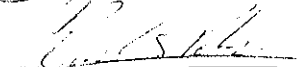
Primer Vocal Dr. Alonso Fernández Guati



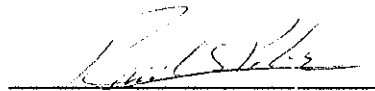
Suplente Dra. Sofia Yolanda Díaz Miranda



Suplente Dr Raúl Gerardo Paredes Guerrero



Aprobado por el Comité Académico



Coordinador del Programa

*A Juan por los sueños compartidos*

*A mis padres por todo su amor y apoyo*

*A Flavio, Rosita y Marcos por su inmenso cariño y alegría*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Larriva, por su asesoría académica, su paciencia y confianza

Al Dr. Salas, la Dra. Sofía Díaz, el Dr. Paredes y el Dr. Fernández Guasti por sus valiosos comentarios y sugerencias en el mejoramiento de esta tesis

Al Dr. Alejandro Cravioto y la Dra. Teresa Cortés, por el apoyo otorgado para poder realizar la Maestría mientras continuaba mis estudios de medicina

A la Unidad de Análisis de Imágenes

A Rafael Favila, Leopoldo González y Pilar Galarza por la ayuda otorgada para hacer posible este trabajo.

Al M.V.Z. José Martín García, encargado del bioterio del CNB, por las facilidades otorgadas.

A mis compañeros de aulas durante la maestría y a los investigadores que con sus clases contribuyeron a mi formación académica

A mis amigos que de alguna manera han formado parte de mi vida. A Eileen por su sinceridad y optimismo, a Héctor por compartir su visión tan particular de la vida, a Rafa por todos los momentos gratos que hemos compartido y a Pavel por escuchar.

A mis hermanos por su apoyo a distancia, aunque siempre presente. A Elleli por su comprensión y cariño y a Diego porque en su mundo existen cosas que me gustaría compartir con él.

# INDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	
2 1 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS	4
2 2 HORMONAS ESTEROIDES	
2 2a. Estructura química y síntesis de los esteroides gonadales	7
2 2b Los esteroides sexuales del sistema nervioso	10
2 2c Receptores y mecanismo de acción de los esteroides gonadales	11
2 3 EFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO EN DESARROLLO Y DURANTE LA VIDA ADULTA	
2 3a Efectos organizacionales y activacionales de las hormonas sexuales	16
2.3b Efecto de los esteroides gonadales sobre el establecimiento de dimorfismo sexual en el cerebro en desarrollo	17
2 3c. Dimorfismo sexual en el Área Preóptica	22
2 4 COMISURA ANTERIOR	27
2 4a. Conectividad	29
2 4b. Estructura citológica e histológica	37
2 4c. Comisura anterior y dimorfismo sexual	39
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
4 HIPÓTESIS	41
5 OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	41
6 MATERIALES Y MÉTODOS	42



6 1 GRUPOS EXPERIMENTALES	42
6 2 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	46
6 3 MORFOMETRÍA	
6 3a Microscopía de luz	47
6 3b Estadística	47
6 3c Microscopía electrónica	47
6 3d Estadística	49
7 RESULTADOS	
7 1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	
7 1a Estructura microscópica de la CA	50
7 2 MICROSCOPIA DE LUZ	
7 2a Área total de la comisura anterior	55
7 2b Área rostral de la comisura anterior	58
7 2c Área caudal de la comisura anterior	60
7 2d Área capilar	62
7 3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	
7 3a Número de axones mielínicos en la comisura anterior	64
8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	66
9 REFERENCIAS	75
10 LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	85

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -FP	$\alpha$ -fetoproteína
AH	Adenohipófisis
APo	Área preóptica
AR	Arquistriatum
ATD	1,4,6-androstatieno-3,17-diona
CA	Comisura anterior
CAc	Comisura anterior caudal
CAr	Comisura anterior rostral
CC	Cuerpo calloso
DHI	Dehidrotestosterona
E	Estradiol
EI	Estría terminal
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HATD	Hembra tratada con ATD
HC	Hembra control
HI	Hembra tratada con testosterona
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulínico tipo I
LH	Hormona luteinizante
MATD	Macho tratados con ATD
MC	Macho control
Mgx	Macho gonadectomizado
MgxI	Macho gonadectomizado tratado con testosterona
NAL	Núcleo amigdalino lateral
NBLA	Núcleo basolateral
NBMA	Núcleo basomedial
NCA	Núcleo cortical
NCAa	Núcleo cortical anterior
NCAp	Núcleo cortical posterior
NCApm	Núcleo cortical posteromedial
NE	Neuroesteroides
NH	Neurohipófisis
NGF	Factor de crecimiento neural
NLA	Núcleo lateral amigdalino
NOA	Núcleo olfatorio anterior
NSD-APo	Núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica
NIOL	Núcleo del tracto olfatorio lateral
NVMH	Núcleo ventromedial hipotalámico
PT	Propionato de testosterona
SC	Subcutánea
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
T	Testosterona

## RESUMEN

Las diferencias sexuales estructurales y funcionales de las áreas cerebrales que controlan las funciones reproductivas en los mamíferos se encuentran determinadas, en gran medida, por el efecto de hormonas esteroides sexuales de origen gonadal durante un período limitado del desarrollo del sistema nervioso central (SNC)

La comisura anterior (CA) posee dos áreas estructuralmente distintas, una rostral u olfatoria y una caudal o temporal. Diversos autores han demostrado que los cuerpos neuronales, cuyos axones proyectan hacia el hemisferio contralateral a través de la CA, se localizan en áreas cerebrales relacionadas con las funciones reproductivas, además de poseer receptores a esteroides gonadales. De esta manera, en el presente trabajo se propone que la CA presenta variaciones estructurales entre ambos sexos y que probablemente estas diferencias resulten del efecto organizacional de las hormonas esteroides sexuales de origen gonadal durante el desarrollo del SNC.

Con objeto de caracterizar las diferencias morfológicas en la CA entre ambos sexos, así como en ratas en las que fue manipulado el ambiente hormonal durante el período de diferenciación del SNC, se determinó el área total, rostral y caudal de esta estructura en cortes histológicos que contenían a la CA en el plano sagital. Asimismo, se realizó el conteo del número de axones mielínicos a partir de observaciones con microscopía electrónica.

Los resultados obtenidos sugieren que la CA es sexualmente dimórfica y que las diferencias encontradas están en buena medida determinadas por la presencia de testosterona durante la etapa perinatal.

## **SUMMARY**

In mammals, the structural and functional sex differences in the brain areas that control the reproductive functions are partly determined by the presence of gonadal steroid hormones during a short period in the development of the central nervous system (CNS).

The anterior commissure (AC) has two distinct areas. These areas are structurally different, one rostral or olfactory and one caudal or temporal. Several authors have proven that the neuronal bodies whose axons project to the contralateral hemisphere through the AC are localized in brain areas that are related with the reproductive functions and also these neurons express receptors to the gonadal steroid hormones. Given this, it is proposed that the AC is sexually dimorphic and that probably this dimorphism is the result of the organizational effects of the gonadal hormones during the CNS development.

In order to characterize the morphological differences in the AC between sexes, and in rats that were hormonally manipulated during the period of differentiation of the CNS, we determined in sagittal sections the mean area of the total, rostral and caudal AC. Also, the number of myelinated axons was determined by electron microscopy.

The results show that the AC is sexually dimorphic and suggest that testosterone present during the perinatal period may modify the structure of the AC.

## 1. INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual, característica de los vertebrados, ha mostrado poseer ventajas evolutivas muy claras que les ha facilitado a las especies animales que las poseen una mejor adaptación a habitats específicos, en comparación con aquellos animales que se reproducen asexualmente (Alberts, et al , 1994)

La diferenciación sexual en los mamíferos es un proceso secuencial que comienza con el establecimiento del sexo genético durante la fertilización. Este fenómeno traerá como consecuencia el desarrollo del sexo gonadal, culminando con el establecimiento de fenotipos sexualmente distintos por interacción de las hormonas esteroides gonadales, con el genoma y los productos de su expresión (Breedlove, 1994).

La determinación sexual en un inicio es principalmente genética. En los mamíferos, un gen localizado en el cromosoma Y controla la diferenciación de la gónada indiferenciada en testículos. Posteriormente, las células de Leydig secretan testosterona, la cual estimula la diferenciación de los órganos del tracto reproductivo masculino y los caracteres sexuales secundarios. Por otro lado, las células de Sertoli secretan la hormona anti mülleriana, la cual inhibe el desarrollo de los órganos del tracto reproductivo femenino. En las hembras, ante la ausencia de testosterona, los conductos müllerianos se diferencian en las trompas de falopio, útero y vagina (Griffin y Ojeda, 2000)

El mecanismo de determinación sexual varía mucho entre los vertebrados. Algunos reptiles poseen cromosomas sexuales, sin embargo, en otros individuos de este mismo orden y en anfibios, es la temperatura a la que se incuban los embriones la que determina el proceso de diferenciación sexual (George y Wilson, 1994)

Las áreas cerebrales que controlan las funciones reproductivas de los mamíferos presentan importantes diferencias estructurales, funcionales y neuroquímicas representadas en grupos neuronales, sinapsis y elementos gliales (Gorski, et al , 1978; Nishizuka y Arai, 1981; Raisman y Field, 1973). Dichas diferencias dependen, en gran medida, de la presencia perinatal de hormonas sexuales esteroides de origen gonadal. Las hormonas gonadales actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) en desarrollo durante un período limitado o "período crítico", durante el cual, los substratos anatómicos y fisiológicos que controlan los aspectos neuroendócrinos y conductuales de la reproducción adquieren las características

propias de cada sexo. Así, las características de los circuitos neuronales sexo específicos impresas por las hormonas gonadales perinatales son activados posteriormente debido a la acción temporal de estas mismas hormonas a lo largo de la etapa reproductiva (Arnold y Breedlove, 1985; Arnold y Gorski, 1984). Lo anterior condiciona la aparición de conductas sexuales específicas, las cuales tienden a desaparecer una vez que los niveles hormonales decaen y regresan a un estado basal. La acción organizadora que poseen las hormonas sexuales de origen gonadal ayuda a la aparición de cambios estructurales permanentes en las estructuras cerebrales encargadas del control de las funciones reproductivas en los mamíferos sólo durante un período limitado, en contraste con los efectos activacionales, los cuales no producen cambios permanentes ni tienen una restricción temporal, siendo responsables de las expresiones neuroendócrinas, gonadales y conductuales que garantizan el apareamiento, fertilización y gestación de prácticamente todos los mamíferos estudiados a la fecha (Arnold y Breedlove, 1985).

Una de las estructuras más estudiadas y descrita en inicio por Gorski es el núcleo preóptico medial de la rata, también conocido como núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (NSD-APo), y que por ello se utiliza como modelo para describir los mecanismos mediante los cuales las hormonas sexuales inducen cambios estructurales distintos entre los sexos. El NSD-APo se ha relacionado con diferentes mecanismos que regulan la fisiología reproductiva en los mamíferos, como lo es la liberación episódica de gonadotropinas (Gorski, 1986). A partir de trabajos neuroanatómicos se ha descrito que el volumen de este núcleo es aproximadamente cuatro veces mayor en la rata macho, y que tal diferencia se instaura durante los primeros días del nacimiento. Lo anterior parece depender de las hormonas esteroides sexuales en la etapa perinatal, ya que tal efecto se suprime por la castración del macho al nacimiento y se revierte si éste es tratado con testosterona exógena. De igual manera, el volumen del núcleo aumenta cuando las hembras son tratadas durante la etapa perinatal con testosterona. Estudios más recientes, realizados también por el grupo de Gorski en 1996, apoyan el hecho de que los esteroides gonadales, en particular el estradiol resultante de la aromatización intraneuronal de la testosterona, promueven la sobrevivencia de un mayor número de neuronas en el macho que en la hembra, explicando así el mayor volumen nuclear de aquél (Davis, et al., 1996). Existen otras estructuras que muestran diferencias estructurales, dentro de las que se incluyen al área preóptica (porción infracomisural de la

estria terminal), núcleos ventromedial hipotalámico, núcleo lecho de la estria terminalis, núcleo arcuato, núcleo supraquiasmático y algunos núcleos amigdalinos, entre otros (McEwen, 1992) Con excepción del núcleo anteroventral periventricular, el locus ceruleus y el paraestriatal, las diferencias sexuales en volumen nuclear y en densidad sináptica descritas en los mamíferos son mayores en el macho

Los sistemas comisurales, dentro del sistema nervioso, se definen como un conjunto de axones que proyectan de manera contralateral hacia áreas cerebrales homólogas a las de su origen En los mamíferos euplacentarios, las áreas corticales de ambos hemisferios se encuentran conectadas recíprocamente a través de los tres grupos mayores de fibras comisurales: el cuerpo caloso, la decusación del fórnix y la comisura anterior (CA) Estos sistemas de fibras se originan durante la etapa fetal y continúan desarrollándose por un corto período después del nacimiento; en el caso particular de la CA de la rata, ésta continúa su desarrollo hasta el día 12 postnatal (Guadaño-Ferraz, et al , 1994)

El análisis de los sistemas comisurales, como modelo para el estudio de las diferencias sexuales estructurales que derivan de las áreas cerebrales que proyectan sus axones a través de un sistema comisural, ofrecen claras ventajas sobre otros modelos de estudio A este respecto, el modelo de la CA ofrece la característica ventajosa de estar delimitada claramente en sus dos componentes los cuales contienen la totalidad de los axones que la conforman Así, la CA de la rata está delimitada posteriormente por el III ventrículo y rostralmente por el neuropilo y neuronas septopreópticas Esta separación clara favorece la evaluación anatómica de los cambios inducidos por ciertas variables experimentales, así como una mayor reproducibilidad (Larriva-Sahd, et al , 1998).

En breve, el presente estudio pretende determinar la posible existencia de dimorfismo sexual en la CA y de ser así, investigar si las modificaciones en las hormonas esteroides de origen gonadal durante la vida perinatal pueden modificar la estructura histológica de la CA, estableciendo de esta manera una dependencia gonadal en la diferenciación sexual de la CA

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 EJE HIPOITALÁMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS.

Los estímulos ambientales, así como las señales generadas en el interior del organismo, ejercen influencias muy importantes sobre el medio interno de los individuos. Esto se observa claramente en el efecto que ejercen distintos factores ambientales tales como las variaciones estacionales y la alimentación, entre otros, sobre los procesos reproductivos como son las conductas de apareamiento, celo, migración, etc.

Los mecanismos neuroendócrinos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostásis de las funciones reproductivas, metabólicas y conductuales. La principal glándula endócrina encargada de regular dichas funciones es la glándula hipófisis o pituitaria, la cual para llevar a cabo su función de recepción, transmisión e integración de señales se encuentra en estrecha relación con el hipotálamo. Esta comunicación entre hipotálamo e hipófisis se establece a través de una proyección de fibras nerviosas provenientes de células neurosecretoras localizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámicos hacia el lóbulo posterior de la hipófisis o neurohipófisis (NH). Así como a través de una conexión vascular con el lóbulo anterior o adenohipófisis (AH), representado por el sistema porta-hipotalámico-hipofisiario (Norman and Litwack, 1997) (Griffin y Ojeda, 2000).

Las neuronas hipotalámicas sintetizan y liberan factores estimuladores e inhibidores que facilitan o inhiben la liberación específica de hormonas AH, respectivamente. Las hormonas secretadas por la AH son transportadas por la circulación sistémica para actuar a distancia sobre distintas glándulas blanco, ejerciendo de esta manera acciones moduladoras sobre diversas funciones.

La regulación de este sistema de liberación endócrina se encuentra dada por los niveles circulantes tanto de hormonas AHs como por las concentraciones de las hormonas sintetizadas por las glándulas periféricas, las cuales modulan mediante mecanismos de retroalimentación positiva y negativa la liberación subsecuente de hormonas hipotalámicas y AHs, cerrando de esta manera un circuito que permite variar en forma dinámica y dentro de



rangos normales, las características fisiológicas del medio interno (Norman y Litwack, 1997)

Los estímulos externos, así como los generados en el medio ambiente interno se transmiten hacia distintas áreas cerebrales distribuidas fundamentalmente en el hipotálamo y estructuras relacionadas con el sistema límbico, las cuales integran y transmiten la información ya sea de manera directa o indirecta sobre un grupo de neuronas llamadas GnRHérgicas distribuidas de manera difusa en el hipotálamo anterior y en el área preóptica (Merchenthaler, et al , 1984; Silverman y Krey, 1978) Este grupo de neuronas, encargadas de regular las funciones reproductivas en los mamíferos, proyectan hacia la eminencia media en donde vierten de manera directa un mensajero químico, la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), la cual se libera de manera episódica hacia el sistema vascular portal hipotálamo-hipofisiario. Una vez en la AH, esta hormona o factor liberador es capaz de estimular a las células gonadotropas, las cuales responden sintetizando y liberando hacia la circulación sistémica a las hormonas luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH), conocidas genéricamente como gonadotropinas (Fig 1)

Habiendo sido liberadas ambas hormonas AHs, éstas actúan de manera diferencial sobre células ováricas y testiculares regulando la secreción de estrógenos, progesterona, andrógenos, inhibina y otras proteínas, las cuales ejercen efectos múltiples sobre órganos efectores facilitando o inhibiendo la expresión de conductas sexuales, el desarrollo de órganos sexuales periféricos y determinando la diferenciación sexual del sistema nervioso en desarrollo, asegurando así la competencia reproductiva (Everet, 1994)

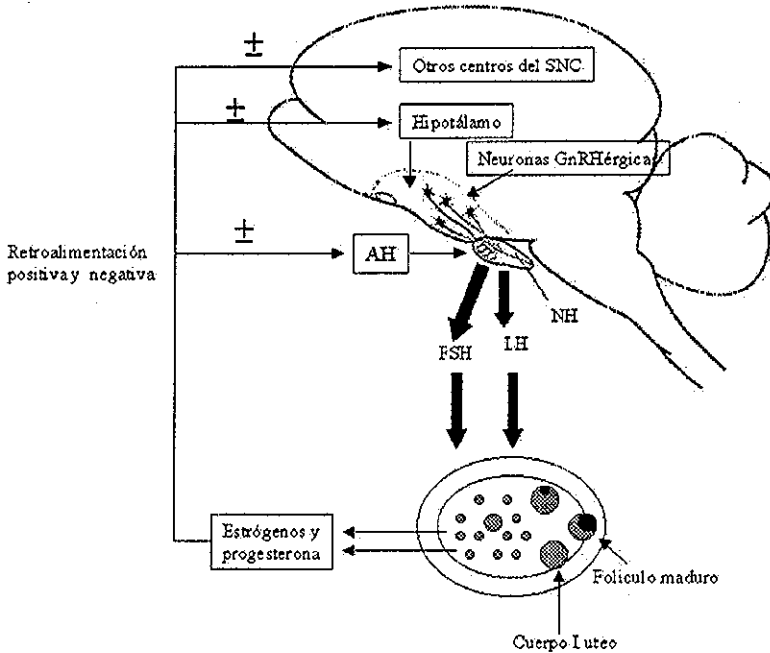


Fig 1 Eje Hipotálamo-hipófisis-gónadas: Tanto estímulos externos (temperatura, luz, etc) como internos (peso corporal, concentración plasmática de esteroides gonadales, cantidad de lípidos, etc) ejercen una influencia sobre la regulación de las funciones reproductivas. La integración de estos estímulos por diversos grupos de neuronas en distintas áreas cerebrales transmiten la información resultante a las neuronas GnRHérgicas localizadas en el hipotálamo mediobasal y el área preóptica. La secreción alterna de las gonadotropinas hipofisiarias (LH y FSH) por la AH regulan la secreción de estrógenos y progesterona en las células ováricas. En la regulación de este sistema participan mecanismos de retroalimentación positiva y negativa ( $\pm$ ) dados por los niveles circulantes de hormonas adenohipofisiarias (AH) y por los esteroides ováricos, los cuales actúan tanto a nivel central como hipofisiario (NH) Neurohipófisis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.2 HORMONAS ESTEROIDES

### 2.2a. Estructura química y síntesis de los esteroides gonadales

Los esteroides gonadales constituyen una familia de hormonas lipídicas derivadas del colesterol. Su estructura básica, el ciclo-pentano-perhidrofenantreno, está formada por tres anillos aromáticos de benceno condensados; esta configuración da una gran versatilidad estructural pues a partir de ella, a través de modificar algunos de sus radicales y el número de dobles ligaduras, se pueden obtener una diversidad de derivados entre los que se encuentran el colesterol y las hormonas esteroides.

Como se mencionó anteriormente, las hormonas esteroides derivan del colesterol. Este compuesto orgánico juega un papel esencial en el metabolismo celular pues funge como precursor no solamente de hormonas esteroides, sino también de las sales biliares necesarias para emulsificar, en la luz intestinal, a las grasas provenientes de la dieta (Stanella-Alcalá, 1992). Además, el colesterol forma parte importante de la estructura de las membranas celulares, y algunos de sus derivados dan origen a las vitaminas A, E y K, a los dolicoles (moléculas transportadoras de lípidos que sirven como precursores para la síntesis de glicolípidos) y a la ubiquinona (compuesto involucrado en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria).

La síntesis del colesterol ocurre en cuatro fases. En la primera fase, tres unidades de acetato derivadas de la acetil Co-A se condensan para dar lugar a una cadena alifática de hidrocarburos constituida por seis carbonos conocida como mevalonato. En la segunda fase, la molécula de mevalonato es "activada" a través de la adición de tres grupos fosfato a los carbonos tres y cinco de su cadena. En la tercera etapa, la remoción subsecuente de un grupo fosfato y del carboxilo inicial genera una doble ligadura, y así una cadena alifática de cinco carbonos conocida como isopreno. La condensación de cinco moléculas de isopreno activadas da origen al escualeno, cuya cadena hidrocarbonada contiene 30 átomos de carbono. Finalmente, la ciclización del escualeno lleva a la formación de los anillos A, B, C y D del núcleo de colesterol, y la subsecuente oxidación y modificación de la posición de los grupos metilo da como resultado la molécula del colesterol.

Una vez formado en el hígado, el colesterol puede ser transferido con la ayuda de apolipoproteínas plasmáticas (una vez conjugadas con el colesterol o sus derivados se designan lipoproteínas de baja densidad) hacia los órganos en los que será utilizado. En células ováricas y testiculares, el colesterol se transforma a través de una serie de reacciones secuenciales en pregnenolona, progesterona, testosterona y estradiol. La síntesis de todas estas hormonas requiere de la remoción de algunos o todos los carbonos en la cadena lateral que se une al carbono 17 del anillo D del colesterol. Esto se logra mediante reacciones de hidroxilación y oxidación.

En la figura 2 se ilustra la vía metabólica con las reacciones que conducen de un compuesto a otro, la mayoría con acciones biológicas propias pero que funcionan también como precursores de compuestos subsecuentes.

El primer paso de la síntesis de esteroides gonadales es la conversión de colesterol (27 carbonos) en pregnanolona (21 carbonos), en una reacción realizada por el complejo enzimático conocido como citocromo p450. Esta reacción ocurre en la mitocondria, siendo un paso limitante en la biosíntesis de esteroides. La pregnanolona se puede convertir en progesterona por medio de una enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, o en  $17\alpha$ -hidroxipregnanolona por medio de una  $17\alpha$ -hidroxilasa. Ambas, la progesterona y la  $17\alpha$ -hidroxipregnanolona pueden a su vez ser metabolizadas en  $17\alpha$ -hidroxiprogestero. La  $17\alpha$ -hidroxiprogestero es sustrato de la  $17,20$ -liasa y convertida en androstenediona ya con 19 carbonos. Este metabolito se convierte en estrona (con 18 carbonos) mediante una aromataza o en testosterona (I) por la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; ambas, la estrona y la I son precursores del estradiol (E). La estrona es convertida en E por medio de una enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la I a través de la remoción del carbono 19 y la aromatización del anillo A del andrógeno (Grifin y Ojeda, 2000).

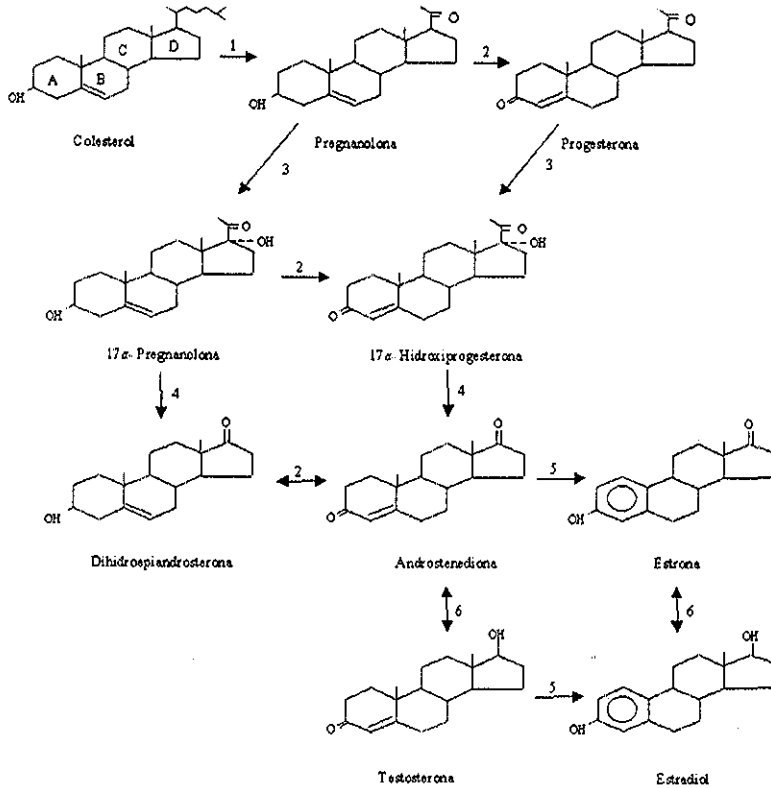


Fig 2. Biosíntesis de esteroides gonadales ováricos 1) Complejo enzimático que corta la cadena lateral del colesterol; 2) 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3) 17 $\alpha$ -hidroxilasa; 4) 17,20-liasa; 5) Aromatasa 6) 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Modificada de Griffin y Ojeda, 2000).

## 2.2b Los esteroides sexuales del sistema nervioso

El término de neuroesteroides (NE) se aplica a aquellos esteroides que son sintetizados en el sistema nervioso (SN), ya sea *de novo*, a partir del colesterol, o a partir de precursores de hormonas esteroides (Baulieu, 1981) Otra característica es que los NE se acumulan en el SN en concentraciones que son, al menos en parte, independientes de aquellas relacionadas con la secreción esteroidogénica por parte de las glándulas de secreción. Las células gliales juegan un papel muy importante en su síntesis y metabolismo, ya que éstos son sintetizados tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP) en su mayoría por este tipo celular (Baulieu, 1991; Robel y Baulieu, 1995)

El significado biológico de los NE se ha logrado esclarecer mediante estudios realizados en cultivos celulares, en los cuales se ha mostrado una gran variedad de efectos neurotróficos, entre los que se destaca: la supervivencia neuronal (Bologna, et al, 1987), crecimiento axonal y formación de mielina (Jung-Testas, et al, 1994; Jung-Testas, et al, 1996) Evidencias experimentales apoyan que los efectos enumerados resultan del efecto regulador de los NE sobre la expresión de genes específicos, además de la capacidad de ejercer efectos en ciertos receptores de membrana, tal y como ocurre en el caso de algunos neurotransmisores (Valera, et al, 1992 en Baulieu y Schumacher, 1997)

Es probable que los NE ejerzan sus efectos tróficos al actuar en conjunto, o incluso de manera sinérgica, con los esteroides circulantes de origen gonadal y adrenal, así como con factores de crecimiento de origen peptídico, tales como el factor de crecimiento tipo insulínico tipo I (IGF-1) o el factor de crecimiento neural (NGF) Estos efectos tróficos se han observado mediante estudios en los que se han lesionado nervios periféricos y se ha analizado el papel que juegan las células de Schwann durante la regeneración y remielinización de estos axones (Koenig, et al, 1995; Jung-Testas, et al, 1996; Yu y Srinivasan, 1981) A partir de estos trabajos se ha propuesto que el mecanismo por el cual los NE promueven la regeneración de nervios periféricos es mediante el incremento en la proliferación de las células de Schwann en los estadios tempranos de la post-lesión, facilitando así la producción de factores neurotróficos, lo cual resulta en un incremento de los procesos de crecimiento axonal y remielinización (Raivich y Kreutzberg, 1993 en Baulieu y Schumacher, 1997) El hecho de que los NE puedan modular la actividad neuronal

neuronal e incrementar la mielinización axonal puede tener implicaciones clínicas muy importantes por lo que resulta de interés el determinar mediante estudios a futuro, el significado fisiopatológico de la síntesis de neuroesteroides tanto en el SNC como en el SNP (Baulieu, 1991; Robel y Baulieu, 1995)

### **2.2c Receptores y mecanismo de acción de los esteroides gonadales**

Las hormonas ejercen sus efectos sobre las células blanco a través de su unión con receptores localizados intracelularmente o en la superficie de la membrana celular

Las hormonas peptídicas y los factores de crecimiento ejercen sus acciones mediante su unión a receptores localizados en la superficie de la célula blanco, mientras que los esteroides se unen a receptores citoplásmicos o intranucleares, y generan su actividad biológica al estimular la síntesis de RNAm, mediante la transcripción de ciertos genes específicos.

Muchas de las acciones de estas hormonas son retardadas y prolongadas en su efecto, debido a que involucran receptores intracelulares que interactúan con secuencias específicas de DNA. Sin embargo, existen efectos rápidos de estos esteroides que se ejercen al actuar sobre la superficie celular. Una de las acciones directas, más interesantes, es la provocación de descargas neuronales diencefálicas que ocurren segundos después de la aplicación iontoforética de  $17\beta$ -estradiol hemisuccinato (McEwen, et al, 1982). Asimismo, la administración de esta misma hormona causa un decremento agudo en el número de receptores a serotonina (McEwen, et al, 1982).

Los receptores a esteroides se encuentran involucrados en la regulación de numerosos procesos biológicos entre los que se incluyen el funcionamiento y desarrollo de funciones reproductivas y no reproductivas, así como en el establecimiento de las diferencias sexuales estructurales de áreas cerebrales involucradas en las funciones de reproducción.

Después de ser secretados por el ovario y el testículo, y dada su insolubilidad en agua, los esteroides gonadales son transportados hacia sus órganos blanco por globulinas plasmáticas (Griffin y Ojeda, 2000).

Una vez que la hormona se disocia de su proteína transportadora, entra a la célula mediante un mecanismo de difusión (paso 1 en Fig 3). Posteriormente, dependiendo de la

localización del receptor, ésta puede interactuar en el compartimento citoplásmico o bien en el nuclear (paso 2 en Fig 3) Una vez que el receptor se ha activado como resultado de la liberación de una proteína de choque, la cual se asocia al complejo hormona-receptor (H-R), éste último puede interactuar con una región específica de DNA (paso 3 en Fig 3), la cual promueve la transcripción y síntesis de determinada proteína (paso 4 y 5 en Fig 3) La unión entre la hormona y su receptor conduce a una homodimerización del complejo ligando-receptor que cambia la conformación del mismo El cambio de conformación de las proteínas del receptor le confiere a éste un incremento en la afinidad por secuencias de ADN, conocidas como elementos de respuesta a esteroides, localizados en regiones reguladoras de genes blanco Además, el cambio conformacional del receptor también aumenta la afinidad de éste por factores de transcripción específicos Así, el complejo esteroide-receptor funciona como factor de transcripción al unirse a los elementos de respuesta a esteroides en el DNA, facilitando o suprimiendo la transcripción genética y la producción de la proteína correspondiente (Katzenellenbogen, 1996; Tsai y O'Malley, 1994) Los receptores para esteroides también pueden ser activados en ausencia de su ligando nativo por factores de crecimiento u otros agentes capaces de aumentar los niveles de AMP cíclico (Aronica y Katzenellenbogen, 1993; Ignar-Trowbridge, et al. 1993)

Así, el mecanismo primario por el cual los esteroides gonadales parecen influir sobre la organización anatómica, los procesos neurofisiológicos y las conductas reproductivas resultantes es a través de su unión con receptores neuronales intranucleares en áreas blanco específicas, especializadas en la transmisión, integración y ejecución de las funciones reproductivas

Las técnicas neuroanatómicas, como lo es la autorradiografía, han resultado de gran utilidad para localizar, identificar y caracterizar la presencia de receptores a esteroides, así como para definir su distribución específica dentro del sistema nervioso (Pfaff y Keiner, 1973)

En el caso de los receptores a estrógenos se han caracterizado los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$ , los cuales se encuentran expresados de manera diferencial en las áreas cerebrales relevantes para el control de las actividades sexuales (Fig 4) Algunas de las estructuras que expresan estos tipos de receptores son, área preóptica (Vito y Fox, 1982), área hipofisiotrófica, sustancia gris mesencefálica, región del rafe dorsal del cerebro anterior y algunas estructuras que



forman parte del sistema límbico como la amígdala e hipocampo entre otras (McEwen y Alves, 1999; Lieberburg, et al., 1977; Li, et al., 1997 en Agrati, et al., 1999)

Asimismo, mediante diversos trabajos se ha logrado caracterizar, en ratas macho y hembras, la presencia de células inmunorreactivas a estrógenos y T en motoneuronas que forman parte de los núcleos sexualmente dimórficos de la médula espinal (Matsumoto y Prins, 1998; Williams y Papka, 1996)

Los antecedentes que existen en cuanto a la localización, caracterización y distribución de neuronas sensibles a los efectos de la T resultan difíciles de interpretar por el hecho de que la T se metaboliza a E y a 5- $\alpha$  dehidrotosterona (DHT) de manera abundante en el cerebro; además, estas dos últimas hormonas se unen a receptores a estrógenos y andrógenos, respectivamente (MacLusky y Naftolin, 1981). A pesar de lo anterior, algunos trabajos han reportado que los receptores androgénicos muestran un patrón de distribución similar al encontrado para el caso de los receptores a estrógenos, por lo que es posible que dichos receptores hormonales coexistan en un tipo celular en algunas áreas del cerebro

Jung-Testas y cols (1992), han identificado la presencia de receptores a progesterona, glucocorticoides, estrógenos y andrógenos en cultivos primarios de células gliales en cerebros de ratas neonatas (Jung-Testas, et al., 1992; Jung-Testas, et al., 1996). Estos resultados, aunados con los obtenidos por una gran cantidad de autores, han aportado suficiente evidencia acerca del papel de las células gliales sobre la síntesis y metabolismo de hormonas esteroides, así como en su participación en el proceso de remielinización

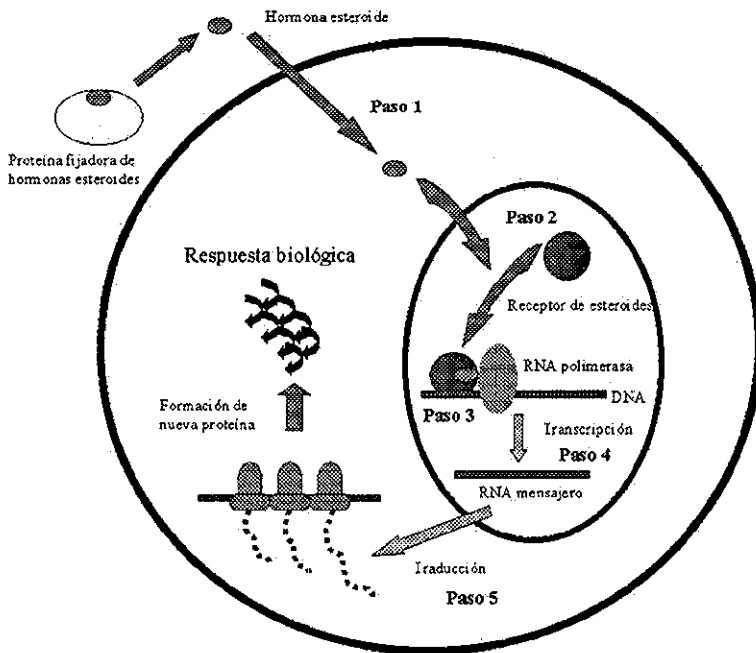


Fig 3 Mecanismo de acción de las hormonas esteroides Una vez disociadas de su proteína transportadora, los esteroides penetran la membrana mediante difusión (paso 1) e interactúan con receptores nucleares (paso 2), los cuales funcionan como factores de transcripción (paso 3) promoviendo la formación de un RNAm (paso 4) y su traducción a proteínas específicas (paso 5)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

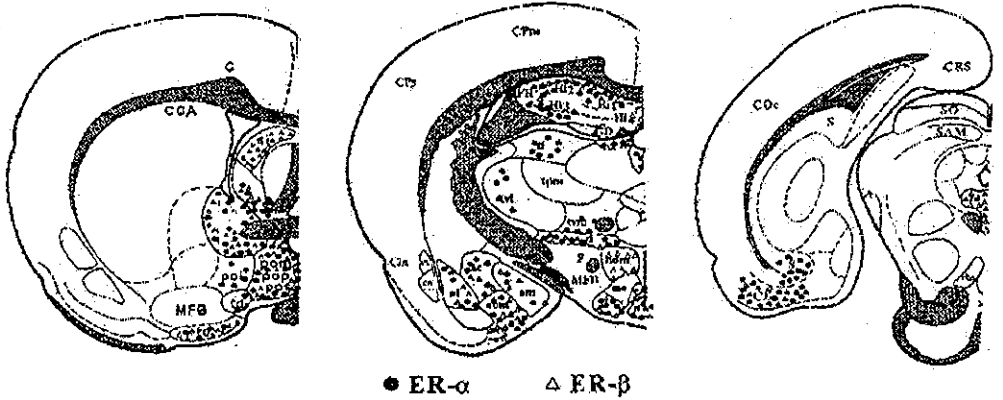


Fig 4. Distribución de receptores de estradiol  $\alpha$  y  $\beta$  en el SNC de la rata (Tomado de Agrati et al, 1999)

abm	Núcleo basomedial de la amígdala	la	Porción lateral del núcleo ventromedial	td	Núcleo de la banda diagonal
ac	Núcleo central de la amígdala	MFB	Haz fascicular medial	tl	Núcleo lateral del tálamo
aco	Núcleo cortical amigdalino	na	Núcleo arcuato	tu	Tubérculo olfatorio
al	Núcleo lateral amigdalino	ndm	Núcleo dorsomedial	tv	Núcleo ventrolateral talámico
am	Núcleo medial amigdalino	niel	Núcleo lecho de la estria terminal	wm	Núcleo ventromedial talámico
CE	Corteza entorrinal	pol	Área preóptica lateral	zi	Zona incerta
FH	Fimbria del hipocampo	pom	Núcleo medial preóptico		
GD	Giro dentado	pop	Núcleo preóptico periventricular		
la	hábitula	pos	Núcleo supraquiasmático		
Hi1	Hipocampo CA1	rd	Núcleo del rafe dorsal		
Hi2	Hipocampo CA2	S	Subiculum		
Hi3	Hipocampo CA3	si	Núcleo septal intermedio		

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## **2.3. EFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO EN DESARROLLO Y DURANTE LA VIDA ADULTA**

### **2.3a. Efectos organizacionales y activacionales de las hormonas sexuales**

A lo largo del desarrollo perinatal, las hormonas gonadales actúan sobre el SNC durante un período limitado o “período crítico” induciendo la diferenciación estructural y conductual de algunos mecanismos relacionados con el control neuroendócrino y conductual de las funciones reproductivas. Lo anterior resulta en la formación y consolidación de circuitos neuronales específicos del sexo, los cuales son posteriormente “activados” como consecuencia del inicio de la actividad secretoria de las gónadas durante la pubertad. Es en esta etapa en la que la acción transitoria de las hormonas gonadales induce la aparición de conductas sexuales específicas, las cuales tienden a desaparecer una vez que los niveles hormonales declinan (Arnold y Breedlove, 1985; Gorski, 1986). Así, la acción organizadora que poseen las hormonas sexuales durante la etapa perinatal induce cambios estructurales permanentes e irreversibles sobre las estructuras cerebrales encargadas del control de las funciones reproductivas en los mamíferos, mientras que los efectos activacionales no producen cambios permanentes y tienen una restricción temporal más dinámica a lo largo de la vida reproductiva (Arnold y Breedlove, 1985; Hutchison, 1999). La función activadora de las hormonas esteroides puede ser reversible, ya que por ejemplo, la gonadectomía en ambos sexos genera una disminución de la conducta sexual, la cual puede ser recuperada administrando terapia hormonal de reemplazo (Thornton, 1986).

En la rata, el efecto organizador de las hormonas sexuales esteroides abarca desde el día 18 prenatal hasta el día 10 postnatal (Lawrence y Raisman, 1980; Baum, 1979). Este papel organizacional se le ha atribuido a la hormona gonadal masculina T; por lo que el inicio del período crítico de diferenciación tiene lugar una vez que las gónadas se han diferenciado y comienza la síntesis y secreción de T. En la rata, las células de Leydig encargadas de la producción de T comienzan su secreción entre el día 16 y 18 posteriores a la fertilización. Posteriormente, en la vida postnatal ocurre un incremento en la síntesis de esta hormona durante las dos primeras horas de nacimiento, el cual declina a las 6 horas postnatales (Baum, et al., 1988). Los niveles de T se mantienen más elevados en el macho con respecto a

la hembra hasta el día 10 postnatal (Olster y Blaustein, 1988), después disminuyen y se mantienen bajos en ambos sexos hasta el inicio de la pubertad

La función activadora de los esteroides gonadales se inicia con la pubertad. En los machos se requiere de T y sus metabolitos, los cuales inducen la expresión de la conducta sexual masculina. En contraste, en la hembra se requiere de un incremento en la liberación cíclica de gonadotropinas para inducir la ovulación y en consecuencia, la secreción episódica y alternante de estrógenos y progesterona; hormonas necesarias para la activación y expresión de la conducta sexual femenina.

Lo anterior ha sido fundamentado mediante distintos experimentos neuroanatómicos y conductuales en los que se ha demostrado que la administración de T a ratas hembras durante el período crítico induce la masculinización de su SNC. Los efectos de la administración de esta hormona en la hembra y que se manifiestan durante su vida adulta, consisten en la abolición del patrón cíclico de liberación de gonadotropinas (Harris, 1964; Raisman y Field, 1973), además de la aparición de conductas sexuales estereotipadas que arremedan a las del macho. Por otra parte, se ha propuesto que la ausencia de T en el macho a lo largo de esta etapa crítica tiene efectos importantes sobre la organización de las áreas cerebrales y los circuitos neuronales implicados en la regulación de las funciones reproductivas. Así, los efectos de la castración del macho recién nacido sobre la conducta sexual masculina se pueden revertir mediante la administración exógena de T, demostrando así que la disminución y la pérdida de la conducta sexual masculina se deben a la ausencia de esta hormona.

### **2.3b. Efecto de los esteroides gonadales sobre el establecimiento de dimorfismo sexual en el cerebro en desarrollo**

La actividad biológica de la hormona T involucra la participación de sus metabolitos activos; el E como producto de la aromatización de la T, y la DHT como producto de la  $5\alpha$  reducción han sido implicados no sólo en la diferenciación estructural de ciertas áreas cerebrales relacionadas con la conducta sexual (MacLusky y Naftolin, 1981; MacLusky, et al, 1985), sino también durante la activación y mantenimiento de la conducta sexual (Luttge

y Gerren, 1979 en Portillo, 1999) Durante la etapa prenatal cuando se administra un inhibidor de la enzima aromataasa –enzima responsable de la aromatización de la T- como la 1,4,6-androstatiendo-3,17-diona (AID) a ratas macho, se induce la aparición de conductas sexuales femeninas (Brand, et al , 1991)

La transformación de los esteroides gonadales por el tejido nervioso tiene un papel muy importante en la diferenciación del sistema nervioso en desarrollo, así como en la iniciación y mantenimiento de las conductas sexuales durante la vida adulta. Tal vez, el ejemplo más evidente lo sea la conversión intraneuronal de T a E mediante un proceso metabólico de aromatización. Las áreas cerebrales que han mostrado tener actividad biológica de la enzima aromataasa son los núcleos preóptico medial, hipotalámico anterior, preóptico lateral, hipotalámico lateral (Selmanoff, et al , 1977), la circunvolución del cíngulo y la corteza parietal, así como el hipocampo (MacLusky, et al , 1994; Connolly, et al , 1994)

La disponibilidad del E, como producto de aromatización intraneuronal de la T, se ha propuesto como el factor primordial de la diferenciación sexual del SNC en ambos sexos

Durante la etapa intrauterina, tanto hembras como machos se encuentran expuestos de manera continua a estrógenos endógenos provenientes principalmente de la madre. En las hembras existe además una fuente adicional proveniente de los ovarios en desarrollo. Debido a que los estrógenos tienen un papel decisivo en la diferenciación sexual hacia el fenotipo masculino debe existir un mecanismo mediante el cual la hembra se “proteja” de los efectos masculinizantes de los estrógenos presentes en la circulación. Así, en ambos sexos durante la vida fetal y postnatal (E18-P7) ocurre la síntesis de una proteína llamada  $\alpha$ -fetoproteína, la cual se une a los estrógenos circulantes evitando su utilización y penetración a las células nerviosas (MacLusky y Naftolin, 1981). Sin embargo, esta proteína no posee afinidad por la T, por lo que esta hormona sí es capaz de penetrar a las neuronas del cerebro masculino en desarrollo y ser metabolizada a E, el cual a su vez es capaz de interactuar con receptores estrogénicos intranucleares ejerciendo de esta manera sus efectos de organización sobre los elementos neuronales (Fig 5)

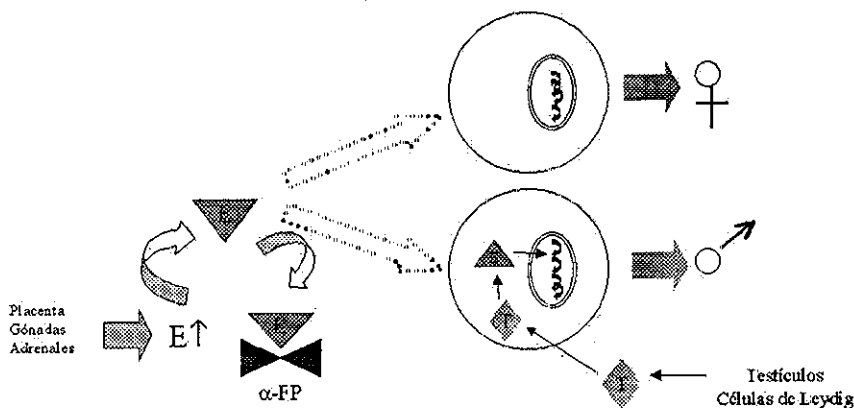


Fig 5 Papel de las hormonas sexuales esteroides sobre el proceso de diferenciación del cerebro en desarrollo. La placenta, gónadas y adrenales proveen de una fuente importante de estrógenos (E) presentes en la circulación. Los E se unen con gran afinidad a la  $\alpha$ -fetoproteína ( $\alpha$ -FP) impidiendo de esta manera su entrada a la célula. Por otro lado, el macho secreta testosterona (T) la cual difunde a las células nerviosas; dentro de la célula, la T es transformada a E mediante un proceso de aromatización. De esta manera, la privación intraneuronal de E condiciona la diferenciación y expresión hacia el fenotipo femenino, mientras que la presencia de E intraneuronal en el macho condiciona la expresión hacia el fenotipo masculino (Modificada de Gorski, 1986)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El conocimiento de la participación de las hormonas esteroides gonadales sobre los procesos reproductivos en los mamíferos data desde inicios de este siglo. Esta participación incluye desde la gametogénesis hasta la lactancia, la cual representa la última fase del ciclo reproductor de los mamíferos. Sin embargo, el conocimiento acerca del papel inductor de estas hormonas sobre la adquisición y desarrollo de las funciones neuroendócrinas y conductuales que participan en la reproducción se ha ido esclareciendo a lo largo de las tres últimas décadas. Los estudios realizados por Pfeiffer en 1936, Barraclough y Gorski en 1961 y Harris en 1962 fueron los primeros en sugerir claramente que los esteroides gonadales actuaban directamente en el cerebro organizando y controlando las estructuras cerebrales relacionadas con las conductas y procesos reproductivos (Arnold y Gorski, 1984; Barraclough y Gorski, 1961). Posteriormente, Raisman y Field en 1973 demostraron que existe una diferencia en el tipo de sinapsis en el área preóptica entre machos y hembras control, y que dicha diferencia depende de la presencia de T en la etapa perinatal (Raisman y Field, 1973). A partir de los trabajos mencionados anteriormente se inició la búsqueda de diferencias sexuales morfológicas en el SNC y SNP.

El establecimiento de diferencias sexuales estructurales en el sistema nervioso de machos y hembras ha sido sustentado a partir de un gran número de trabajos realizados en una enorme variedad de especies de vertebrados. En la Tabla 1 se enlistan las diferencias sexuales hasta ahora encontradas en el sistema nervioso de la rata.



Parámetro	Estructuras
Volumen: macho > hembra	NSD-APo (Núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica) Bulbo olfatorio accesorio Sistema vomeronasal Núcleo lecho del tracto olfatorio accesorio Núcleo lecho del tracto olfatorio Núcleo lecho de la estría terminal Cuerpo calloso Núcleo espinal del bulbocavernoso Núcleo medial preóptico Núcleo medial de la amígdala Núcleo ventromedial hipotalámico Núcleo supraóptico
Volumen: hembra > macho	Comisura anterior (porción rostral) Núcleo anteroventral periventricular Locus coeruleus Núcleo paraestriatal
Asimetría	Corteza cerebral
Conectividad/morfología sináptica	Núcleo arcuato Núcleo anteroventral periventricular Giro dentado del hipocampo Células piramidales hipocámpales de CA <sub>3</sub> Septum lateral Núcleo medial de la amígdala Núcleo preóptico medial NSD-APo Núcleo ventromedial hipotalámico Corteza visual

Tabla 1 Diferencias sexuales estructurales reportadas en el cerebro de la rata (Modificada de Hutchison, 1999)

### 2.3c Dimorfismo sexual en el área preóptica

En el presente estudio se propone estudiar las posibles diferencias sexuales en la estructura de la comisura anterior de la rata, así como la posible influencia perinatal de las hormonas gonadales sobre su dimorfismo. Está justificado, para su entendimiento adecuado, el comentar en extenso uno de los sistemas sexualmente dimórficos mejor descritos: el núcleo sexualmente dimórfico del área medial preóptica descrito inicialmente por R A Gorski (1978)

El área preóptica (APo) se considera desde hace unas décadas como un centro integrativo muy importante encargado de la regulación de las funciones reproductivas en una gran variedad de especies. Harris en 1937, estudió el efecto de la estimulación eléctrica del hipotálamo sobre la secreción de gonadotropinas y observó que después de dicha manipulación invariablemente ocurría la ovulación (Harris, 1964). Posteriormente, otros autores, usando el mismo tipo de estimulación, observaron que el APo y el hipotálamo ventromedial también se encontraban involucrados en la regulación de la ovulación. A partir de estudios posteriores, usando técnicas de estimulación y lesión, se lograron identificar dos regiones hipotalámicas relacionadas con la regulación de la liberación de gonadotropinas en la hembra. Así, el APo se relaciona con la secreción cíclica de gonadotropinas, lo cual es indispensable para que ocurra la ovulación, mientras que el núcleo arcuato se relaciona con la liberación tónica de éstos factores (Barraclough y Gorski, 1961). Posterior a la localización de los centros de control encargados de la ovulación en la región hipotalámica, así como la evidencia de diferencias sexuales estructurales en el patrón de organización sináptica en esta área (Raisman y Field, 1973), el APo ha representado desde entonces un modelo biológico muy importante en el estudio del desarrollo y consolidación de las diferencias sexuales en el sistema nervioso de mamíferos. Asimismo, mediante estudios inmunocitoquímicos, se ha mostrado la existencia de dimorfismo sexual en el patrón de distribución de cuerpos celulares, densidad sináptica (Larriva-Sahd, 1991) y de fibras que contienen diversos tipos de neurotransmisores y neuromoduladores, entre los que se incluyen vasopresina (Crenshaw, et al , 1992), colecistoquinina (Larriva-Sahd, et al , 1986), galanina (Finn, et al , 1996), péptidos opiodes (Watson, et al . 1986) y tirosina hidroxilasa (Simerly, et al . 1985) entre otros.

A partir de los trabajos de Gorski y cols en 1986 se descubrió un núcleo localizado en el área preóptica medial, el cual ha sido llamado núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (NSD-APo) debido a que es 5 a 7 veces más voluminoso en el macho que en la hembra. El significado funcional de esta diferencia se ha logrado establecer por diversos autores mediante la lesión de esta estructura y la subsecuente repercusión sobre la conducta sexual masculina (De Jonge, et al, 1989). Asimismo, los trabajos de Houtsmuller y cols (1994) demuestran que el tratamiento perinatal con ATD disminuye el tamaño de este núcleo, lo cual se correlaciona con una disminución en la conducta sexual del macho (Houtsmuller, et al, 1994).

El número de neuronas que componen a este núcleo es significativamente mayor en los machos a partir del primer día de vida postnatal (Jacobson, et al, 1980). Posteriormente, en el macho, el volumen de este núcleo continúa incrementándose durante los siguientes 7 a 10 días, mientras que en la hembra no se registran cambios significativos durante este mismo período (Fig 6).

Asimismo, se ha logrado establecer el efecto de las hormonas gonadales y su influencia en el establecimiento de esta diferencia estructural. Se ha demostrado que la administración de T a hembras a partir del día 16 posteriores a la fertilización y durante los 10 primeros días de su vida postnatal provoca un incremento significativo en el volumen de este núcleo, siendo comparable al que se observa en los machos intactos (Fig 7). De manera inversa, se ha demostrado que la gonadectomía de machos al nacimiento induce una disminución de un 50% en el volumen de este núcleo con respecto al macho control (Jacobson, et al, 1980). Sin embargo, este efecto puede ser restituido si el macho es tratado 24 horas posteriores a la castración con T exógena, probando así la dependencia a esta hormona (Jacobson, et al, 1981).

El mecanismo mediante el cual los esteroides sexuales presentes durante la etapa perinatal ejercen sus efectos organizacionales sobre esta estructura, aún no ha sido esclarecido. Sin embargo, recientemente se ha sugerido un papel de los esteroides sexuales en la regulación de la muerte celular por apoptosis en las neuronas que forman parte de los núcleos sexualmente dimórficos (Davis, et al, 1996; Oppenheim, 1991). Nordeen y cols en 1985 cuantificaron la influencia de la T sobre la muerte celular en las neuronas que proyectan hacia el músculo bulbocavernoso y elevador del ano. Así como en el grupo de

motoneuronas que constituyen al núcleo dorsolateral, las cuales proyectan hacia el músculo isquiocavernoso. Este sistema neuromuscular, que es sexualmente dimórfico en la rata, controla los reflejos penéanos que son indispensables para la conducta de copulación. La evidencia del papel de los andrógenos en el proceso de diferenciación y establecimiento de esta diferencia estructural se observa cuando en hembras, que han sido tratadas con T o DHTI durante la vida perinatal, ocurre un aumento en el número de neuronas que forman parte de estos núcleos y cuando en ratas macho, que son tratadas con un antiandrógeno como la flutamida durante su vida perinatal, muestran un decremento en la supervivencia neuronal, sugiriendo que la T y sus metabolitos previenen la muerte celular programada de ciertas neuronas.

El arquistriatum (AR), el mayor de los núcleos que se encuentra relacionado con el control de las conductas de cortejo en las aves, pasa a través de un período ontogénico de muerte celular, el cual parece ser mayor en el caso de las hembras. Se ha propuesto que pudieran ser los esteroides sexuales los que se encuentren controlando el índice de muerte neuronal en este núcleo, estableciéndose de esta manera las diferencias de volumen entre ambos sexos (Konishi y Akutagawa, 1985).

Con relación al NSD-APO, se ha descrito un papel similar de la T en el establecimiento del dimorfismo sexual que se observa en esta estructura al descrito anteriormente en el núcleo espinal del sistema bulbocavernoso y en el AR. La incidencia de apoptosis en este núcleo es mayor en ratas hembras entre el día postnatal P7 y P10. Por el contrario, en ratas macho, sólo se observa un pico en la incidencia de apoptosis, el cual tiene lugar en P6. Asimismo, los autores muestran que la T reduce la incidencia de apoptosis en las neuronas del NSD-APO, con lo que la administración de T a machos que han sido gonadectomizados muestra claros efectos en la inhibición del proceso de apoptosis, disminuyendo significativamente la incidencia de células picnóticas (Davis, et al., 1996).

Este hecho, aunado a los resultados obtenidos por otros grupos de investigación, refuerzan la hipótesis del papel tan importante que juegan los esteroides gonadales en la regulación de muerte celular programada durante el establecimiento de las diferencias sexuales estructurales.

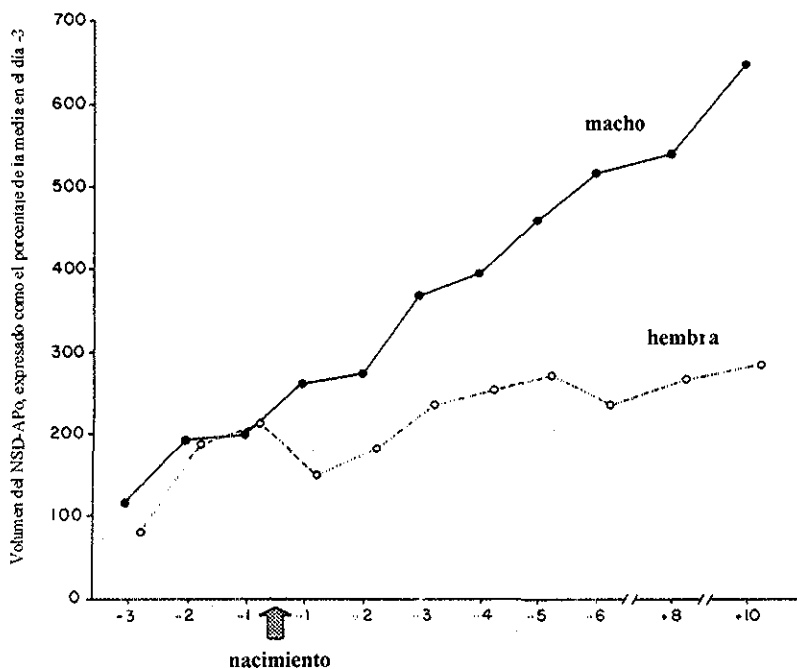


Fig 6 Modificación del volumen del NSD-APO a lo largo del desarrollo perinatal en ratas hembras y machos. El volumen de este núcleo se encuentra expresado como el porcentaje de la media de ratas macho y hembras sacrificadas el día E20, tres días antes del nacimiento (-3) (Tomado de Gorski, 1986)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

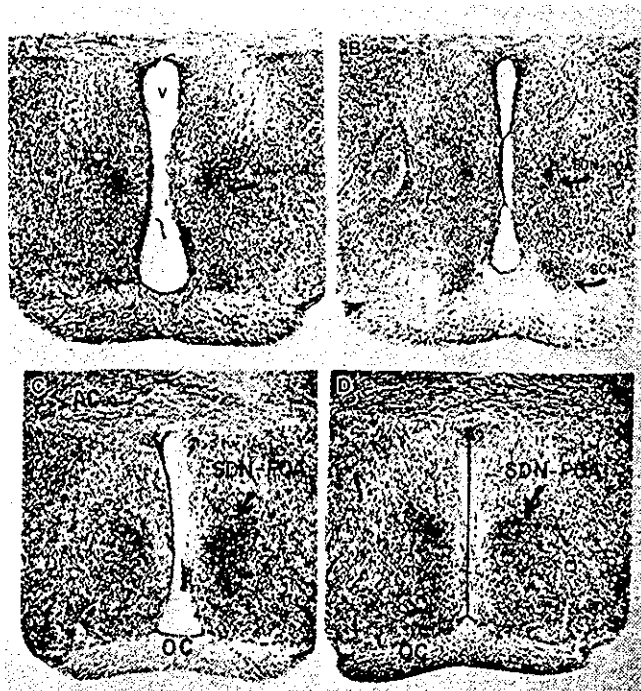


Fig 7 Dimorfismo sexual en el NSD-APo En esta figura se muestra, en cortes coronales, las diferencias en el volumen de este núcleo (flechas) en diferentes grupos de animales (A) machos, (B) hembras y (C) hembras tratadas de E16 a P10 con propionato de testosterona y dietilestilbestrol (D) AC, comisura anterior; OC, quiasma óptico; V, tercer ventrículo (Tomado de Gorski, 1986)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.4 COMISURA ANTERIOR

Los hemisferios cerebrales de los mamíferos se encuentran conectados en su línea media a través de tres principales sistemas comisurales: El cuerpo calloso (CC), la comisura anterior (CA) y la comisura hipocámpica. El CC constituye el más grande de ellos y se encuentra presente exclusivamente en los mamíferos Euterios; esta comisura interconecta grandes extensiones de la neocorteza y del neostriado. En contraste, la CA se encuentra presente en todos los mamíferos. En Prototerios y Metaterios se encuentra interconectando a todo el manto cortical de ambos lados, sin embargo, en Euterios, la CA interconecta una mayor parte de la paleocorteza y un sector lateral de la neocorteza que varía con las especies. En Euterios más evolucionados, la CA es principalmente un sistema comisural neocortical que posee un tracto adicional proveniente de la paleocorteza (Lent y Guimaraes, 1991) (Fig 8)

El CC, como se comentó anteriormente, es el principal tracto de interconexión entre ambos hemisferios. éste se encuentra constituido por fibras heterogéneas cuyos axones provienen de distintas áreas corticales (Lamantia y Rakic, 1990). Sobre esta estructura se ha demostrado que existen diferencias sexuales tanto en área, siendo mayor en la rata macho, (Zimmerberg y Mickus, 1990) como a nivel ultraestructural, en la distribución de axones mielínicos y amielínicos en la porción correspondiente al *genu* (Mack, et al, 1995). La comisura hipocámpica, la cual está presente en todos los mamíferos, puede ser subdividida en un tracto dorsal y ventral, además de presentar una decusación hipocámpica en los primates; esta estructura interconecta principalmente la arquicorteza y otras regiones de la corteza filogenéticamente antiguas (Brodal, 1981)

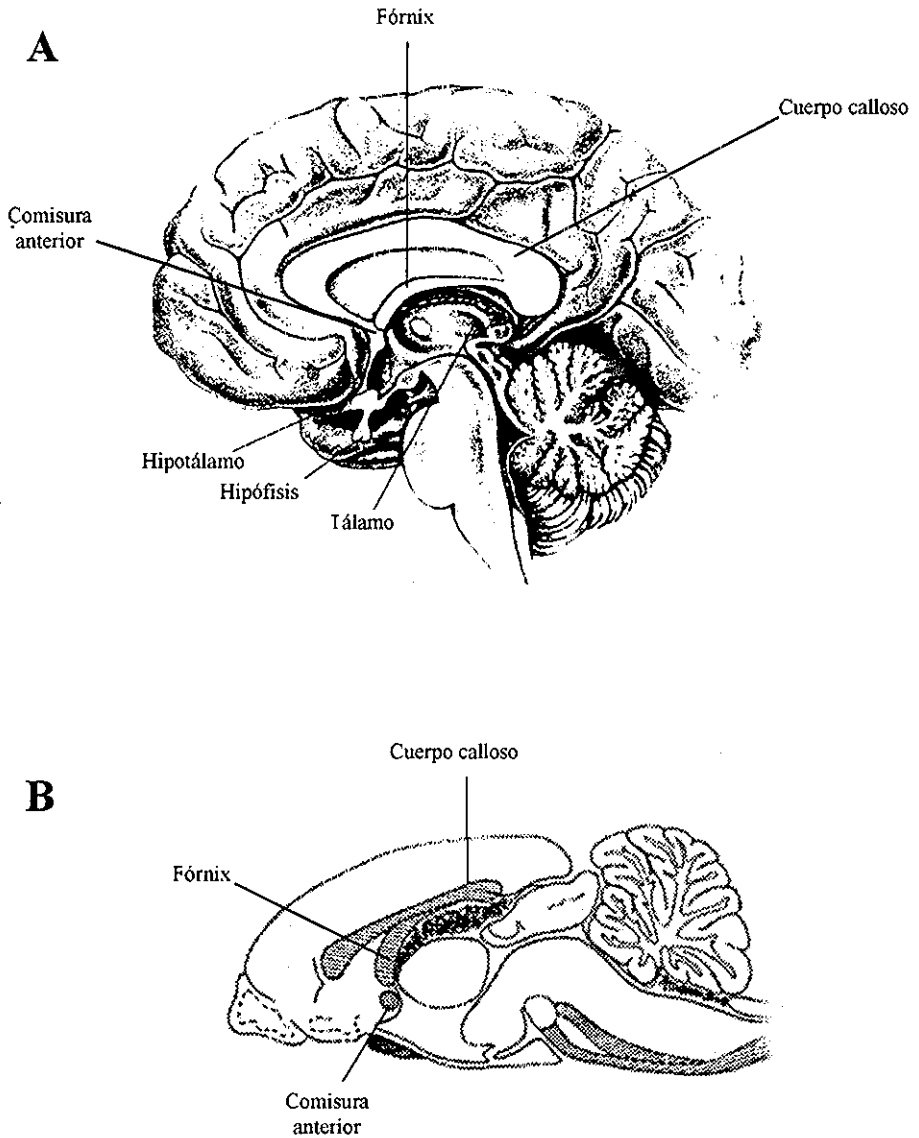


Fig 8 Corte sagital de un cerebro de humano (A) y de rata (B) que muestra la localización anatómica de los tres principales sistemas comisurales en mamíferos: Fórnix, cuerpo caloso y comisura anterior (Tomado de Kelly y Dodd, 1991)



## 2.4a Conectividad

### Vías Olfatorias

Desde el punto de vista filogenético, se acepta que el sentido del olfato es el más antiguo y primitivo de los sentidos. A la fecha, se sabe que éste desempeña una función fundamental en la supervivencia de ciertas especies animales, ya que interviene de manera directa en la conducta social (Loranca y Salas, 2001), de alimentación y sexual (Edwards, et al., 1990), además de asociarse de manera estrecha con procesos tales como memoria, emociones y motivación (Brodal, 1981).

La vía olfatoria se inicia en la mucosa olfatoria, donde se encuentran los receptores olfatorios representados por células nerviosas bipolares. Las fibras aferentes originadas en las células olfatorias sensoriales constituyen en su conjunto al primer par craneal (NI); los axones de los receptores, atraviesan la lamina cribosa del hueso etmoides y penetran al bulbo olfatorio. Aquí, hacen sinapsis con dendritas de las células mitrales y células en penacho dentro de la capa glomerular, llevándose a cabo la primera estación de procesamiento de la vía olfatoria y punto de partida para la transmisión central de los impulsos olfatorios. El bulbo olfatorio posee una estructura laminar en donde se distinguen distintos tipos neuronales organizados en diferentes estratos. Los axones de las células mitrales y en penacho proyectan a las capas más profundas del bulbo olfatorio, donde se unen para formar el tracto olfatorio lateral. Las fibras que constituyen este tracto mandan colaterales al núcleo olfatorio anterior y al tubérculo olfatorio, mientras que otras terminan directamente en la corteza piriforme, corteza periamigdalóide, parte lateral de la corteza entorrhinal (área 28 de Brodmann) y en algunos núcleos de complejo amigdalino (Fig. 9). Las fibras que llegan a la amígdala terminan principalmente en su núcleo corticomédial, aunque los núcleos basal y lateral también reciben información olfatoria de manera indirecta a través de la corteza piriforme (Brodal, 1981).

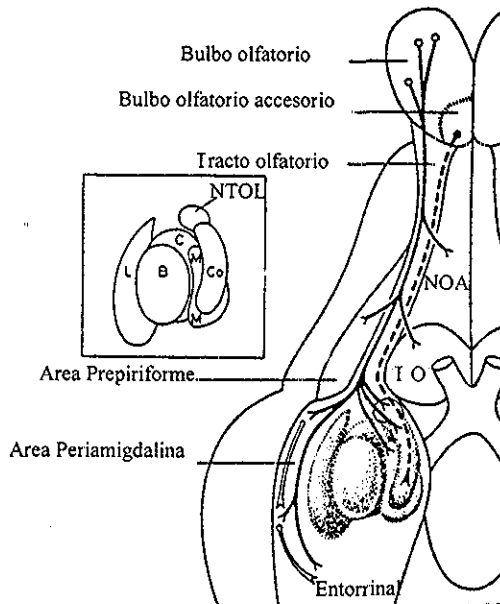


Fig. 9. Curso y sitios de terminación de las fibras eferentes del bulbo olfatorio principal (línea continua) y del bulbo olfatorio accesorio (línea discontinua). Asimismo, se muestran las proyecciones de la corteza periamigdaloides al área entorrinal (líneas blancas). En el recuadro se muestra un diagrama para la identificación de los núcleos que forman el complejo amigdalino. NTOL: núcleo del tracto olfatorio lateral L, lateral; B, basolateral; C, central; M, medial; Co, cortical; IO, tubérculo olfatorio y NOA, núcleo olfatorio anterior (Tomado de Brodal, 1981).

Las regiones corticales del lóbulo temporal que reciben fibras directas del bulbo olfatorio constituyen la corteza olfatoria primaria. En contraste con otras áreas sensoriales primarias, la corteza piriforme se localiza en la allocorteza y sus fibras aferentes sensoriales llegan directamente a esta región sin hacer un relevo previo en el tálamo.

En situación caudal con respecto al bulbo olfatorio se hallan dispersos grupos de neuronas que forman en su conjunto al núcleo olfatorio anterior (NOA), el cual también recibe aferencias del bulbo olfatorio. Las neuronas de este núcleo envían fibras hacia el NOA y bulbo olfatorio contralateral a través de la CA en su parte rostral, además de proyectar axones hacia las células granulares internas del bulbo olfatorio ipsilateral (Fig 10).

De la corteza olfatoria y amígdala, los impulsos olfatorios divergen a otras regiones del cerebro. Se acepta que las conexiones a otras partes de la corteza cerebral permiten la integración de la información olfatoria con otros tipos de modalidades sensoriales. Las conexiones olfatorias con la amígdala, como se detalla posteriormente, son de gran importancia no sólo porque la amígdala actúa sobre el hipotálamo, sino porque ésta influye sobre otras estructuras del sistema límbico. La mayor eferencia por parte de la amígdala es hacia el hipotálamo a través de un conjunto grueso de fibras que constituyen la estría terminal (ET), las cuales en su mayoría terminan en el núcleo ventromedial hipotalámico (NVMH) y área preóptica medial. De manera recíproca, existen proyecciones diencefálicas hacia algunos núcleos amigdalinos (De Olmos e Ingram, 1972 en Hines, et al., 1985). Existen otras vías por las cuales el hipotálamo recibe información olfatoria, al respecto se han descrito aferencias directas por parte del bulbo olfatorio hacia la corteza olfatoria primaria, y desde ésta, hacia la porción anterior del hipotálamo. Las conexiones olfatorias con el hipotálamo son de gran importancia en la realización de ciertas conductas, así, se sabe que la conducta sexual y función reproductiva se encuentran influenciadas de manera importante por impulsos olfatorios. En general, las áreas cerebrales relacionadas con la reproducción, muestran una estructura sexualmente dimórfica como lo son el área preóptica medial, ET, amígdala, NVMH, etc. Estas áreas se encuentran por lo general conectadas de manera recíproca, estableciendo así, circuitos neuronales encargados del control de diversas funciones sexualmente dimórficas, tales como la liberación cíclica de gonadotropinas en las hembras, conductas sexual, social, maternal, de alimentación, etc.

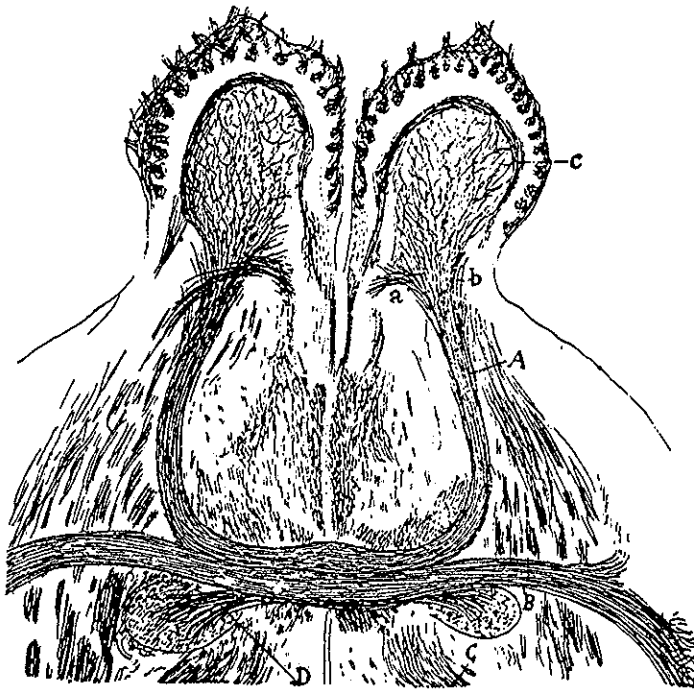


Fig 10 Corte horizontal de un cerebro de ratón neonato que muestra la CA y los bulbos olfatorios Tinción de Golgi (A), Parte rostral de la CA; (B), Parte caudal o temporal de la CA; (C), Fornix; (D), Fascículo de la ET; (a), Haz terminal dorsal de la CA; (b), Haz principal o lateral; (c), Plexo de fibras comisurales en la capa plexiforme interna (Tomado de Cajal, 1995)

LEER CON  
FALLA DE ORIGEN

La amígdala es una estructura localizada en la porción ventromedial del lóbulo temporal por debajo del manto cortical. Esta estructura se encuentra interconectada con la corteza cerebral adyacente, con el sistema olfatorio y el sistema estriatal, así como con algunas regiones del hipocampo, tálamo, hipotálamo y tallo cerebral (De Olmos, et al., 1985). La amígdala participa en la modulación de funciones endocrinas y en patrones de integración conductual tales como: defensa, ingestión, agresión, reproducción y aprendizaje (De Olmos, et al., 1985; Hamilton, 1976). La amígdala se encuentra compuesta de los siguientes grupos neuronales: a) Olfatorio, formado por la amígdala anterior, el núcleo del tracto olfatorio lateral, el extremo dorsal del núcleo amigdalino medial, los núcleos amigdalinos cortical anterior y posterolateral, así como el área de transición amigdalopiriforme. b) Medial, en este grupo se incluye a la amígdala medial, la porción posteromedial de la sustancia sublenticular inominada y las divisiones medial e intermedia del núcleo lecho de la estría terminal. c) Central, el cual incluye al núcleo central de la amígdala y la porción dorsolateral de la sustancia sublenticular inominada, así como las divisiones lateral y ventral del núcleo lecho de la estría terminal y d) Basolateral: el cual está constituido por los núcleos lateral, basolateral, basolateral ventral y basomedial.

El grupo amigdalino no sólo recibe proyecciones de un gran número de estructuras corticales y subcorticales, sino que también envía conexiones a diferentes estructuras mediante la ET y la vía conocida como amigdalofuga ventral (Hamilton, 1976; Leonard y Scott, 1971).

Estudios neuroanatómicos han mostrado que las fibras de la ET se originan preponderantemente de los núcleos basolateral y corticomédial. La ET ha sido dividida en tres componentes: el supracomisural, el comisural y el postcomisural (Leonard y Scott, 1971). Las fibras eferentes provenientes del núcleo basolateral y medial cursan por la ET y ascienden por la parte medial de la cola del núcleo caudado, ocupando después el surco tálamo-estriado y descienden hacia la CA, por la cual una gran parte de ellas pasan al hemisferio opuesto para seguir un trayecto inverso hasta alcanzar al complejo amigdalino y otras estructuras contralaterales (Hamilton, 1976; Kelley, et al., 1982; Krettek y Price, 1977; Leonard y Scott, 1971; McDonald, 1991).

Las conexiones interamigdalinas mediante el componente comisural han sido ampliamente discutidas por diferentes grupos de investigación. Por un lado, se ha

demostrado que mediante este componente se interconectan ambos complejos amigdalinos (Canteras, et al , 1992; Hamilton, 1976), sin embargo, Canteras y cols (1995) observaron mediante un trazador neuronal que fibras que emergen del complejo amigdalino cruzan por la CA pero no llegan a la amígdala contralateral (Canteras, et al , 1995) Nitecka y cols (1981) proponen que ambas amígdalas no se conectan mediante un componente comisural sino por otra vía diferente, sin cruzar por la vía comisural (Nitecka, et al , 1981)

En cortes sagitales u horizontales de la CA, se distinguen tres componentes delimitados : 1) Porción anterior o rostral "*pars* olfatoria" 2) Porción posterior o caudal "*pars* interhemisférica" y 3) Componente comisural de la ET Los orígenes y terminaciones de estos tres componentes varían entre las especies (DeOlmos e Ingram 1972; Jouandet, 1982; Jouandet y Gazzaniga, 1979)

Las células que originan los tres senderos de la CA de la rata han sido identificadas usando las técnicas para el trazado de vías, tales como el de la peroxidasa Mediante este tipo de estudios neuroanatómicos Jouandet y Hartenstein en 1983 determinaron las células que dan origen a la CA de la rata (Jouandet y Hartenstein, 1983) A partir de estos estudios se ha observado que la la porción rostral de la CA contiene fibras que se originan en el bulbo olfatorio, en donde se detecta un marcaje discreto en las capas granular y plexiforme interna sin embargo, el NOA constituye la fuente principal de fibras correspondiente a la porción anterior de la CA Aquí, se marcan células piramidales de la capa II y III que se encuentran en la parte externa, lateral, dorsal y medial En el tubérculo olfatorio se encuentran células bien marcadas en capas II y III, las cuales envían sus fibras a la parte más ventromedial de la porción anterior Las células piramidales y polimorfas localizadas en la capa II de la corteza piriforme anterior y células localizadas en la capa plexiforme de la corteza piriforme posterior también proyectan hacia el hemisferio contralateral a través de la CA (Fig 11)

En su porción caudal, la CA recibe la mayoría de sus fibras de células piramidales localizadas en la corteza piriforme posterior, corteza entorrinal y neocorteza, además de recibir una contribución sustancial del núcleo lateral amigdalino (NLA) (Fig 11)

Las células del núcleo del tracto olfatorio lateral (NTOL) dan lugar al componente comisural de la ET El núcleo amigdalino lateral (NAL) contiene muchas neuronas que proyectan en la CA, éstas envían sus axones a través de la porción ventromedial de la cápsula externa También se observan varias células en los núcleos basolateral (NBLA),

basomedial (NBMA) y cortical (NCA), incluyendo el componentes anterior, posterior y posteromedial del núcleo cortical amigdalino (NCAa, NCAp y NCApm, respectivamente), las cuales envían sus axones en el componente decusante de la EI (Guadaño-Ferraz, et al, 1994) (Fig. 11). Los axones del núcleo NBLA en un inicio se localizan medialmente para después posicionarse ventralmente con respecto a los del NLA. Finalmente, estos axones se tornan dorsalmente al lado medial del NLA. Más posteriormente la EI recibe muchos axones del núcleo NBMA, el cual envía sus axones directamente a la porción dorsal a la EI (Brodal, 1981; Jouandet y Hartenstein, 1983).

En el mono rhesus se ha encontrado que la CA se origina de células cuya distribución en la neocorteza temporal ocupa una zona mucho más extensa que la de otras especies (Jouandet y Gazzaniga, 1979). Por otro lado, estudios con peroxidasa en gatos revelan que un extenso campo neocortical da origen a la CA, mientras que la amígdala contribuye de manera mínima (Jouandet, 1982).

A partir de estas comparaciones interespecie, la CA parece haber sufrido una reorganización importante durante la evolución, desarrollándose un patrón distinto de conexiones interhemisféricas como consecuencia de un cambio evolutivo en las áreas corticales.

De lo anteriormente expuesto se infiere que la preponderancia de aferencias comisurales relacionadas con el olfato está en función del grado de desarrollo del sistema sensorial. Y en efecto, la representación numérica de fibras comisurales olfatorias es mínima en los tetrápodos microsmáticos con respecto a los macrosmáticos.

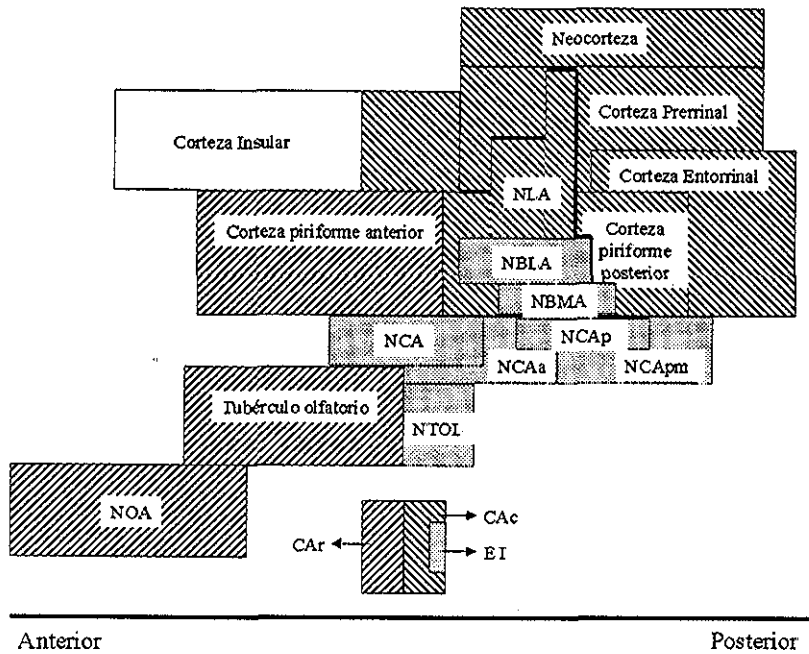


Fig 11 Representación esquemática de las diferentes regiones telencefálicas que proyectan sus axones a través de la comisura anterior (CA). Estas estructuras se encuentran representadas en su extensión antero-posterior. En tramas diagonales y dependiendo de su orientación se ejemplifican a aquellas regiones que proyectan a través del componente rostral (CAr) y caudal (CAc) de la CA. En cuadros se representan a las estructuras que constituyen el componente comisural de la estria terminal (ET). NLA: núcleo lateral amigdalino, NBLA: núcleo basolateral amigdalino, NBMA: núcleo basomedial amigdalino, NCA: núcleo cortical amigdalino, incluyendo sus tres componentes, anterior (NCAa), posterior (NCAp) y posteromedial (NCAPm). NTOL: núcleo del tracto olfatorio lateral. NOA: núcleo olfatorio anterior (Modificado de Guadaño-Ferraz et al, 1994).



## 2.4b Estructura Citológica e Histológica

En la CA de los roedores se distinguen dos áreas compuestas por sendos grupos axonales. El área rostral se encuentra formada por numerosos axones cubiertos por una gruesa capa de mielina, lo que le confiere un aspecto más osmofílico al microscopio de luz, y oligodendrocitos de gran tamaño. La porción caudal, que protruye hacia el tercer ventrículo, se encuentra recubierta por el epitelio ependimario (Fig 12) y se caracteriza por contener axones de menor diámetro cubiertos por una capa más delgada de mielina, además de contener oligodendrocitos de menor tamaño (Larriva-Sahd, et al, 1998). Los axones contenidos en la porción anterior llevan información del bulbo olfatorio principal y NOA al bulbo olfatorio del lado contralateral, así como al bulbo olfatorio y a la corteza piriforme. Además cabe señalar que algunas fibras de la EI originadas en la amígdala también atraviesan por la porción caudal de la CA (Fig 10 y 11) (De Olmos, et al, 1985). Mientras que, la parte posterior de la CA conecta el área ventral de la neocorteza temporal de cada lado y conlleva fibras decusantes de la EI (De Olmos, et al, 1985).

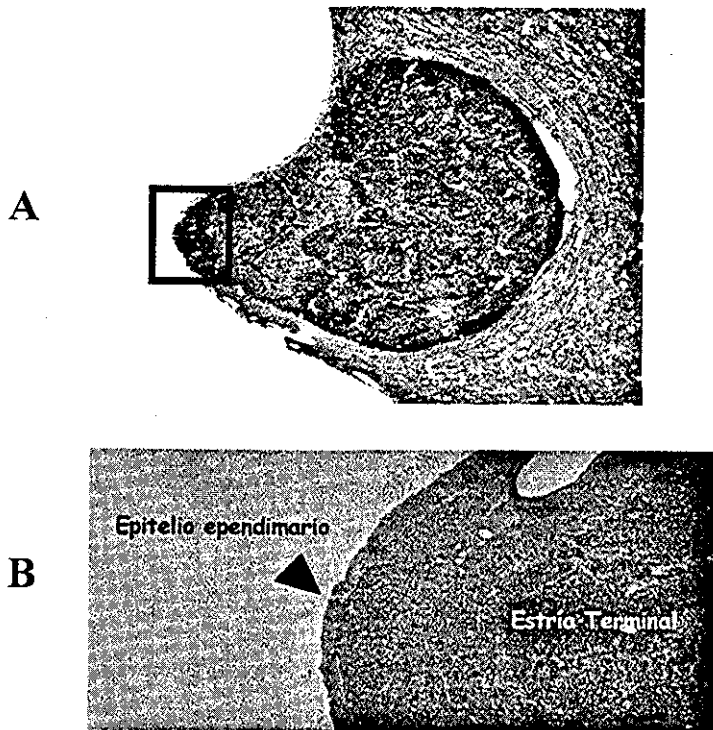


Fig. 12 Fotomicrografías tomadas al microscopio de luz de cortes de tejido de  $1\mu\text{m}$  de grosor a un aumento de 10x (A) y de 100x (B) en donde se muestran, en cortes sagitales de la CA, el epitelio endimario, el cual se encuentra recubriendo la porción caudal de la CA. En B se muestra un acercamiento del área señalada en el recuadro negro (A)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.4c Comisura anterior y dimorfismo sexual

Aunque la CA presenta una estructura relativamente sencilla (axones mielínicos y amielínicos, glía y capilares), reviste interés puesto que su tamaño varía significativamente en función del sexo (Noonan, et al , 1998) Se ha propuesto que la CA presenta variación entre ambos sexos, puesto que las neuronas que proyectan a través de ella proceden de núcleos que captan y metabolizan esteroides gonadales, además de tener estrecha relación con las funciones reproductivas (Larriva-Sahd, et al , 1998).

Sobre la CA se ha hecho poco al respecto, Allen y Gorski en 1991, describieron la existencia de diferencias sexuales neuroanatómicas en cortes sagitales de cerebros humanos, en los cuales se observa que la hembra posee un área 12% mayor que la del macho, a pesar de que el peso total del cerebro completo es hasta 6 7% mayor en las hembras, sin embargo el significado funcional de esta diferencia se desconoce En trabajos recientes se ha demostrado, que al igual que en el humano (Allen y Gorski, 1991), la CA presenta dimorfismo sexual en cuanto al área, proponiéndose que tal diferencia resulte del efecto organizacional de las hormonas gonadales sobre los cuerpos neuronales cuyos axones proyectan a través de ella, ya que se ha demostrado que dichas neuronas captan y metabolizan hormonas esteroides (Nishizuka y Arai, 1981; Roos, et al , 1988) Si bien algunos trabajos realizados sobre esta estructura demuestran que es factible que ciertos factores ambientales, tales como la exposición al alcohol y/o la desnutrición durante la vida temprana (Noonan, et al , 1998; Zimmerberg y Mickus, 1990), así como el estrés (Jones, et al , 1997) pueden influir sobre las dimensiones de la CA, pocos autores han tratado de demostrar que las hormonas gonadales pudieran estar involucradas en el proceso de diferenciación de esta estructura (Larriva-Sahd, et al , 1998). Sin embargo, a partir de los trabajos mencionados anteriormente, no se ha podido establecer si la diferencia sexual en el área de la CA resulta de diferencias en tamaño y número axonal o bien en la densidad de las células gliales y/o vasos sanguíneos

Se ha propuesto que las variaciones que pudieran ser encontradas en el área de la CA, resultan del efecto organizacional de los esteroides gonadales sobre los cuerpos neuronales cuyos axones proyectan a través de ella, ya que se ha demostrado que dichas neuronas captan y metabolizan T y E (Simerly, et al , 1990)

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ha sido comentado, las hormonas sexuales ejercen sus efectos sobre estructuras involucradas con aspectos reproductivos al actuar de dos distintas maneras; durante la vida prenatal y postnatal temprana estas hormonas organizan los sustratos neuroanatómicos, los cuales son activados posteriormente durante la vida adulta en presencia de estas mismas hormonas. Los trabajos realizados en la CA muestran que las dimensiones de esta estructura pueden variar dependiendo de una gran diversidad de factores presentes en la vida prenatal *vs* exposición al alcohol, desnutrición y niveles de hormonas tiroideas (Guadaño-Ferraz, et al, 1994) entre otros. Sin embargo, el papel de las hormonas esteroides sexuales de origen gonadal en el proceso de diferenciación de esta estructura ha sido poco estudiado (Larriva-Sahd, et al, 1998). Dado que un gran número de estructuras del SNC relacionadas con funciones reproductivas muestran dimorfismo sexual como resultado de los efectos organizacionales de las hormonas esteroides de origen gonadal durante la vida prenatal, en este trabajo se analiza la posibilidad de que la CA sea una estructura sexualmente dimórfica. Esto fundamentado en el hecho de que los axones que proyectan a través de ella provienen de neuronas localizadas en áreas relacionadas con los procesos reproductivos. Asimismo, en este trabajo se analizará el papel de los esteroides gonadales en el proceso de diferenciación de esta estructura.

A excepción del núcleo espinal del bulbo cavernoso, en el que se conoce el número de neuronas (Breedlove y Arnold, 1980), el resto de las estructuras sexualmente dimórficas del SNC están representadas por diferencias en el tamaño de algunos núcleos, densidad sináptica y fascículos de axones poco definidos lo que ha dado lugar a divergencias de apreciación, cuestionando así la reproducibilidad de las observaciones. Ejemplos de ello lo son el volumen del llamado NSD-APo (Gorski, et al, 1978), de la amígdala (Nishizuka y Arai, 1981), de la porción ventrolateral del NVMH (Matsumoto, 1992) y del núcleo arcuato (Arai y Matsumoto, 1978), entre otros; lo mismo resulta cierto para la densidad axonal de los tractos hipotálamo-periventricular (Simerly, et al, 1984) y las fibras del núcleo lecho de la EI hacia el núcleo anteroventral periventricular (Hutton, et al, 1998). A este respecto, el modelo de la CA ofrece la ventajosa característica de estar claramente circunscrita. Así, en cortes sagitales está delimitada posteriormente por el III ventrículo y rostralmente por

neuropilo y neuronas septo-preópticas (Larriva-Sahd, et al , 1998) Más aún, la CA contiene un número definible de axones, lo cual favorece la evaluación de los cambios inducidos por las variables experimentales y su reproducibilidad Por las razones enumeradas, hemos escogido el modelo de la CA para evaluar el posible efecto de la T en el establecimiento y diferenciación de tractos interhemisféricos

#### **4. HIPOTESIS**

La estructura de la comisura anterior de la rata presenta diferencias estructurales entre los sexos, y éstas dependen de las hormonas sexuales esteroideas de origen gonadal durante la etapa perinatal

#### **5. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES**

##### **Generales**

- Describir las características morfológicas de la CA de la rata

##### **Particulares**

- Determinar la existencia de posibles diferencias cualitativas y/o cuantitativas en función del sexo
- Establecer la dependencia hormonal de estas diferencias mediante la supresión (control negativo) y la supresión y restitución (control positivo) de testosterona en ratas macho
- Determinar el efecto del tratamiento perinatal con testosterona sobre el área de la CA en ratas hembra
- Investigar el papel de la aromatización de la testosterona en el establecimiento de esta estructura

neuropilo y neuronas septo-preópticas (Larriva-Sahd, et al , 1998) Más aún, la CA contiene un número definible de axones, lo cual favorece la evaluación de los cambios inducidos por las variables experimentales y su reproducibilidad Por las razones enumeradas, hemos escogido el modelo de la CA para evaluar el posible efecto de la T en el establecimiento y diferenciación de tractos interhemisféricos

#### **4. HIPOTESIS**

La estructura de la comisura anterior de la rata presenta diferencias estructurales entre los sexos, y éstas dependen de las hormonas sexuales esteroideas de origen gonadal durante la etapa perinatal

#### **5. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES**

##### **Generales**

- Describir las características morfológicas de la CA de la rata

##### **Particulares**

- Determinar la existencia de posibles diferencias cualitativas y/o cuantitativas en función del sexo
- Establecer la dependencia hormonal de estas diferencias mediante la supresión (control negativo) y la supresión y restitución (control positivo) de testosterona en ratas macho
- Determinar el efecto del tratamiento perinatal con testosterona sobre el área de la CA en ratas hembra
- Investigar el papel de la aromatización de la testosterona en el establecimiento de esta estructura

neuropilo y neuronas septo-preópticas (Larriva-Sahd, et al , 1998) Más aún, la CA contiene un número definible de axones, lo cual favorece la evaluación de los cambios inducidos por las variables experimentales y su reproducibilidad Por las razones enumeradas, hemos escogido el modelo de la CA para evaluar el posible efecto de la T en el establecimiento y diferenciación de tractos interhemisféricos

#### **4. HIPOTESIS**

La estructura de la comisura anterior de la rata presenta diferencias estructurales entre los sexos, y éstas dependen de las hormonas sexuales esteroideas de origen gonadal durante la etapa perinatal

#### **5. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES**

##### **Generales**

- Describir las características morfológicas de la CA de la rata

##### **Particulares**

- Determinar la existencia de posibles diferencias cualitativas y/o cuantitativas en función del sexo
- Establecer la dependencia hormonal de estas diferencias mediante la supresión (control negativo) y la supresión y restitución (control positivo) de testosterona en ratas macho
- Determinar el efecto del tratamiento perinatal con testosterona sobre el área de la CA en ratas hembra
- Investigar el papel de la aromatización de la testosterona en el establecimiento de esta estructura

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. GRUPOS EXPERIMENTALES

Con el propósito de describir las características histológicas y ultraestructurales de la CA, así como determinar el posible efecto de las hormonas sexuales esteroideas sobre el establecimiento de las características estructurales propias de cada sexo, se utilizaron 82 ratas de la cepa Sprague Dawley, las cuales fueron divididas en los siguientes grupos experimentales:

1. Hembras control (HC) n=10
2. Machos control (MC) n=10
3. Machos gonadectomizados al nacimiento (Mgx) n=10
4. Machos gonadectomizados al nacimiento y tratados con propionato de testosterona (MgxT) n=20
5. Hembras tratadas perinatalmente con propionato de testosterona (PI) (HI) n=20
6. Hembras tratadas con AID (inhibidor para aromataasa :1,4,6-androstiatreno-3.17 diona) (H+AID) n=6
7. Machos tratados con AID (M+ AID) n=6

Para la formación de estos grupos se requirieron machos de la cepa Sprague Dawley en edad reproductiva y sexualmente experimentados; estos fueron usados para fecundar a hembras de la misma cepa de entre 10 a 12 semanas de edad y con un peso de entre los 290 y 320 gr. Los animales usados provinieron de la colonia del Centro de Neurobiología. Las ratas se mantuvieron en cajas individuales en un cuarto del bioterio con temperatura (23-25° C) y humedad (50-60% h r ) controlados y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas cada uno. Fueron alimentados con alimento Purina y agua *ad libitum*. Para determinar la etapa del ciclo estral de las hembras se observaron al microscopio de luz frotis vaginales teñidos con azul de toluidina. Los animales en estro se aparearon durante la noche y al día siguiente se realizó nuevamente otro frotis para determinar la presencia de espermatozoides, con lo que se estableció el inicio de la gestación y la duración de ésta. En todos los grupos



experimentales, las crías nacieron el día 23 de gestación (día P0) Cada camada se ajustó con sólo 8 a 10 crías A partir del nacimiento, las crías de cada grupo experimental recibieron un tipo particular de tratamiento El destete de las crías se realizó en el día 25 posterior al nacimiento para todos los grupos. Todos los animales fueron sacrificados a las 12 semanas de edad (P 84)

### **1. Hembras control (HC)**

Los animales de este grupo (n=10) fueron tratados diariamente a partir de su nacimiento (P0) con 0.1ml de aceite de girasol mediante una inyección subcutánea (SC) hasta el día 10 postnatal (P10) A las 12 semanas de edad se realizaron frotis vaginales para determinar la etapa del ciclo en la que se encontraban y sacrificarlas durante la etapa de estro a fin de restringir la posibilidad de diferencias anatómicas en la CA a lo largo de este ciclo; por lo que necesariamente hubo una variación de edad de 1 a 3 días

### **2. Machos control (MC)**

De manera similar al grupo anterior, los MC (n=10) fueron tratados con el mismo volumen de aceite de girasol a partir de P0 a P10 mediante inyecciones SC

### **3. Machos gonadectomizados al nacimiento (Mgx)**

Las crías machos, dentro de una misma camada (n=10), fueron castradas el mismo día de su nacimiento dejando un intervalo de alrededor de 2 horas posteriores al nacimiento Las castraciones se realizaron bajo crioadestesia, a lo largo de un período no mayor a 10 minutos Una vez anestesiada la cría, y con ayuda de un microscopio de disección (modelo GZ4, Leica), se realizó una incisión suprapúbica, de manera cuidadosa se disecó por planos, se identificó y cortó a cada lado el testículo, disecándolo desde su porción hiliar Finalmente se dieron 2 puntos de sutura en el lugar de la incisión

#### 4. Machos gonadectomizados al nacimiento y tratados con PT (MgxI)

En este grupo, 10 ratas fueron tratadas diariamente con inyecciones subcutáneas (SC) de 0.2mg de PT (Sigma) disuelto en aceite de maíz durante los 10 días posteriores al nacimiento, mediante una jeringa tipo Hamilton. Un segundo grupo (n=10) recibió una dosis mayor (1mg), aplicada por la misma vía y a lo largo del mismo lapso. De manera análoga al grupo anterior, los machos fueron castrados aproximadamente a las 2 horas posteriores al nacimiento, siguiendo el protocolo arriba detallado.

Una vez terminada la cirugía se inició el tratamiento con PT por vía SC. En el caso del grupo que recibió la dosis de 0.2mg de PT se administró a cada animal una cantidad de 0.01ml a partir de una dilución de 20 mg de PT en 1ml de aceite de girasol, equivalente a una dosis de 0.2mg de PT. Esta misma dosis se continuó aplicando diariamente hasta los 10 días de edad.

#### 5. Hembras tratadas perinatalmente con PT (HI)

Dentro de este grupo también se incluyeron dos dosis diferentes en animales obtenidos mediante el tratamiento *in utero* aplicado a hembras preñadas, las cuales recibieron en uno de los grupos (n=10) 1 mg de PT (Sigma) SC desde el día 18 de gestación (E18) hasta el día 0. Al finalizar la gestación (E23), las madres se anestesiaron con pentobarbital y se obtuvieron a las crías mediante cesárea, debido a que el parto en estos animales no se desencadenó de manera espontánea; posteriormente, las crías fueron tratadas diariamente hasta P10 con 0.2 mg de PT, SC.

Un segundo grupo (n=10) se obtuvo de la misma manera que el anterior, excepto que la dosis se incrementó a 2mg *in utero* y porque las inyecciones posteriores a la cesárea fueron de 1 mg.

Dada la imposibilidad de las madres para continuar con la lactancia, de manera paralela se obtuvieron nodrizas que ofrecieron lactancia a las crías de estos grupos.

## **6. Hembras tratadas con ATD (inhibidor para aromatasa :1,4,6 androstiatreno-3,17-diona)**

Hembras preñadas recibieron implantes SC de cápsulas de silastic rellenas con ATD (Steraloids, Inc) (20 x 1 5mm de diámetro interior) a partir del día E16 Posteriormente, los recién nacidos (n=6) fueron inyectados una vez al día vía SC con ATD (1mg/cría), disuelto en una solución de propilenglicol al 90% y etanol al 10% los días P1, P3, P5, P7 y P9

## **7. Machos tratados con ATD**

De manera similar al grupo anterior, este grupo se obtuvo mediante el tratamiento de hembras preñadas que recibieron durante la gestación ATD mediante implantes SC de cápsulas de silastic De igual manera, las crías macho (n=6) en este caso fueron inyectadas los días P1, P3, P5, P7 y P9

## 6.2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez que los sujetos cumplieron las 12 semanas de edad fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital, administrado intraperitonealmente, y sacrificados mediante perfusión a través del ventrículo izquierdo, previa heparinización intracardiaca, con aproximadamente 200ml de una solución fijadora consistente en: paraformaldehído al 4% y glutaraldehído 2% disueltos en buffer de fosfatos al 0.15 M pH 7.4. Los cerebros fueron disecados e inmersos en fijador fresco, donde se mantuvieron durante una noche a 4°C. Al día siguiente, los cerebros fueron transferidos a un amortiguador de fosfatos 0.15M pH 7.4. Sobre estos cerebros se realizaron cortes seriados de 120  $\mu\text{m}$  con un vibratomo (Vibratome series 1000, Technical Products International Inc) en el plano sagital. Para asegurar un plano consistente de corte, sólo fueron incluidos aquellos cortes en los que la CA se encontraba cubierta en su parte posterior por el epitelio ependimario del III ventrículo. De cada corte se obtuvo el área correspondiente a la CA con la ayuda de un microscopio de disección; cada bloque de tejido que mostró la estructura de interés se marcó en uno de sus extremos con la finalidad de orientarlo de manera adecuada al realizar la inclusión en plano. Posteriormente, los tejidos se colocaron en viales individuales y fueron postfijados durante una hora en tetróxido de osmio al 1% disuelto en el mismo amortiguador, seguido de la deshidratación de los tejidos en acetona diluida al 60%, 70%, 80%, 90% y absoluta. Una vez deshidratados, los tejidos se infiltraron e incluyeron usando resinas epóxicas. Los bloques incluidos fueron polimerizados en un horno a 60 °C por un período de 24 a 48 horas.

Posteriormente, una vez talladas las pirámides, sobre cada bloque de tejido se realizaron cortes gruesos hasta llegar a semifinos (450  $\mu\text{m}$ ) usando para ello cuchillas de vidrio. Los cortes obtenidos de cada bloque fueron montados, teñidos con azul de toluidina y analizados bajo el microscopio de luz (BX50, Olympus).

### **6.3. MORFOMETRÍA**

#### **6.3a Microscopía de luz**

Mediante la observación de los cortes semifinos se seleccionaron los campos microscópicos de cortes sagitales mostrando la totalidad de la CA. El análisis morfométrico de cada una de las muestras se realizó en la unidad de Imágenes de este Centro. Para el análisis morfométrico, las imágenes de la CA fueron capturadas a un aumento de 10x y analizadas sobre un monitor usando el programa de IPLab. A partir de estas imágenes capturadas se obtuvieron las mediciones en  $\mu\text{m}^2$  del área total de los componentes: rostral (CAr), caudal (CAc) y total. De igual manera, para evaluar la posible participación del componente vascular, se realizó una estimación del área capilar en los componentes rostral y caudal de la CA. Este procedimiento permitió evaluar las posibles diferencias en el área sagital de la CA a expensas del componente neural contenido en la propia CA.

#### **6.3b. Estadística**

Las diferencias de área entre cada uno de los grupos control y experimental fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada variable dependiente. A aquellas variables que resultaron ser significativas entre grupos mediante ANOVA ( $p < 0.05$ ) se les realizaron pruebas a posteriori "Newman-Keuls" para saber entre qué grupos se encontraban las diferencias. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

#### **6.3c. Microscopía electrónica**

Por otro lado, de los mismos bloques de tejidos correspondientes a los grupos de: HC, MC, Mgx, HAID y MAID se realizaron cortes finos de 800 a 900 nm, los cuales fueron montados en rejillas de cobre de una perforación cubierta previamente con una membrana de formvar. Los cortes finos fueron contrastados con sales de uranio y plomo y se observaron con el microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM-10 A). El análisis

morfológico se realizó sobre impresiones en papel de la CA correspondientes a un área de  $299 \mu\text{m}^2$ . Dado que la CA muestra cierto grado de heterogeneidad en el diámetro de sus fibras, se obtuvieron aleatoriamente 6 impresiones de campos microscópicos para cada parte de la CA (Fig 13), lo cual permitió visualizar todos los tipos de poblaciones axonales que la contienen. Sobre cada impresión se hizo un conteo directo de todos los axones mielínicos para obtener la densidad axonal para cada animal.

Los seis valores obtenidos para cada región de la CA se promediaron para obtener un valor que representara una media rostral y caudal para cada sujeto experimental. Asimismo, para hacer una inferencia acerca del número total de axones para cada una de las porciones de la CA se tomó en cuenta el área total calculada para cada una de estas porciones y, posteriormente, la razón de esto fue multiplicada por la media calculada para cada región de la CA. Esto se ejemplifica de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Área rostral o caudal en } \mu\text{m}^2}{299 \mu\text{m}^2} \times \text{Media del \# de axones rostrales o caudales} = \text{Número total de axones}$$

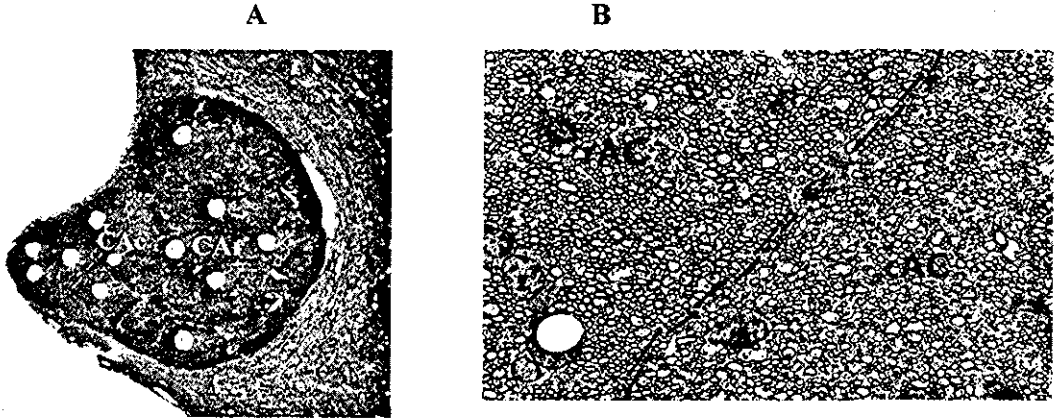


Fig 13. Fotomicrografía de luz, a un aumento de 10x, en donde se señalan las áreas seleccionadas en cada porción de la CA para hacer el conteo sobre impresiones en papel del numero de axones mielínicos (A). En (B), se muestra una impresión de una fotomicrografía de la CA, tomada en el microscopio electrónico, que muestra los axones mielínicos en ambas porciones de la CA.

### 6.3d. Estadística

Los resultados fueron analizados mediante pruebas estadísticas de ANOVA de una sola vía. Las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ . Aquellas pruebas que resultaron ser significativas fueron sometidas a pruebas a posteriori (post hoc), como la mencionada anteriormente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 7. RESULTADOS

### 7.1 ANALISIS HISTOLÓGICO

#### 7.1a Estructura microscópica de la CA

La descripción que a continuación se presenta se aplica a todos los grupos experimentales

El análisis de cortes sagitales de la CA bajo el microscopio de luz y electrónico muestra que esta estructura de forma semielíptica se encuentra compuesta de dos grupos axonales, los cuales se agrupan entre sí formando dos áreas claramente discernibles. La porción caudal protruye hacia el III ventrículo y se caracteriza por estar cubierta en todo su contorno posterior por el epitelio ependimario (Figs 14, 15 y 16). La porción rostral, que es por regla de mayor dimensión que la porción caudal, se caracteriza por ser más osmofílica, lo cual se explica por la presencia de numerosos axones cubiertos por una gruesa capa de mielina; además de contener oligodendrocitos con núcleos de forma ovalada de 7 a 10  $\mu\text{m}$  con escaso citoplasma (Figs 14 y 15). En contraste, la CAC se encuentra compuesta por un menor número de finos axones que se encuentran cubiertos por una delgada capa de mielina, lo cual le da un aspecto relativamente pálido a esta porción de la CA; además de contener oligodendrocitos de menor tamaño con núcleos de 4 a 5  $\mu\text{m}$ . Aunado a lo anterior, entre ambas porciones de la CA se encuentran oligodendrocitos alineados, lo cual contribuye de manera adicional a la clara demarcación que existe entre ambas regiones.

Dentro de la CAC, en una región circunscrita adyacente al epitelio ependimario, se observa una población axonal distinta del resto de la porción caudal caracterizada por una mayor densidad de axones pequeños moderadamente mielinizados y con una escasez relativa de fibras amielínicas. Lo anterior condiciona una mayor osmofilia en esta región con respecto al resto de la CAC y le permite su clara identificación. Este conglomerado de fibras que se aprecia más cromófilo que el resto de la CAC corresponde a las fibras procedentes de la EI (Figs 14 y 15).



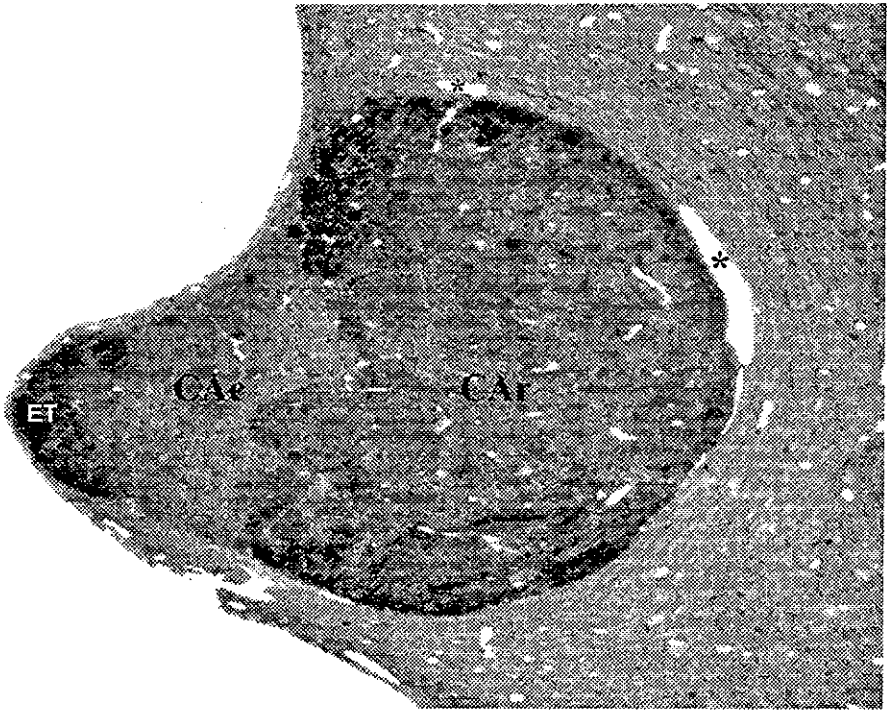


Fig. 14 Fotomicrografía de luz de  $1\mu\text{m}$  de grosor a un aumento de  $10\times$ . Se muestra un corte sagital representativo de la CA procedente de un animal hembra control, en el cual se puede apreciar las porciones rostral (CAr) y caudal (CAc) de la comisura anterior. Nótese que la porción caudal, la cual protruye hacia el III ventrículo (III V) y que se encuentra cubierta por el epitelio endimario, se observa menos cromófila que la CAr. También se identifica, dentro de CAc, una región más cromófila correspondiente a las fibras decusantes de la EI. Los asteriscos (\*) corresponden a capilares sanguíneos.

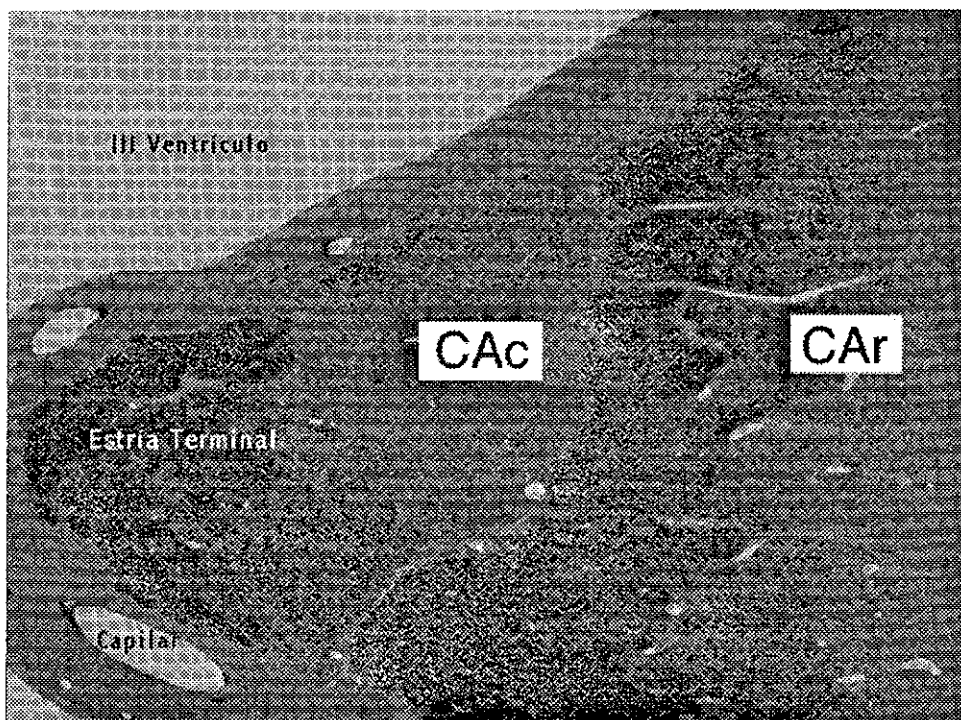


Fig. 15 Fotomicrografía de luz de  $1\mu\text{m}$  de grosor a un aumento de  $40\times$ . Se muestra un corte sagital representativo de la CA procedente de un animal macho gonadectomizado, en el cual se puede apreciar las porciones rostral (CAr) y caudal (CAc) de la comisura anterior. Nótese que la porción caudal, la cual protruye hacia el III ventrículo y que se encuentra cubierta por el epitelio ependimario, se observa menos cromófila que la CAr. También se identifica, dentro de CAc, una región más cromófila, correspondiente a las fibras decusantes de la ET.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

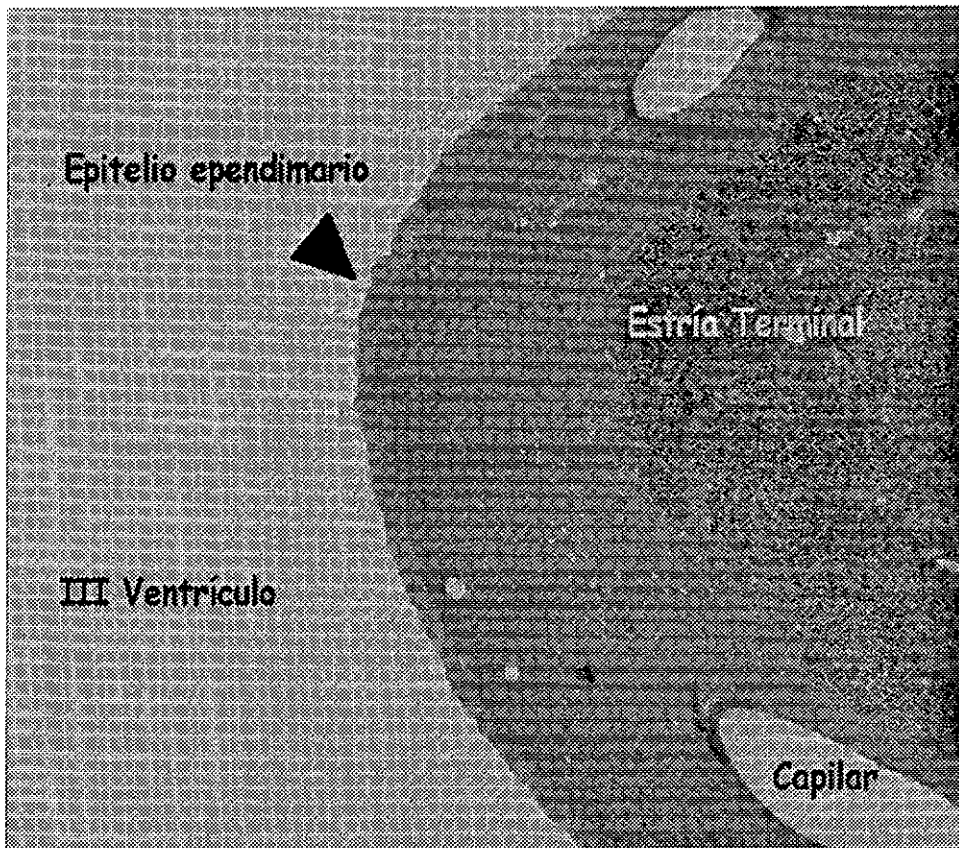


Fig 16. Fotomicrografía de luz de 1  $\mu$ m de grosor a un aumento de 100x. Se muestra un corte sagital representativo de la CA procedente de un macho gonadectomizado. Se puede apreciar que la porción caudal, la cual protruye hacia el III ventrículo se encuentra cubierta por el epitelio ependimario (cabeza de flecha). También se identifica, dentro de la CAC, una región más cromófila correspondiente a las fibras decusantes de la ET.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El estudio morfométrico de la CA se realizó en tejidos procedentes de 82 ratas de la cepa Sprague Dawley. Los animales se agruparon con una n=10 para cada uno de los siguientes grupos: HC, MC, MGx, MGxI y HI. Dentro de los dos últimos grupos, como ya se ha comentado en la sección de materiales y métodos, se incluyeron dos subgrupos que recibieron dos dosis diferentes de PI (n=10). Los grupos MAID y HAID cuentan con una n=6. Todos los animales fueron perfundidos a las 12 semanas de edad y en el caso de las hembras, todas éstas se encontraban en una misma etapa del ciclo estral (estro). Las muestras fueron obtenidas y procesadas de la misma manera para todos los grupos. Las observaciones bajo el microscopio de luz y electrónico demuestran que todos los tejidos incluidos en el análisis se encontraban en un buen estado de preservación, lo cual se determinó con base en los siguientes criterios: 1) Ausencia de células retraídas o hipercromáticas 2) Células de contornos regulares y ausencia de espacios intracelulares, perivascuales y pericelulares 3) Fascículos compactos de fibras mielínicas 4) Aspecto compacto en el neuropilo de los núcleos vecinos 5) Anulos de mielina de forma regular y concéntricos, así como ausencia de células hemáticas en los capilares sanguíneos (Peters, et al, 1976)

Para el análisis morfológico sólo fueron tomados en cuenta aquellos cortes en los cuales la CA se encontraba cubierta en toda su extensión ventricular por el epitelio ependimario, asegurándose de esta manera de incluir un solo plano de corte. La precisión en el plano de corte transversal de la CA se definió con base en los siguientes criterios de inclusión: 1) Presencia del epitelio cúbico simple del epitelio ventricular en la porción caudal de la CA; 2) Presencia de vasos retrocomisurales cortados longitudinalmente; 3) Identificación de las neuronas del área septo-preóptica en la parte rostral de la CA. A partir de las observaciones en estas condiciones se determinó que el tamaño y forma de la CA varían de manera importante entre los diferentes grupos experimentales e incluso entre sujetos de un mismo grupo, además de que la porción correspondiente a la EI presenta una apariencia distinta entre sujetos de los diferentes grupos.

## 7.2. MICROSCOPIA DE LUZ

### 7.2a Área total de la comisura anterior

El análisis estadístico de las áreas obtenidas en los grupos de hembras y machos control, muestra que éstas son significativamente distintas entre los sexos, encontrándose una mayor área en la totalidad de la CA en el caso del macho (Fig 17); en el cual la media del área total para cada uno de los grupos es de 200 y 230  $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ , respectivamente. Por otro lado, se observa que la gonadectomía del macho al nacimiento tiende a producir una disminución en el área total de la CA, debido a que no se encuentran diferencias significativas cuando se compara a este grupo con el de HC. Sin embargo, la reducción en el área total de la CA en el grupo Mgx no es tan severa, debido a que cuando este mismo grupo es comparado con el de MC no se observan diferencias significativas, por lo que parecería que la castración tiende a producir una reducción de esta área, pero no lo suficientemente grande para llegar a ser significativamente distinta del grupo control (Fig 17 A). Adicionalmente, se observa que cuando el grupo Mgx es tratado de manera exógena con PI (MgxI), el tratamiento es capaz de revertir los efectos de la gonadectomía sobre las dimensiones de esta estructura, siendo comparables a los parámetros morfológicos observados en el caso de los MC (Fig 17 A). Asimismo, se observa que cuando la hembra es tratada durante la etapa perinatal con PI (HI), se produce un incremento en el área total de la CA, sin embargo, este cambio no llega a ser significativo debido a que no se encuentran diferencias estadísticas al compararlas con el grupo de hembras control (Fig 17 B). Sin embargo, se observa que no existen diferencias entre HI y MC, con lo que nuevamente se demuestra que el tratamiento con PI tiene como tendencia producir un aumento de esta estructura. Al aumentar la dosis de PI en los grupos MgxI y HI no se produce un mayor incremento en el área total de la CA en comparación con aquellos que recibieron una dosis menor (Fig 17 A y B).

Los grupos experimentales de machos y hembras tratados con AID muestran que, en el caso de los machos, el tamaño de esta estructura puede disminuir de manera significativa llegando a ser comparable a las dimensiones observadas en el caso de las HC y siendo significativamente distintos a los grupos MC (Fig 17 A) y MgxI. En el caso de las hembras

tratadas con ATD se observa que el tamaño de la CA no se modifica con relación al observado en las hembras control (Fig 17 B)

### ÁREA TOTAL DE LA CA

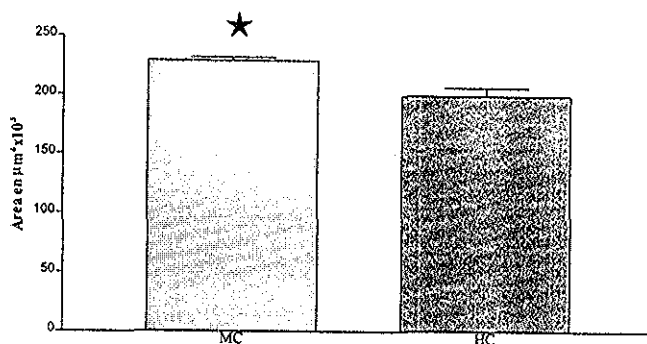


Fig 17 Área total en  $\mu\text{m}^2$  de la CA en ratas macho y hembras control. Los datos en esta y las siguientes gráficas se expresan en media  $\pm$  EE (error estándar). Los resultados muestran diferencias significativas entre grupos ( $F(8,69)=5.48$ ,  $p<0.001$ ). ★Diferente significativamente con relación al grupo HC (de acuerdo a la prueba de Newman-Keuls  $p < 0.05$ )

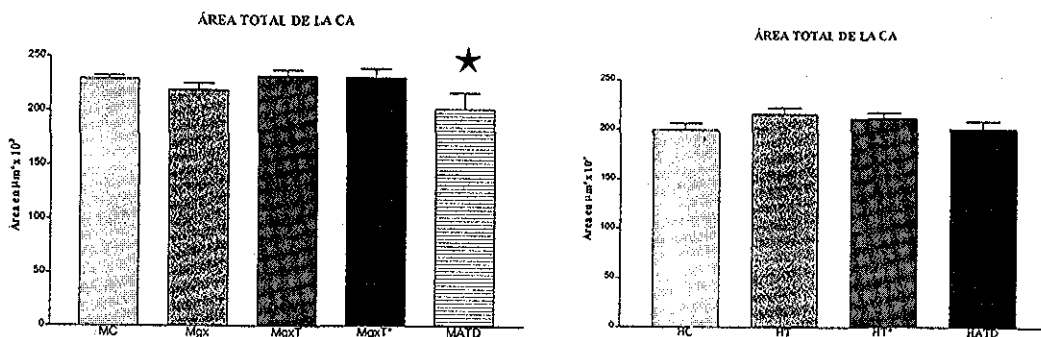


Fig 17 A y B Área total en  $\mu\text{m}^2$  de la CA. A: Efecto de la gonadectomía, del tratamiento con PI y AID en ratas macho sobre el área total de la CA. B: Efecto del tratamiento con PI y AID a ratas hembras sobre el área total de la CA. En esta y las siguientes gráficas, los grupos marcados con asterisco (\*) son los animales que recibieron una dosis mayor de PI. Los resultados muestran diferencias significativas entre grupos ( $F(8,69) = 5.48$ ,  $p<0.001$ ). ★ Diferente significativamente con relación al grupo control (de acuerdo a la prueba de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ )

## 7.2b. Área rostral de la comisura anterior

Las mediciones correspondientes al área rostral de la CA, muestran que las diferencias entre los grupos controles de cada sexo están determinadas principalmente por esta porción de la CA (Fig 18). Asimismo, puede observarse que la castración tiene como resultado una tendencia a la disminución en el área rostral de la CA, sin llegar a ser significativamente distinta de la de los MC (Fig. 18 A). De manera similar a lo que sucede en el caso del área total, el efecto del tratamiento con PT tanto en el grupo de MgxI (Fig 18 A) como en el HI (Fig 18 B) provocó un incremento en el área, aún cuando ésta no fue diferente significativamente. Obsérvese incluso que el tratamiento con PT tiende a producir un incremento en el área de esta porción de la CA con relación al MC, sin embargo, esta diferencia sutil en la dimensión de la CA no es estadísticamente significativa de la que se observa en el grupo MC (Fig 18 A). El grupo HI, no obstante que muestra un incremento significativo en el área de esta porción de la CA, evidenciado por su analogía con el grupo MC, la dimensión de esta estructura no llega a aumentar tanto como para ser significativamente distinta del grupo HC (Fig 18 B), es decir, sus dimensiones tienen una mayor tendencia a analogar a las del MC que a las de la HC. Por otro lado, se observa que los grupos HI\* y MgxI\* muestran una tendencia al aumento en esta región de la CA, sin embargo éste es muy pequeño como para llegar a ser significativamente distinto de los grupos que recibieron la dosis menor (Fig 18 A y B). El grupo de animales pertenecientes al grupo MATD muestra una disminución en el área de esta porción de la CA, sin embargo, a diferencia de lo observado en los grupos HC y MC (Fig 18 B), la diferencia que se observa en la disminución del área total de esta estructura, no parece estar dada a expensas del área rostral.



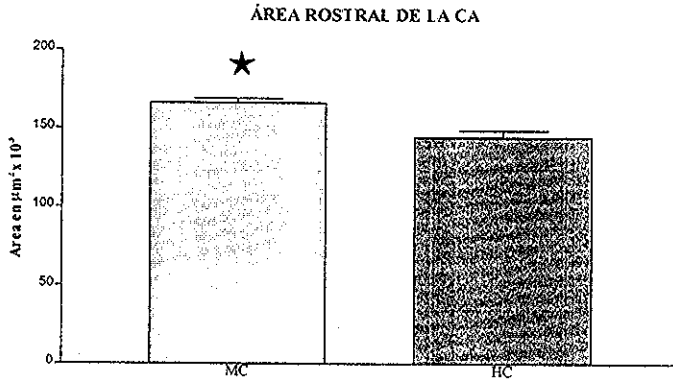


Fig 18 Área rostral de la CA en  $\mu\text{m}^2$  en ratas macho y hembras control. Los resultados muestran diferencias significativas entre grupos ( $F(8,69) = 4.03$ ,  $p < 0.001$ ). ★Diferente significativamente con relación al grupo HC (de acuerdo a la prueba de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

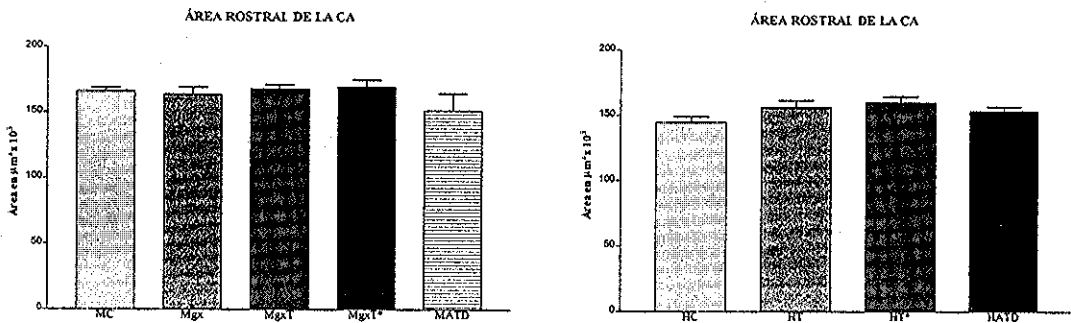


Fig 18 A y B A: Efecto de la gonadectomía, del tratamiento hormonal de reemplazo con PI, así como del tratamiento con AID en ratas macho sobre el área rostral de la CA. B: Efecto del tratamiento con PI a ratas hembras durante la vida perinatal sobre el área rostral de la CA. No se observan diferencias significativas (de acuerdo a la prueba de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### 7.2c. Area caudal de la comisura anterior

El análisis de las dimensiones de esta porción de la CA es similar entre todos los grupos experimentales, a excepción de aquellos animales que fueron tratados con un inhibidor de la aromatasasa durante la etapa prenatal tardía y postnatal temprana (Fig 19 A). El grupo de animales macho que recibieron tratamiento con AID muestra una disminución dramática en las dimensiones de la porción caudal de la CA, lo cual no sólo simula las condiciones femeninas, sino que incluso estos animales desarrollan una CA más pequeña que las HC (Fig 19 A). Por otro lado, también puede observarse en el grupo HAID, que esta droga reduce el tamaño de esta porción comisural, pero sin llegar a ser significativamente distinto de las HC (Fig 19 B). Dado que los dos grupos tratados con AID muestran las dimensiones más pequeñas, éstos presentan diferencias significativas cuando son comparados con aquellos animales expuestos a I durante la vida prenatal y postnatal, ya sea en condiciones fisiológicas, como sucede en el grupo MC (Fig 19 B) o bien cuando se administra PI de manera exógena, como en el caso de los grupos MgxI y HI. Con relación a los grupos control se observa que si bien en los machos el área caudal de la CA es mayor que en las hembras, esta diferencia no es significativamente distinta. Por otro lado, se puede observar que de la misma forma que sucede con el área rostral, el grupo Mgx presenta una tendencia a disminuir la dimensión en esta porción de la CA (Fig 19 A), llegando a ser comparables a las de la hembra y a las del grupo MAID, pero nuevamente, sin llegar a ser significativamente distintas a las del macho (Fig 19 A). Sin embargo, puede observarse que el tratamiento con PI al grupo Mgx subsana el efecto de la castración sobre el área caudal sagital de esta estructura (Fig 19 A). El tratamiento con I en el grupo HI tiende a producir un incremento en el área caudal produciendo condiciones similares a las observadas en los MC, pero no lo suficiente como para producir diferencias significativas al compararlas con su grupo control (Fig 19 B). De la misma manera que sucede en condiciones anteriores, se observa que los grupos que recibieron una dosis mayor de PI no muestran un incremento adicional en las dimensiones de esta estructura en comparación con aquellos animales que recibieron una dosis menor (Figs 19 A y B).

ÁREA CAUDAL DE LA CA

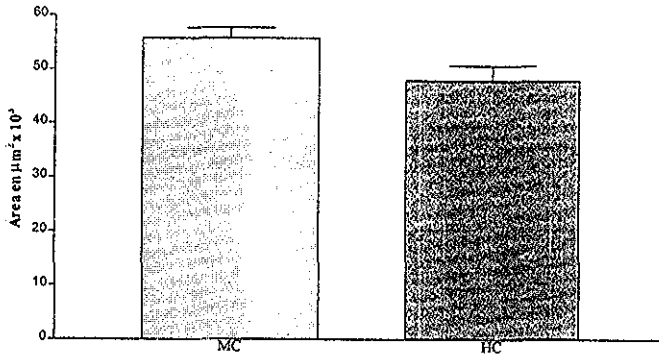
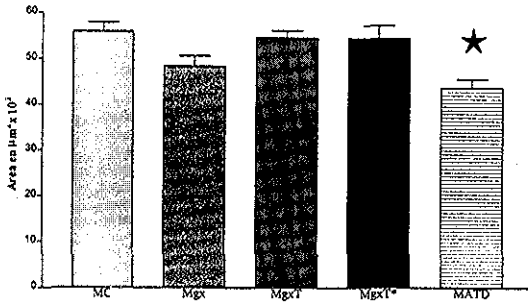


Fig 19 Área caudal de la CA en  $\mu\text{m}^2$  en ratas macho y hembras control No se observan diferencias significativas (de acuerdo a la prueba de Newman- Keuls,  $p < 0.05$ )

ÁREA CAUDAL DE LA CA



ÁREA CAUDAL DE LA CA

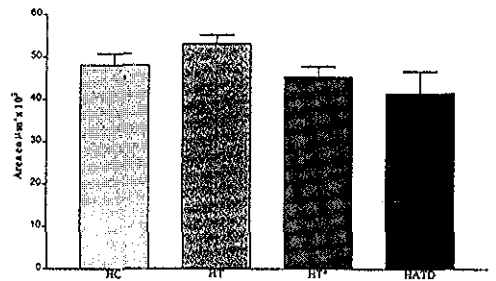
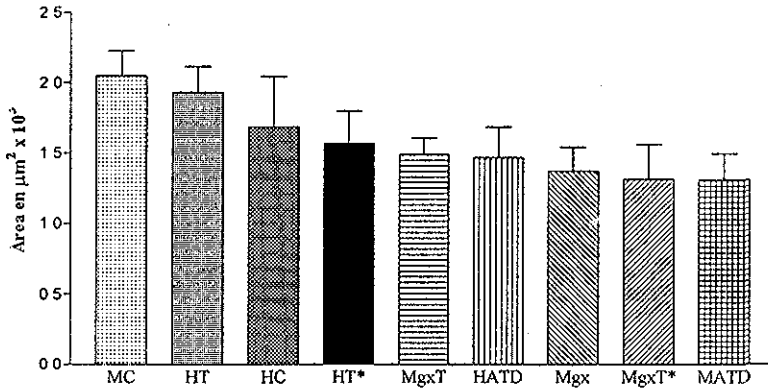


Fig 19 A y B. A: Efecto de la gonadectomía, del tratamiento hormonal de reemplazo con PI, así como del tratamiento con AID en ratas macho sobre el área caudal de la CA B: Efecto del tratamiento con PI a ratas hembras durante la vida perinatal sobre el área caudal de la CA Los resultados muestran diferencias significativas entre grupos ( $F(8,69) = 6.29$   $p < 0.001$ ). ★ Diferente significativamente con relación al grupo control (de acuerdo a la prueba de Newman- Keuls,  $p < 0.05$ )

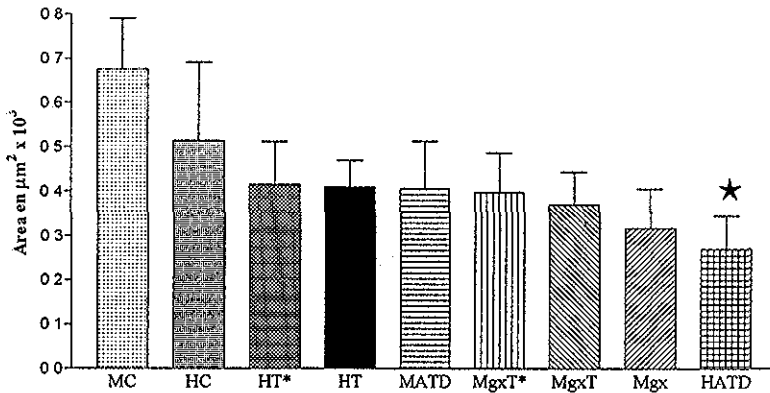
### 7.2d. Área capilar

Con el objeto de establecer con mayor precisión los elementos neurales responsables de las diferencias encontradas entre los grupos controles y experimentales y de evaluar una posible participación vascular en el proceso de diferenciación sexual estructural del encéfalo, se realizaron las mediciones correspondientes al área capilar para cada una de las porciones de la CA (Figs 20 y 21) Posteriormente, las áreas capilares de cada sección comisural fueron sumadas y luego sustraídas del área total calculada para cada sección. De esta manera, las diferencias que pudieran ser encontradas reflejan la posible participación preponderante del parénquima neural, más que por la vascularización de la misma. La estimación del área capilar en cada porción de la CA, demuestra que aún extrayendo el área capilar para cada sección, las diferencias encontradas y descritas anteriormente se presentan de la misma manera en cada condición experimental, así como para las dos porciones de esta estructura.

### ÁREA CAPILAR ROSTRAL DE LA CA



### ÁREA CAPILAR CAUDAL EN LA CA



Figs 20 y 21 Área capilar total en  $\mu\text{m}^2$  en ambas regiones de la CA. No existen diferencias significativas entre los grupos en el área capilar rostral. Para el área capilar caudal hay diferencias entre grupos ( $F(8,69) = 2.63$ ,  $p < 0.05$ ). ★Diferente significativamente con relación al grupo MC (según prueba de Newman Keuls,  $p < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 7.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Con base en los resultados obtenidos en el estudio morfométrico del área sagital de la CA y con el objeto de determinar una posible participación de la densidad numérica de los axones mielínicos en el dimorfismo sexual encontrado en la CA, se realizó una cuantificación de los axones mielínicos contenidos en esta estructura. Los grupos incluidos en este análisis fueron aquellos que mostraron diferencias en el estudio descrito anteriormente: HC (n= 7), MC (n= 6), Mgx (n= 4) y MAID (n= 4). Tal y como se ha descrito en la sección de material y métodos, una vez que fueron identificadas y definidas seis regiones para cada porción de la CA a un aumento inicial de 5000 X, las imágenes fueron impresas en papel para posteriormente realizar sobre éstas el conteo de fibras mielínicas, en un área correspondiente a  $299 \mu\text{m}^2$  por fotomicrografía y poder determinar posteriormente la densidad axonal total para cada corte de la CA. Los seis valores obtenidos para cada región de la CA fueron promediados para obtener un valor que representara una media rostral y caudal para cada sujeto experimental. Asimismo, para hacer una inferencia acerca del número total de axones para cada una de las porciones de la CA, fue dividida el área total calculada para cada una de estas porciones sobre el área muestreada para la cuantificación axonal y este cociente fue multiplicado por la media calculada para cada región de la CA. Esto se expresa en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Área rostral o caudal en } \mu\text{m}^2}{299 \mu\text{m}^2} \times \text{Media del \# de axones rostrales o caudales} = \text{Número total de axones}$$

#### 7.3a. Número de axones mielínicos en la comisura anterior

Los resultados del estudio morfométrico ultraestructural no revelan diferencias significativas en el número total de axones mielínicos en la CA, tanto en su componente rostral como en el caudal (Figs 22 y 23)

### DENSIDAD AXONAL EN LA CAr

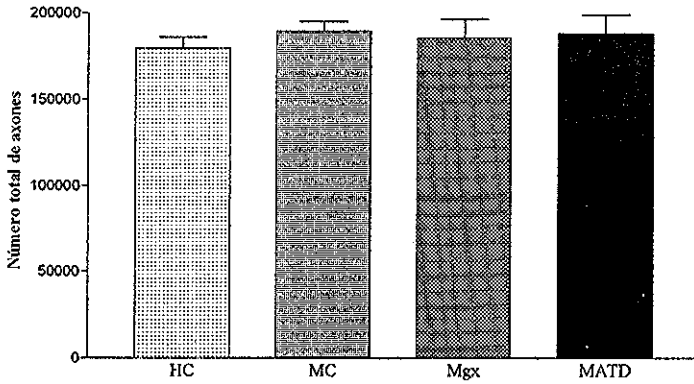


Fig 22 Densidad axonal en la porción rostral de la CA No se observan diferencias significativas entre los grupos (de acuerdo a la prueba de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ )

### DENSIDAD AXONAL EN LA CAc

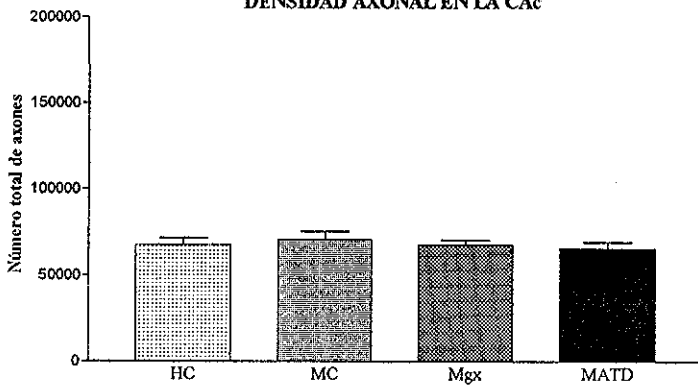


Fig 23 Densidad axonal en la porción caudal de la CA No se observan diferencias significativas entre los grupos (de acuerdo a la prueba de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados presentados confirman la hipótesis que fue planteada al inicio de este estudio. Uno de nuestros resultados demuestra la existencia de dimorfismo sexual en la CA de la rata, siendo mayor el área de la CA en las ratas macho con respecto a la de las hembras. Estos resultados difieren de los reportados por Jones y cols en 1997 y por Zimmerberg y Mickus en 1990. Jones y cols demuestran que el área coronal de la CA de las hembras es mayor que la de los machos, sin embargo, ellos no evalúan la totalidad de la CA sino simplemente una porción de la CA (Jones, et al, 1997), mientras que Zimmerberg y Mickus no encuentran diferencias en el área de la CA entre machos y hembras (Zimmerberg y Mickus, 1990). No obstante, nuestros resultados apoyan los resultados obtenidos por Noonan y cols en 1998, quienes demuestran que el área de la CA es mayor en el macho con respecto al área de la CA de la hembra (Noonan, et al, 1998). Asimismo, a partir del trabajo realizado en esta tesis, observamos que las diferencias encontradas en el área de la CA entre ambos sexos parecen depender de la presencia de hormonas esteroideas de origen gonadal durante la etapa perinatal. Si bien los pocos trabajos que han sido realizados en la CA de la rata se han enfocado a determinar la existencia de dimorfismo sexual en esta estructura, no se han logrado establecer los mecanismos que operan en el establecimiento de estas diferencias. En la mayoría de estos estudios se ha usado el alcohol o el estrés prenatal como modelos para estudiar los cambios en la formación y establecimiento de los sistemas comisurales y su repercusión sobre la conducta sexual principalmente. A través de estos trabajos se ha propuesto que el estrés prenatal tiene efectos sobre la expresión de receptores a opiáceos en diferentes núcleos que proyectan a través de la CA hacia el hemisferio contralateral, tal como sucede en el caso del cuerpo calloso (Juraska y Kopcick, 1998), y sobre la dinámica de secreción de una gran variedad de hormonas involucradas con la reproducción, proponiendo que los cambios que ocurren como consecuencia del estrés prenatal resultan ser importantes en el establecimiento de estas diferencias (Ward y Weisz, 1984; Ward y Weisz, 1980). También se ha asociado al estrés prenatal con una disminución significativa en la actividad de la enzima aromatasa, con la consecuente disminución en la conversión de E a partir de I (Weisz, et al, 1982). Si bien mediante el uso de estos modelos se pueden hacer inferencias acerca de los factores que participan en el establecimiento del



dimorfismo sexual en la CA de la rata, estos modelos no ofrecen una información precisa acerca de los mecanismos implicados en el establecimiento de estas diferencias. Por esta razón, consideramos importante que para analizar el posible papel de las hormonas sexuales esteroides de origen gonadal en el establecimiento de las diferencias sexuales estructurales en la CA de una manera más directa, debe de usarse un modelo en el cual se evalúe selectivamente el papel de estas hormonas sobre el tamaño de la CA. Por ello, en el presente trabajo, utilizamos un modelo clásico en el estudio de la reproducción, el cual consiste en privar a un animal de una determinada fuente de hormona mediante la extirpación de la glándula encargada de su secreción, y posteriormente administrar de manera exógena esta misma hormona, para determinar de objetiva su posible participación en el proceso estudiado. El modelo antes descrito ha sido utilizado por un gran número de investigadores para tratar de establecer la participación de las hormonas gonadales en el proceso de diferenciación de diversas estructuras que se encuentran ligadas a los procesos relacionados con la reproducción (Arnold y Gorski, 1984; Gorski, 1986; Harris, 1964; Matsumoto, 1992; Nishizuka y Arai, 1981; Raisman y Field, 1973).

Uno de los objetivos del trabajo que aquí se presenta fue determinar si la CA de la rata presenta diferencias estructurales entre los sexos y adicionalmente, si la manipulación del ambiente hormonal durante el período crítico de diferenciación del SNC produce cambios en las características observadas bajo condiciones control. La evidencia que existe acerca de la posibilidad de que esta estructura sea sexualmente dimórfica entre ambos sexos y de que dicho dimorfismo se encuentre determinado por la presencia de hormonas de origen gonadal es, en primer lugar, el hecho de que las áreas cerebrales que proyectan sus axones al hemisferio contralateral a través de la CA están constituidas por grupos neuronales que se encargan de controlar las funciones reproductivas en los mamíferos, y en segundo lugar, el hecho de que las neuronas localizadas en estas estructuras expresan receptores a esteroides gonadales. Ejemplo de ello lo constituyen las estructuras que se encuentran relacionadas con el procesamiento de la información olfatoria, la cual tiene un papel fundamental en las conductas reproductivas. El primer relevo de la vía olfatoria se realiza en el bulbo olfatorio, el cual manda colaterales hacia el NOA, y este último a su vez, envía fibras hacia el NOA y bulbo olfatorio contralateral a través de la porción rostral de la CA (Jouandet y Hartenstein, 1983). Adicionalmente, a través de un gran número de trabajos, se ha logrado establecer que

la mayoría de las diferencias estructurales del SNC de la rata entre ambos sexos resultan de la interacción entre las hormonas sexuales esteroideas de origen gonadal y las neuronas en proceso de diferenciación (Arnold y Gorski, 1984; Davis, et al, 1996; Nishizuka y Arai, 1981; Oppenheim, 1991) Se ha considerado que en este proceso de diferenciación la I tiene un papel fundamental, debido a que esta hormona al ser aromatizada intraneuronalmente a E induce la expresión del fenotipo masculino, mientras que la ausencia de E intracelular resulta en la expresión del fenotipo femenino (MacLusky y Naftolin, 1981; McEwen y Alves, 1999) Este fenómeno de inducción hormonal presupone la presencia de receptores específicos a esteroideas sexuales en las áreas que procesan información sexualmente dimórfica, por lo que una característica considerada exclusiva de las diferencias sexuales estructurales es la de ser inducidas o suprimidas perinatalmente por la presencia o ausencia correspondiente, de hormonas esteroideas de origen gonadal durante el período de diferenciación del SNC (Arnold y Gorski, 1984)

Existe un trabajo previo, realizado en la CA de la rata, que busca la relación descrita anteriormente En 1998, Larriva-Sahd y cols analizaron mediante cortes sagitales de la CA el área de esta estructura en ratas macho y hembras control, en machos gonadectomizados al nacimiento con y sin tratamiento de reemplazo con PT, así como en hembras tratadas perinatalmente con PT Adicionalmente, dado que los esteroideas gonadales pueden modificar la morfología de grupos neuronales y la conducta reproductiva al actuar no sólo durante el período crítico de diferenciación del SNC, analizaron el posible efecto de la I en ratas jóvenes adultas sobre el área de la CA Los resultados muestran que no existen dimorfismo sexual en el área total de la CA y que la gonadectomía al nacimiento no disminuye sus dimensiones, mientras que el tratamiento con PT en machos gonadectomizados y en hembras produce un incremento en el área de la CA con relación al macho y hembra control respectivamente Por otro lado, observaron que el tratamiento con PT en ambos sexos durante la vida adulta no modifica el área de esta estructura Los resultados obtenidos a partir de este trabajo muestran que el tratamiento perinatal con I modifica el área de una estructura que al parecer no lleva a cabo un proceso de diferenciación sexual (Larriva-Sahd, et al, 1998) Por lo que, los resultados obtenidos en esta tesis son diferentes a los obtenidos por Larriva y cols en 1998 Sin embargo, es importante hacer notar que existieron algunas

diferencias técnicas entre ambos experimentos, tal como la cepa de ratas utilizadas en estos experimentos

En el presente trabajo, el establecimiento del dimorfismo sexual en la CA fue evaluado, por un lado, mediante la castración de animales al nacimiento y mediante la restitución de la hormona T en algunos de ellos. Los resultados muestran que la gonadectomía tiende a disminuir las dimensiones de esta estructura, aunque no lo suficiente para ser distinto del grupo de machos control (Figs 17A y 19A). Esto puede ser explicado por un efecto prenatal de la T, ya que los animales son gonadectomizados hasta el día de su nacimiento, quedando de esta manera expuestos a la acción organizadora de la T o sus productos de aromatización y/o reducción vgr E y DHI, respectivamente en la vida prenatal. Se ha descrito que, durante el desarrollo fetal, la T comienza a ser secretada hacia el día 18 y 19 de gestación (Baum, et al., 1991), por lo que en el modelo que nosotros empleamos el macho queda expuesto a la acción organizacional de la hormona T desde el día E18-19 hasta el día E23, que fue la fecha de nacimiento. Posteriormente, en la vida postnatal, en los machos ocurre un incremento en los niveles de T durante las dos primeras horas de nacimiento, para posteriormente declinar a las 6 horas postnatales (Baum, et al., 1988). Tomando en cuenta la dinámica de secreción de la T, las gonadectomías fueron realizadas en todos los animales alrededor de las dos horas posteriores al nacimiento. El hecho de que en los machos gonadectomizados tiende a haber una reducción en el área de la CA sin ser distinta significativamente de los machos control, debido a un efecto prenatal de la T sobre la CA en los machos gonadectomizados, se fortalece cuando se analizan a los animales machos que han sido tratados con ATD, durante la vida pre y postnatal, en los cuales se observa que la CA disminuye significativamente sus dimensiones, siendo comparables a las observadas en las hembras control (Figs 17C y 19C). En el grupo de animales que fueron tratados con ATD, las crías son privadas de E desde la vida intrauterina (E16) y continúan su tratamiento por 10 días después de nacidas, por lo que los resultados obtenidos en este grupo resultan ser más claros y específicos con relación al grupo de machos gonadectomizados. Asimismo, los resultados obtenidos en el grupo de machos tratados con ATD son fundamentales ya que nos dan información acerca del mecanismo implicado en el proceso de diferenciación de la CA. El ATD es un fármaco que inhibe de manera selectiva la aromatización de la T, evitando de esta manera la utilización intraneuronal de E (McEwen, et al., 1982). Se ha considerado que el E, como producto de

aromatización de la I, se encuentra implicado en los procesos de diferenciación de estructuras del sistema nervioso relacionadas con la reproducción, que son sexualmente dimórficas entre ambos sexos. De esta manera, el hecho de que la CA de los machos disminuya como consecuencia del tratamiento prenatal con ATD, sugiere que las diferencias encontradas entre machos y hembras se deben a la presencia de E durante la etapa perinatal en el macho, esto debido a que el ATD se encuentra bloqueando la conversión de E a partir de I. De manera paradójica, la hembra secreta una gran cantidad de E proveniente de diversas fuentes, sin embargo, el E se une con una gran afinidad a la  $\alpha$ -feto-proteína, evitando de esta manera que sea utilizado intraneuronalmente. Asimismo, esto sugiere que la hormona responsable de inducir estas diferencias no es la I por sí misma, o a través de la 5 $\alpha$ -DHT, la cual es producida mediante un proceso de reducción de la I (McEwen, et al., 1982; McEwen, 1981), si no al E, debido a que el ATD inhibe selectivamente la aromatización de la I. Sin embargo, la I por sí misma y la DHT siguen estando presentes en los machos, pero al parecer no tienen efectos manifiestos sobre la diferenciación estructural de la CA.

En la rata, el efecto organizacional de las hormonas sexuales esteroides abarca desde el día 14 prenatal hasta el día 10 postnatal (Baum, 1979). Este papel organizacional se le ha atribuido a la hormona gonadal masculina I, y en particular al E como producto de la aromatización intraneuronal de I. Este hecho ha sido fundamentado mediante distintos experimentos en los que se ha demostrado que, ante la administración de grandes cantidades de I durante el período crítico, el cerebro de la hembra se masculiniza y durante la vida adulta el animal es capaz de mostrar conductas sexuales heterotípicas. Por lo que, para probar el papel del E como producto de aromatización de la I en el establecimiento de las diferencias encontradas entre machos y hembras control, ratas hembras fueron tratadas tanto prenatal como postnatal con inyecciones subcutáneas de PI. Asimismo, ratas macho que fueron gonadectomizadas al nacimiento recibieron PI exógena con el propósito de comprobar si la disminución en el área de la CA consecuente a la falta de I, observada en el grupo de machos gonadectomizados, es susceptible de ser revertida al administrarse esta hormona de manera exógena. En cuanto a la androgenización de las hembras y de los machos posterior a la gonadectomías, se observa que en ambos grupos tiende a haber un incremento en el área de la CA. En el caso de los machos que han sido tratados con I, se

observa que el área de la CA es igual a la encontrada en los machos control, mientras que en el caso de las hembras androgenizadas, se produce un aumento en el área de esta estructura pero sin llegar a ser de las mismas dimensiones a las encontradas en los machos control. Finalmente, con el objeto de mostrar que el efecto observado fuera dependiente de la dosis, se incrementó la dosis de PI, sin embargo la tendencia antes observada no se modificó (Figs 16, 17 y 18). Lo anterior sugiere, que en el caso de las hembras, la dosis usada inicialmente es de una magnitud suficiente para "saturar" el modelo experimental aquí utilizado. Con relación a los resultados encontrados en las hembras androgenizadas, se esperaba que el área de la CA fuera similar a la encontrada en los machos control, sin embargo, los resultados muestran que si bien tiende a haber un aumento en las dimensiones de esta estructura, éste no es lo suficientemente significativo para ser comparable a las del macho y diferentes de las de las hembras control. Una posible explicación a este resultado puede deberse a una actividad diferente en el proceso de aromatización de la T en estos animales con relación al macho control, lo cual pudiera estar correlacionado con el posible estrés prenatal y postnatal temprano, consecuente al tratamiento hormonal en grandes dosis e inyecciones subcutáneas. Al respecto, los trabajos de Weisz y cols en 1982, muestran que cuando las madres son expuestas a estrés, las crías muestran una disminución en la actividad del sistema de aromatización (Weisz, et al., 1982). Si bien esta puede ser una posible explicación, nuestros resultados no muestran evidencias que apoyen o descarten este hecho. Asimismo, aunado a la posibilidad de que la T administrada a las hembras este siendo aromatizada en pequeñas cantidades debido a lo comentado anteriormente, puede existir la posibilidad de que esta hormona esté siendo preferentemente metabolizada a DHT por la enzima  $5\alpha$ -reductasa, con lo cual no se produciría un aumento considerable en área de esta estructura similar al que se observa en los machos control.

En resumen, se observa que la gonadectomía en los machos y el tratamiento con PI a hembras modifica las dimensiones de la CA, sin embargo los cambios observados no son una simulación exacta de lo que sucede en las hembras y en los machos control respectivamente. Esto se pudiera explicar de manera adicional a lo que se ha comentado anteriormente, debido a: 1) Existencia de otros factores, posiblemente no hormonales, que influyan sobre la diferenciación de la CA. 2) Requerimiento de una mayor, más temprana o prolongada a exposición de PI en las hembras. 3) Una gonadectomía más temprana en el

caso de los machos 4) Existencia de otros períodos críticos durante el desarrollo perinatal importantes en el desarrollo de esta estructura, los cuales contribuyan al establecimiento de estas diferencias

Con relación a los tres últimos puntos, se ha reportado que las estructuras que proyectan sus axones a través de la CA difieren en el tiempo en el cual comienzan su desarrollo; la neurogénesis en el NOA y bulbo olfatorio comienza a partir de E13, mientras que en los núcleos amigdalinos y en la corteza entorrinal sucede entre E13 y E16 (Bayer y Altman, 1987 en Guadaño-Ferraz, et al , 1994) Tomando en cuenta estos hechos y dado que las gonadectomías y el tratamiento perinatal con PT se realizaron al nacimiento y en el día E16 respectivamente, queda un período en los machos (E13-E23) en el cual la I sigue estando presente, y probablemente sea debido a esto que la disminución en el área de la CA no es tan importante, mientras que en las hembras existe un período de tres días (E13-E16) durante el cual la I pudiera estar consolidando las tendencias encontradas

A partir de los resultados obtenidos en microscopía de luz, los cuales muestran que la CA del macho es más voluminosa que la de la hembra, consideramos importante determinar, mediante un análisis más fino y preciso, los substratos neuroanatómicos que contribuyen al establecimiento de estas diferencias mediante una estimación del número de axones mielínicos contenidos en la CA<sub>r</sub> y CA<sub>c</sub> de machos y hembras control, machos gonadectomizados y machos tratados con AID Se consideró importante hacer una valoración de la cantidad de axones mielínicos en estos grupos debido a que diversos trabajos han mostrado que las hormonas esteroides tienen un papel muy importante en los procesos de mielinización del SNC y SNP (Baulieu, 1991; Baulieu y Schumacher, 1997; Jung-Testas, et al , 1994) Mediante estos trabajos se analizaron los efectos de la progesterona y el E en cultivos primarios de células gliales y se observó que el crecimiento celular es inhibido por la progesterona, y estimulado con el tratamiento con E (Jung-Testas, et al , 1992) Adicionalmente, se determinó que ambas hormonas inducen cambios morfológicos importantes así como un incremento en la síntesis de proteínas relacionadas con la síntesis de mielina (Jung-Testas, et al , 1994)

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el análisis de imágenes en microscopía electrónica, no se encontraron diferencias en el número de axones mielínicos, aún cuando mediante microscopía de luz se observan diferencias en el área total de la CA entre ambos

sexos Una perspectiva que surge a partir de estos datos es la de analizar las características ultraestructurales de los demás componentes que conforman a la CA, particularmente, el número y diámetro de las fibras amielínicas, así como, de forma complementaria, la determinación del grado de mielinización (espesor de la vaina de mielina) como índice del efecto de las hormonas esteroideas sexuales de origen gonadal y cerebral (neuroesteroides) sobre la mielinización de este tracto comisural

El hecho de que las diferencias en el área de la CA entre ambos sexos no se encuentren dadas por el número de axones mielínicos ni por el área ocupada por vasos sanguíneos (Fig. 19 y 20), plantea las siguientes posibilidades: 1) El número de axones mielínicos es el mismo en ambos sexos, pero el espesor de la vaina de mielina es distinto para cada grupo, y de esta manera, el macho posee una mayor área de la CA a expensas de tener axones con un mayor grado de mielinización, o bien estos axones poseen el mismo espesor de vaina de mielina que las hembras pero que son axones con un mayor diámetro 2) Existe una diferencia en el número y/o diámetro de los axones amielínicos 3) Existe un incremento en el número y/o tamaño de las células gliales

Este estudio fue enfocado hacia el estudio de las características morfológicas de la CA en ratas hembra y machos control, así como hacia el esclarecimiento del mecanismo por el cual se establecen estas diferencias morfológicas entre ambos sexos. Si bien en este trabajo nos dedicamos a evaluar el efecto de hormonas gonadales sobre la estructura de la CA, es importante señalar que probablemente tanto la gonadectomía en los machos como el tratamiento con PT a las hembras durante la vida perinatal modifique la actividad sexual en ambos grupos. Esto ha sido demostrado en diversos trabajos en los cuales se ha evaluado la repercusión de la gonadectomía y el tratamiento perinatal con ATD en ratas macho y el tratamiento con PT en ratas hembras sobre la conducta sexual (Pfeiffer, 1936 en Arnold y Gorski, 1984; De Jonge, et al., 1989; Kondo, et al., 1990; Houtsmuller, et al., 1994). Asimismo, se sabe que además de la conducta sexual, existen otras conductas que son sexualmente dimórficas. Ejemplo de ello son la conducta de juego y de exploración, en las cuales el olfato y la I también juega un papel importante (Meaney y McEwen, 1986). Así, se logró establecer que la privación olfatoria unilateral en el día P3 incrementa las conductas de juego y exploración en ratas en ambos sexos, mientras que el incremento en la estimulación olfatoria del día P3 a P19 produce una disminución significativa en estas conductas en ratas

hembras y no tiene ningún efecto sobre ratas macho. Estos resultados sugieren que durante la vida temprana los mecanismos implicados en el establecimiento de estas conductas son sensibles a las manipulaciones neonatales, en donde señales olfatorias participan de manera importante en la regulación de este tipo de conductas (Loranca y Salas, 2001)

## CONCLUSIONES

De esta manera, los resultados obtenidos a partir de este trabajo muestran como conclusiones que:

- Existen diferencias significativas en función del sexo en el área total de la CA, básicamente a expensas de la porción rostral de dicha estructura
- La gonadectomía del macho recién nacido tiende a disminuir las dimensiones de la CA; sin embargo, la diferencia no es estadísticamente significativa con respecto al control
- El tratamiento de reemplazo con PT a los machos gonadectomizados revierte la disminución en el área de la CA observada en los machos castrados sin tratamiento
- En las hembras androgenizadas la T tiende a aumentar el tamaño de la CA sin producir diferencias significativas con relación al control
- En los machos y hembras tratados con PT no se observó un efecto dependiente de la dosis, ya que el aumento en la dosis administrada de T no produjo cambios adicionales en el área total de la CA.
- El tratamiento con AID en ratas macho disminuye el área total de la CA con respecto al control
- El mecanismo por el cual se producen las diferencias encontradas entre hembras y machos control parecen deberse al E a través de la aromatización de la T
- El número de axones mielínicos es el mismo para cada grupo experimental analizado. No obstante, se demostró que el área total de la CA es sexualmente diferente.



## 9 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Agrati P, Bolzoni L, Brusadelli A, Ciana P, Marini E, Meda C, Patrone C, Penlington MC, Pollio G, Rebecchi M, Sialino RH, Vegeto E, Maggi A. 1999. In vitro study for effects of estrogen on estrogen receptor-transfected neuroblastoma cells. En A. Matsumoto (Ed), *Sexual differentiation of the brain* (pp. 22-32). New York: CRC Press.
- 2.- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. 1994. Germ cells and fertilization. En B. Alberts (Ed), *Molecular Biology of the Cell*. (pp. 1011-1035). New York: Garland Publishing, Inc.
- 3.- Allen LS, Gorski RA. 1991. Sexual dimorphism of the anterior commissure and massa intermedia of the human brain. *J Comp Neurol* **312**, 97-104.
- 4.- Arai Y, Matsumoto A. 1978. Synapse formation of the hypothalamic arcuate nucleus during post-natal development in the female rat and its modification by neonatal estrogen treatment. *Psychoneuroendocrinol* **3**, 31-45.
- 5.- Arnold A, Gorski R. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci* **7**, 413-442.
- 6.- Arnold AP, Breedlove SM. 1985. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm Behav* **19**, 469-498.
- 7.- Aronica SM, Katzenellenbogen BS. 1993. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* **7**, 743-752.
- 8.- Barraclough C, Gorski R. 1961. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* **68**, 68-79.
- 9.- Baulieu E. 1981. *Steroid hormones in the brain. several mechanism?* (3-14 pp). Oxford: Pergamon Press.
- 10.- Baulieu EE. 1991. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* **71**, 3-10.
- 11.- Baulieu EE, Schumacher M. 1997. Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone on myelination in peripheral nerves. *Mult Scler* **3**, 105-112.
- 12.- Baum M. 1979. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neurosc. Biobehav. Rev* **3**, 265-284.

- 13.- Baum MJ, Brand I, Ooms M, Vreeburg JT, Slob AK. 1988 Immediate postnatal rise in whole body androgen content in male rats: correlation with increased testicular content and reduced body clearance of testosterone. *Biol Reprod* **38**, 980-986.
- 14.- Baum MJ, Woutersen PJ, Slob AK. 1991 Sex difference in whole-body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females *Biol Reprod* **44**, 747-751
- 15.- Bayer S, Altman J. 1987. Directions in neurogenetic gradients and patterns of anatomical connections in the telencephalon. *Prog Sens Physiol* **29**, 57-106
- 16.- Bologna I, Sharma J, Roberts E. 1987. Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures *J Neurosci Res* **17**, 225-234
- 17.- Brand I, Kroonen J, Mos J, Slob AK. 1991 Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations *Horm Behav* **25**, 323-341
- 18.- Breedlove M. 1994 Sexual differentiation of the brain and behavior. En M Breedlove, D Crews (Eds.), *Behavioral Endocrinology* (pp 39-70) Massachusetts: MIT Press.
- 19.- Breedlove SM, Arnold AP. 1980 Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord *Science* **210**, 564-566.
- 20.- Brodal A. 1981 The olfactory pathways, The amygdala, The hippocampus "The limbic system" En A. Brodal (Ed ), *Neurological Anatomy in relation to Clinical Medicine*. (pp. 640-697) New York: Oxford University Press
- 21.- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. 1992 Connections of the posterior nucleus of the amygdala [published erratum appears in *J Comp Neurol* 1993;328(4):604]. *J Comp Neurol* **324**, 143-179.
- 22.- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. 1995 Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat [published erratum appears in *J Comp Neurol*;369(2):328-30]. *J Comp Neurol* **360**, 213-245
- 23.- Connolly PB, Roselli CE, Resko JA. 1994 Aromatase activity in developing guinea pig brain: ontogeny and effects of exogenous androgens. *Biol Reprod* **50**, 436-441.

- 24 - Crenshaw BJ, De Vries GJ, Yahr P 1992. Vasopressin innervation of sexually dimorphic structures of the gerbil forebrain under various hormonal conditions. *J Comp Neurol* **322**, 589-598
- 25 - Davis EC, Popper P, Gorski RA 1996. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res* **734**, 10-18.
- 26 - De Jonge F, Louwerse A, Ooms M, Evers P, Endert E, Van de Poll N. 1989 Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behaviour of male Wistar rats. *Brain Res Bull* **23**, 483-492
- 27 - De Olmos J, Alheid GF, Beltramino CA 1985 Amygdala. En G. Paxinos (Ed ), *The rat nervous system* (pp 223-317) Australia: Academic Press
- 28 - De Olmos J, Ingram W 1972 Projection field of stria terminalis in the rat brain. *J Comp Neurol* **146**, 303-334
- 29 - Edwards DA, Griffis KI, Tardivel C 1990 Olfactory bulb removal: effects on sexual behavior and partner-preference in male rats. *Physiol Behav* **48**, 447-450
- 30 - Everet JW 1994 Pituitary and hypothalamus: Perspectives and overview. En E Knobil, J D Neill (Eds ), *The Physiology of Reproduction*, Vol I (pp 1509-1526) New York: Raven Press
- 31 - Finn PD, McFall IB, Clifton DK, Steiner RA 1996 Sexual differentiation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **137**, 4767-4772
- 32 - George F, Wilson J 1994 Sex determination and differentiation. En E Knobil, J Neill (Eds ), *The Physiology of Reproduction*, Vol I (pp 3-28) New York: Raven Press
- 33 - Gorski RA 1986 Sexual differentiation of the brain: a model for drug-induced alterations of the reproductive system. *Environ Health Perspect* **70**, 163-175.
- 34 - Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. 1978. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res* **148**, 333-346.
- 35 - Griffin JE, Ojeda SR 2000 *Textbook of Endocrine Physiology* New York : Oxford University Press
- 36 - Guadaño-Ferraz A, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Innocenti G, Berbel P 1994 The development of the anterior commissure in normal and hypothyroid rats. *Dev Brain Res* **81**, 293-308

- 37 - Hamilton LW 1976. *Basic Limbic System Anatomy of the Rat*. London.: Plenum, New York
- 38 - Harris G 1964 Sex hormones, brain development and brain function. *The Upjohn Lecture of the Endocrine Society* 75, 627-648.
- 39 - Hines M, Davis FC, Coquelin A, Goy RW, Gorski RA 1985 Sexually dimorphic regions in the medial preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis of the guinea pig brain: a description and an investigation of their relationship to gonadal steroids in adulthood. *J Neurosci* 5, 40-47.
- 40 - Houtsmuller E, Brand I, De Jonge F, Joosten R, Van de Poll N, Slob A 1994 SDN-POA volume, sexual behaviour and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiol Behav* 56, 535-541
- 41 - Hutchison JB. 1999 Estrogen in gender-specific neural differentiation. En A Matsumoto (Ed ), *Sexual differentiation of the brain*. (pp. 59-82) New York: CRC Press.
- 42 - Hutton LA, Gu G, Simerly RB. 1998 Development of a sexually dimorphic projection from the bed nuclei of the stria terminalis to the anteroventral periventricular nucleus in the rat. *J Neurosci* 18, 3003-3013.
- 43 - Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA 1993 Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element *Mol Endocrinol* 7, 992-998.
- 44 - Jacobson CD, Csernus VJ, Shryne JE, Gorski RA 1981 The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area *J Neurosci* 1, 1142-1147
- 45 - Jacobson CD, Shryne JE, Shapiro F, Gorski RA. 1980 Ontogeny of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area *J Comp Neurol* 193, 541-548.
- 46 - Jones HE, Ruscio MA, Keyser LA, Gonzalez C, Billack B, Rowe R, Hancock C, Lambert KG, Kinsley CH 1997. Prenatal stress alters the size of the rostral anterior commissure in rats. *Brain Res Bull* 42, 341-346
- 47 - Jouandet ML. 1982 Neocortical and basal telencephalic origins of the anterior commissure of the cat. *Neuroscience* 7, 1731-1752.
- 48 - Jouandet ML, Gazzaniga MS. 1979. Cortical field of origin of the anterior commissure of the rhesus monkey *Exp Neurol* 66, 381-397.

- 49 - Jouandet ML, Hartenstein V 1983 Basal telencephalic origins of the anterior commissure of the rat *Exp Brain Res* **50**, 183-192
- 50 - Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene GL, Baulieu EE 1992 Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**, 621-631
- 51 - Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE 1994 Actions of steroid hormones- and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system *J Steroid Biochem Mol Biol* **48**, 145-154
- 52 - Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE 1996 Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**, 77-82
- 53 - Juraska J, Kopcick J 1998 Sex and enviromental influences on the size and ultraestructure of the rat corpus callosum *Brain Res* **450**, 1-8
- 54 - Katzenellenbogen BS 1996 Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways *Biol Reprod* **54**, 287-293
- 55 - Kelley AE, Domesick VB, Nauta WJ 1982 The amygdalostriatal projection in the rat: an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods *Neuroscience* **7**, 615-630
- 56 - Kelly JP, Dodd J 1991 Anatomical organization of the nervous system En ER Kandel, JH Schwartz, I M Jessell (Eds), *Principles of Neural Science* (pp 273-295) Conneticut: Appleton & Lange
- 57 - Koeningl H, Schumacher M, Ferraz B, Thi A, Ressouches A, Guennoun R, Yung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu E 1995 Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells *Science* **268**, 1500-1503
- 58 - Kondo Y, Shinoda A, Yamanouchi K, Arai Y 1990 Role of septum and preoptic area in regulating masculine and feminine sexual behavior in male rats *Horm Behav* **24**, 421-434.
- 59 - Konishi M, Akutagawa E 1985 Neuronal growth, atrophy and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain *Nature* **315**, 145-147
- 60 - Krettek JE, Price JL 1977 Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat *J Comp Neurol* **172**, 687-722

- 61 - Lamantia AS, Rakic P 1990 Cytological and quantitative characteristics of four cerebral commissures in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* **291**, 520-537
- 62 - Larriva-Sahd J 1991 Ultrastructural evidence of a sexual dimorphism in the neuropil of the medial preoptic nucleus of the rat: a quantitative study *Neuroendocrinol* **54**, 416-419
- 63.- Larriva-Sahd J, Gorski RA, Micevych PE 1986. Cholecystokinin synapses in the sexually dimorphic central part of the medial preoptic nucleus. *Exp Neurol* **92**, 639-650.
- 64.- Larriva-Sahd J, Orozco-Estevez H, Condes-Lara M. 1998 Perinatal administration of testosterone induces hypertrophy of the anterior commissure in adult male and female rats. *Neurosci Lett* **241**, 119-122.
- 65 - Lawrence JM, Raisman G. 1980. Ontogeny of synapses in a sexually dimorphic part of the preoptic area in the rat. *Brain Res* **183**, 466-471.
- 66.- Lent R, Guimaraes R 1991 Development of paleocortical projections through the anterior commissure of hamsters adopts progressive, not regressive, strategies. *J Neurobiol* **22**, 475-498.
- 67 - Leonard CM, Scott JW. 1971 Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental neuroanatomical study. *J Comp Neurol* **141**, 313-329.
- 68 - Li X, Schwartz PE, Rissman EF 1997. Distribution of estrogen receptor-beta-like immunoreactivity in rat forebrain *Neuroendocrinology* **66**, 63-67
- 69 - Lieberburg I, Maclusky NJ, McEwen BS. 1977 5alpha-Dihydrotestosterone (DHT) receptors in rat brain and pituitary cell nuclei *Endocrinology* **100**, 598-607
- 70 - Loranca A, Salas M 2001. Social play development in pre-weaning olfactory deprived or stimulated rats. *Brain Res* **921**, 150-159
- 71 - Luttge M, Gerren R 1979 Postnatal alpha-methylphenylalanine treatment effects on adult mouse locomotor activity and avoidance learning *Pharmacol Biochem Behav* **11**, 493-498
- 72 - Mack CM, Boehm GW, Berrebi AS, Denenberg VH. 1995. Sex differences in the distribution of axon types within the genu of the rat corpus callosum *Brain Res* **697**, 152-160
- 73.- MacLusky N, Naftolin F. 1981 Sexual differentiation of the central nervous system *Science* **211**, 1294-1302

- 74 - MacLusky N, Philip A, Hurlburt C, Naftolin F. 1985 Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early post-natal life. *Psychoneuroendocrinology* **10**, 355-361
- 75 - MacLusky NJ, Naftolin F. 1981 Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* **211**, 1294-1302.
- 76 - MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD. 1994. Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications *Mol Cell Neurosci* **5**, 691-698
- 77 - Matsumoto A. 1992. Sex steroid induction on synaptic organization in adult neuroendocrine brain. *Rev Neurosci* **3**, 287-306
- 78 - Matsumoto A, Prins GS. 1998. Age-dependent changes in androgen receptor immunoreactivity in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus of male rats *Neurosci Lett* **243**, 29-32.
- 79 - McDonald AJ. 1991 Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat *Neurosci* **44**, 1-14
- 80 - McEwen B, Biegan A, Davis P, Krey L, Luine V, McGinnis M, Paden C, Parsons B, Rainbow T. 1982 Steroid hormones: Humoral signals which alter brain cell properties and functions *Rec Progr Horm Res* **38**, 41-91
- 81 - McEwen BS. 1981 Neural gonadal steroid actions *Science* **211**, 1303-1311.
- 82 - McEwen BS. 1992. Steroid hormones: effect on brain development and function *Horm Res* **37 Suppl 3**, 1-10.
- 83 - McEwen BS, Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system *Endocr Rev* **20**, 279-307
- 84 - Meaney M, McEwen B. 1986 Testosterone implants into the amygdala during the neonatal period masculinize the social play of juvenile female rats. *Brain Res* **398**, 324-328
- 85 - Merchenthaler I, Gorcs I, Setalo G, Petrusz P, Flerko B. 1984 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res* **237**, 15-29
- 86 - Nishizuka M, Arai Y. 1981. Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: implications for sexual differentiation of the brain. *Brain Res* **213**, 422-426

- 87 - Nishizuka M, Arai Y 1981 Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment *Brain Res* **212**, 31-38
- 88 - Nitecka L, Amerski L, Narkiewicz O 1981 Interamygdaloid connections in the rat studied by the horseradish peroxidase method *Neurosci Lett* **26**, 1-4
- 89 - Noonan M, Smith MA, Kelleher K, Sanfilippo MA 1998 Sex differences in anterior commissure size in the rat *Brain Res Bull* **45**, 101-104
- 90 - Norman A, Litwack G 1997 Hypothalamic releasing hormones En A Norman, G Litwack (Eds ), *Hormones* (pp 87-108) San Diego: Academic Press
- 91 - Olster DH, Blaustein JD 1988 Progesterone facilitation of lordosis in male and female Sprague-Dawley rats following priming with estradiol pulses *Horm Behav* **22**, 294-304
- 92 - Oppenheim R 1991 Cell death during development of the nervous system *Annu Rev Neurosci* **14**, 453-501
- 93 - Peters, Palay, Webster 1976 *The fine structure of the nervous system. The neurons and supporting cells*. Philadelphia : Wb Saunders Company
- 94 - Pfaff D, Keiner M 1973 Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat *J Comp Neurol* **151**, 121-158
- 95 - Pfeiffer C 1936 Sexual differences of the hypophysis and their determination by the gonads *Am J Anat* **58**, 195-225
- 96 - Portillo W, 1999 Preferencia olfatoria y sexual en ratas macho no copuladoras y conducta sexual heterotípica en ratas hembra con kindling en el área preóptica media o amígdala *Tesis de Maestría en Ciencias (Neurobiología)*. Centro de Neurobiología UNAM, México En:(pp 91), Placer, Centro de Neurobiología Campus UNAM-UAQ. Published
- 97 - Raisman G, Field PM 1973 Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen *Brain Res* **54**, 1-29
- 98 - Raivich G, Kreutzberg GW 1993 Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors *Int J Dev Neurosci* **11**, 311-324
- 99 - Robel P, Baulieu E 1995 Neurosteroids biosynthesis and function *Crit Rev Neurobiol* **9**, 383-394
- 100 - Roos J, Roos M, Schaeffer C, Aron C 1988 Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat *J Comp Neurol* **270**, 121-131



- 101 - Selmanoff MK, Brodtkin LD, Weiner RI, Siiteri PK 1977. Aromatization and 5alpha-reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat *Endocrinology* **101**, 841-848.
- 102 - Silverman AJ, Krey LC 1978 The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea pig brain I Intra-and-extrahypothalamic projections *Brain Res* **157**, 233-246
- 103 - Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study *J Comp Neurol* **294**, 76-95.
- 104 - Simerly RB, Swanson LW, Gorski RA 1984 Demonstration of a sexual dimorphism in the distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus of the rat *J Comp Neurol* **225**, 151-166.
- 105 - Simerly RB, Swanson LW, Gorski RA 1985 The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism *Brain Res* **330**, 55-64.
- 106 - Stanella-Alcalá R. 1992. Fisiología de la absorción y secreción intestinal. En Tresguerres (Ed ), *Fisiología Humana*. (pp. 775-791) Madrid: Interamericana McGraw-Hill.
- 107 - Thorton JE. 1986 Heterotypical sexual behavior: Implications from variations. En C y F Siegel (Ed.), *Olfaction and endocrine regulation*. (pp. 11-21) Press London.
- 108 - Tsai MJ, O'Malley BW 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members *Annu Rev Biochem* **63**, 451-486.
- 109 - Valera S, Ballivet M, Bertrand D 1992 Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9949-9953.
- 110 - Vito CC, Fox IO 1982. Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain *Dev Brain Res* **2**, 97-110
- 111 - Ward I, Weisz J 1984 Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers *Endocrinology* **114**, 1635-1644.
- 112 - Ward IL, Weisz J 1980. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males *Science* **207**, 328-329

- 113 - Watson RE, Hoffmann GE, Wiegand SJ 1986 Sexually dimorphic opioid distribution in the preoptic area: manipulation by gonadal steroids *Brain Res* **398**, 157-163
- 114 - Weisz J, Brown B, Ward I 1982 Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of female rat fetuses *Neuroendocrinology* **35**, 374-379
- 115 - Williams SJ, Papka RE 1996 Estrogen receptor-immunoreactive neurons are present in the female rat lumbosacral spinal cord *J Neurosci Res* **46**, 492-501
- 116 - Yu WH, Srinivasan R 1981 Effect of testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone on regeneration of the hypoglossal nerve in rats *Exp Neurol* **71**, 431-435
- 117 - Zimmerberg B, Mickus LA 1990 Sex differences in corpus callosum: influence of prenatal alcohol exposure and maternal undernutrition *Brain Res* **537**, 115-122

## 10. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
(1) Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	6
(2) Biosíntesis de esteroides ováricos	9
(3) Mecanismo de acción de las hormonas esteroides	14
(4) Distribución de receptores de estradiol $\alpha$ y $\beta$ en el sistema nervioso central (SNC) de la rata	15
(5) Papel de las hormonas esteroides en el proceso de diferenciación del SNC	19
(6) Establecimiento del dimorfismo sexual en el NSD-APo	25
(7) Dimorfismo sexual en el NSD-APo representado en cortes coronales	26
(8) Localización anatómica de la CA en el hombre y en la rata	28
(9) Conexiones olfatorias	30
(10) Corte horizontal de la CA y bulbos olfatorios	32
(11) Estructuras cerebrales que proyectan sus axones a través de la CA	36
(12) Epitelio endimario mostrado en una microfotografía de luz de la CA	38
(13) Áreas seleccionadas para realizar el conteo de axones mielínicos en la CA	49
(14) Fotomicrografías de luz de la CA; aumento 10x	51
(15) Fotomicrografías de luz de la CA; aumento 40x	52
(16) Fotomicrografías de luz de la CA; aumento 100x	53
(17) Área total de la CA en ratas macho y hembras control	57
(17 A) Efecto de la castración y del tratamiento con testosterona y AID en ratas macho sobre el área total de la CA	57
(17 B) Efecto del tratamiento con testosterona y AID en ratas hembras sobre el área total de la CA	57
(18) Área rostral de la CA en ratas macho y hembras control	59
(18 A) Efecto de la castración y del tratamiento con testosterona	

y AID en ratas macho sobre el área rostral de la CA	59
(18 B) Efecto del tratamiento con testosterona y AID en ratas hembras sobre el área rostral de la CA	59
(19) Área caudal de la CA en ratas macho y hembras control	61
(19 A) Efecto de la castración y del tratamiento con testosterona y AID en ratas macho sobre el área caudal de la CA	61
(19 B) Efecto del tratamiento con testosterona y AID en ratas hembra sobre el área caudal de la CA	61
(20) Área capilar en la CA rostral	63
(21) Área capilar en la CA caudal	63
(22) Densidad axonal en la CA rostral	65
(23) Densidad axonal en la CA caudal	65

## **Tablas**

## **Página**

(1) Diferencias sexuales estructurales en el SNC de mamíferos	21
---	----