



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A
DISTANCIA
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA**

29 JUN 2003

1748

TESIS DOCTORAL

**DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL NÚCLEO DE LA
ESTRÍA TERMINAL EN RATAS CON EL SÍNDROME DE
INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS**

Alicia García Falgueras
Licenciada en Psicología

Madrid, Junio 2003

DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL NÚCLEO DE LA ESTRÍA TERMINAL EN RATAS CON EL SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS.

Tesis doctoral presentada para la obtención
del grado de doctor en el

DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA

Alicia García Falgueras
Licenciada en Psicología

Directora: Dra. Paloma Collado Guirao.
Co-Director: Dr. Antonio Guillamón Fernández.

Agradecimientos

Quiero manifestar mi sincera gratitud a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado en la realización de esta Tesis.

Al Profesor Doctor Don Antonio Guillamón Fernández, por su sabia dirección, su rigor científico, su apoyo y su calidad humana. Por las horas de su tiempo invertidas en este trabajo, incluso en tiempo de descanso, sábados y domingos. Por haber compartido conmigo sus conocimientos, que tan útiles me han resultado siempre. Por el entusiasmo contagioso que siente cuando los datos empiezan a hablar e ilusionarse todas las veces de igual manera por ello. Por haber aceptado la dirección de esta Tesis sin conocerme previamente.

A la Doctora Paloma Collado Guirao, por su calidad investigadora, su dedicación, comprensión y cariño. Por ser como es, por haber confiado y creído siempre en mí y por haberme proporcionado todos y cada uno de los medios que le solicité para elaborar este trabajo. Por su vocación investigadora y su curiosidad científica. Por su sensatez, entusiasmo y conocimientos, que me han servido en innumerables ocasiones durante la realización de este trabajo.

A la Doctora Rosa Fernández y al Doctor Eduardo Pásaro, por el trabajo en colaboración que hemos llevado a cabo estos años, sin el cual esta Tesis no hubiera podido elaborarse. Por las horas que me ha dedicado Rosa para provocar y aumentar mi conocimiento sobre las técnicas de biología molecular, que tan imprescindibles me han resultado para este trabajo. Por los correos electrónicos científicos que hemos intercambiado tan frecuentemente y que tan útiles me han resultado. Por haberme acogido ambos tan calurosa y afectuosamente durante mi estancia en La Coruña, de la que vine con muy buenos recuerdos y muchas cosas aprendidas.

A los profesores del Departamento de Psicobiología de la UNED que mostraron interés en este Trabajo, en especial a la Dra. Pérez-Laso, por proporcionarme tan amablemente las fotografías de conducta maternal. A los profesores del Departamento de Psicobiología y Psicofisiología de la Universidad de Granada, Doctora Filomena

Molina, Doctora Marisa Arnedo, Doctor Juan Manuel Jiménez, Doctor Alberto Morales y Profesor Doctor Pío Tudela, por haber despertado en mi el interés y el entusiasmo por la investigación en general y en la Psicobiología en particular.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la ayuda económica concedida para la realización de esta Tesis.

A la investigadora Dra. Cynthia L. Jordan del Departamento de Psicología de la Universidad de Berkeley (USA), por su cortesía en cedernos los animales portadores de la mutación en el gen del receptor de andrógenos sin los cuales esta Tesis no hubiera podido realizarse.

A Cristina Nicanor y Telmo Hervías, por tantas comidas juntos, por tantas horas de distensión y risas. Por los ánimos que me brindaron en estos años, el apoyo y el calor humano. Por tantos buenos ratos, tantas complicidades, tanta amistad.

A M^a Luz Barona, por su caluroso recibimiento y bienvenida en mis primeros tiempos, su ayuda altruista, su amor por la ciencia y su enorme bondad y calidad humana. Por tantos cafés amenos que hemos compartido y por tantos ánimos y apoyo que he recibido de ella.

A todos mis compañeros, Doctora Cilia Armida, Doctora Helena Pinos, Beatriz Carrillo, Francisca Herrera, Verónica Rodrigo, Miguel Miguens, Miguel Biscaia, con los que he pasado muy buenos momentos.

Al personal de laboratorio, Luis Carrillo, Luis Troca (los Luí), Gonzalo Moreno y Alberto Marcos por toda su ayuda, su apoyo logístico, su comprensión y su profesionalidad. Por tantas charlas que amenizaron el trabajo, por su diligencia, seriedad y paciencia.

A mis padres, Salvador García Palau y Pilar Falgueras Cano, por apoyarme siempre, darme ánimos, comprenderme y ayudarme. Por confiar y creer siempre en mí.

En especial, a Andrés Báez Moreno, por estar ahí siempre, por cada consejo, cada opinión, cada palabra de ánimo que me ha dedicado. Por entender mi dedicación a la Ciencia y compartirla, viniendo tantos fines de semana al laboratorio conmigo. Por ser mi apoyo incondicional, por haber seguido cada uno de los pasos en la elaboración de esta Tesis doctoral como si fuera la suya propia, aún no siendo de Derecho Financiero. Por haber hecho el enorme esfuerzo de comprender las principales claves del misterio de la diferenciación sexual (como *amateur*..). Por ser como es. Por quererme. Por todo.

A todos mi más sincero agradecimiento.

Capítulo 1: Determinación y Diferenciación Sexual.....	1
1.1. DETERMINACIÓN GENÉTICA DEL SEXO.....	3
1.2. DETERMINACIÓN GONADAL DEL SEXO.....	12
1.2.1. Gónadas.....	12
1.2.2. Conductos genitales.....	15
1.2.3. Genitales externos.....	22
1.3. DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL SISTEMA NERVIOSO EN MAMÍFEROS.....	27
1.3.1. Dimorfismo en el Sistema Vomeronasal (SVN).....	30
1.3.1.1. Dimorfismo sexual en el órgano vomeronasal (OVN).....	36
1.3.1.2. Dimorfismo sexual en el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA).....	37
1.3.1.3. Dimorfismo sexual en el Núcleo del Tracto Olfatorio Accesorio (NTOA).....	38
1.3.1.4. Dimorfismo sexual en el Núcleo de la Estría Terminal (NEST).....	40
1.3.1.5. Dimorfismo sexual en la amígdala medial (Me).....	51
1.3.1.6. Dimorfismo sexual en el Núcleo Sexodimorfo del Área Preóptica Medial (NSD-APM).....	53
1.3.1.7. Dimorfismo sexual en otros núcleos hipotalámicos que reciben proyecciones del OVN.....	56
1.3.1.8. Dimorfismo sexual en estructuras en las que las hembras muestran mayor patrón morfológico que los machos y que están relacionados con el SVN (AVPv y LC).....	57
1.3.2. Sistema del Núcleo Espinal Bulbocavernoso (NEB).....	66
1.3.3. Mecanismos explicativos a la diferenciación sexual.....	70
1.3.3.1. Hipótesis de la Aromatasa.....	73
1.3.3.2. Mecanismos genómicos y no genómicos.....	80
1.3.3.3. Mecanismos de actuación del estradiol.....	81
1.3.3.4. Receptores NMDA y GABA _A	88
1.4. DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE LA CONDUCTA: LA CONDUCTA MATERNAL NATURAL.....	92

Capítulo 2: Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (SIA) o de Feminización Testicular (*Tfm*).....101

2.1. APROXIMACIÓN HISTÓRICA Y SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS EN HUMANOS.....101

2.2. EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (*AR/Ar*).....104

2.3. SÍNDROME DE FEMINIZACIÓN TESTICULAR (*Tfm*).....108

2.3.1. Genética del *Ar* en ratón y rata.....108

2.3.2. Perfil endocrino de las ratas *Tfm*.....109

2.3.3. Desarrollo gonadal y peso corporal de las ratas *Tfm*.....112

2.3.4. Estudios en el Sistema Nervioso Central de ratas *Tfm*: análisis de un núcleo cerebral (NSD-APM) y un núcleo medular (NEB).....115

2.3.5. Estudios conductuales en ratas *Tfm*.....117

Capítulo 3: Planteamiento y Objetivos de la Investigación.....121

Capítulo 4: Experimento 1: Estudio volumétrico y de población neuronal del Núcleo de la Estria Terminal en ratas *Tfm*.....132

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....134

4.1.1. Sujetos134

4.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerasa Chain Reaction, PCR*)135

4.1.2.1. Extracción del ADN.....135

4.1.2.2. Amplificación de los genes *Ar* y *Sry* por PCR.....136

4.1.3. Técnicas histológicas.....140

4.1.4. Estereología.....142

4.1.4.1. Volumetría.....145

4.1.4.2. Estimación de la población neuronal.....149

4.1.5. Técnicas de análisis de datos.....155

4.2. RESULTADOS.....157

4.2.1. Pesos corporales.....157

4.2.2. Pesos de los componentes del aparato urigenital masculino.....159

4.2.3. Volumetría y estimación de la población neuronal del NEST_{ma}, NEST_{la} y NEST_{pm}.....164

4.3. DISCUSIÓN.....174

**Capítulo 5: Experimento 2: Conducta Maternal Natural en ratas
Tfm.....201**

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....203

5.1.1. Sujetos.....203

5.1.2. Registro de la conducta maternal natural (*Maternal Behavior
Recorder, MBR*)205

5.1.3. Técnicas de análisis de datos.....208

5.2. RESULTADOS.....209

5.3. DISCUSIÓN.....219

**Capítulo 6: Experimento 3: Volumen y población neuronal en el
Núcleo de la Estría Terminal en ratas de raza Wistar y Long
Evans.....225**

6.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....231

6.1.1. Sujetos.....231

6.1.2. Técnicas histológicas.....232

6.1.3. Estereología.....232

6.1.4. Técnicas de análisis de datos.....232

6.2. RESULTADOS.....232

6.3. DISCUSIÓN.....237

Capítulo 7: Discusión General.....244

Capítulo 8: Conclusiones.....253

Capítulo 9: Bibliografía.....257

Índice de figuras y tablas

Figuras

Capítulo 1

Página

1.1. Hipótesis de Graves de la determinación genética gonadal... ..	12
1.2. Migración de las células germinales primordiales del mesonefros a la cresta urogenital.....	13
1.3. Eje de retroalimentación hipotálamo-hipófisis-gónadas.....	16
1.4. Representación esquemática del Sistema Vomeronasal en la rata.....	33
1.5. Límites citoarquitectónicos del Núcleo de la Estría Terminal (NEST)	42
1.6. Representación esquemática de la actuación sinérgica genómica y no genómica (cross-talk) de los esteroides durante la diferenciación sexual.....	92

Capítulo 2

2.1. Localización en el cromosoma X del gen del receptor de andrógenos y representación esquemática de éste.....	106
--	-----

Capítulo 4

4.1. Gel de poliacrilamida en el que se especifican las bandas de los diferentes grupos experimentales.. ..	139
4.2. Equipo de Estereología con el que se llevó a cabo el recuento del volumen y número de neuronas del NEST.....	145
4.3. Principio de Cavalieri.....	147
4.4. Criterio de inclusión y exclusión para el recuento de puntos y la aplicación del principio de Cavalieri.....	148
4.5. Representación del disector óptico como paralelepípedo inmerso en un tejido irregular.....	151
4.6. Disector óptico en versión tridimensional y bidimensional, siendo ésta última sobre la que se trabaja, clasificando las células como se expone en el dibujo.....	152
4.7. Gráfico de las medias de los pesos corporales en los distintos grupos experimentales.....	158
4.8. Fotografía que muestra el desarrollo gonadal incompleto de los machos <i>Tfm</i> respecto a los machos hermanos y control de la misma raza.....	160

4.9. Gráfico de las medias de los pesos de los diferentes componentes del aparato urogenital masculino en los machos experimentales.	161
4.10. Microfotografías de las subdivisiones del NESTma y NESTla en los grupos experimentales.	162
4.11. Microfotografías de la subdivisión del NESTpm en los grupos experimentales.	163
4.12. Gráfico de las medias del número de neuronas en la subdivisión NESTma.....	166
4.13. Gráfico de las medias del volumen en la subdivisión NESTla.....	168
4.14. Gráfico de las medias del número de neuronas en la subdivisión NESTla.....	169
4.15. Gráfico de las medias del volumen en la subdivisión NESTpm.....	172
4.16. Gráfico de las medias del número de neuronas en la subdivisión NESTpm.....	173

Capítulo 5

5.1. Fotografías que muestran las conductas maternas más características de la rata... ..	205
5.2. Medias del resultado en la calidad del nido entre los grupos de hembras que llevaron a cabo conducta maternal.	210
5.3. Tiempo medio empleado por los distintos grupos de hembras para llevar a cabo el acarreo completo en el primer día de registro.	211
5.4. Tiempo medio empleado por los distintos grupos de hembras para llevar a cabo el acarreo completo en el tercer día de registro.	212
5.5. Representación gráfica del porcentaje de animales por grupo que realizaron el acarreo completo los diferentes días del registro.	213
5.6. Representación gráfica del tiempo total empleado por las madres de los diferentes grupo en llevaron a cabo la conducta de acicalamiento hacia sus crías.	215
5.7. Representación gráfica de la frecuencia con la que las madres de los diferentes grupo llevaron a cabo la conducta de acicalamiento hacia sus crías.	216
5.8. Representación gráfica de la frecuencia con la que las madres de los diferentes grupo llevaron a cabo la conducta de tomar contacto con sus crías.	217
5.9. Representación gráfica de la frecuencia con la que las madres de los diferentes grupo adoptaron la postura de amamantamiento para facilitar el acceso a los pezones de sus crías.	218

Capítulo 6

6.1. Representación gráfica del volumen de la subdivisión NESTpm para los grupos Wistar y Long Evans.	233
6.2. Representación gráfica del número de neuronas de la subdivisión NESTma para los grupos Wistar y Long Evans.	234
6.3. Representación gráfica del número de neuronas de la subdivisión NESTla para los grupos Wistar y Long Evans.....	235
6.4. Representación gráfica del número de neuronas de la subdivisión NESTpm para los grupos Wistar y Long Evans.....	236

Tablas

Capítulo 4

4.1. Representación de las medias \pm EMS de los pesos corporales de todos los animales experimentales.	157
4.2. Representación de las medias \pm EMS de los pesos de los componentes del aparato urogenital masculino en los grupos de machos.	159
4.3. Resultados de la aplicación de la prueba U-Mann-Whitney para el número de neuronas del NESTma.	165
4.4. Resultados de la aplicación de la prueba U-Mann-Whitney para el volumen y el número de neuronas del NESTla.	167
4.5. Resultados de la aplicación de la prueba U-Mann-Whitney para el volumen y el número de neuronas del NESTpm.	171
4.6. Perfil endocrino de los animales experimentales para los que hay referencias bibliográficas.	182

Abreviaturas

A

A(p): área asociada al punto
AA: aminoácidos
AFP: alfa-feto-proteína
AMH/MIS: hormona
antimülleriana/sustancia inhibidora de Müller.
AMHR: receptor de la hormona
antimülleriana
APM: área preóptica medial
Ar: receptor de andrógenos,
nomenclatura para animales
AR: receptor de andrógenos,
nomenclatura para humanos
Aro: enzima aromatasa
ATV: área tegmental ventral
AVPv: núcleo anteroventral,
periventricular

B

BE: benzoato de estradiol
BC: músculo bulbocavernoso
BOA: bulbo olfatorio accesorio
BOP: bulbo olfatorio principal
BZD: benzodiazepinas

C

CA: comisura anterior
CGP: células germinales primordiales
CRF: factor de liberación de
corticotropina

D

DA: dopamina
d.p.c.: días post coito
d.p.o.: días post ovulación.
DHT: 5 α dihidro testosterona

E

E: día embrionario
E₂: estradiol
ER: receptor de estrógeno

F

FDT: factor determinante de testículos
FSH: hormona estimulante del folículo

G

GABA: receptor ácido-gamma-amino-
butírico
GH: *growth hormone*, hormona del
crecimiento
GHRH: hormona liberadora de GH
GnRH: hormona liberadora de
hormonas gonadotrópicas

H

HH: grupo de hembras hermanas
HLE: grupo de hembras Long Evans
HMR: grupo de hembras de la misma
raza
HT*fm*: grupo de hembras *Tfm*
HW: grupo de hembras Wistar
HVM: hipotálamo ventromedial

I

IGF-1: *insuline like growth
hormone*, factor de crecimiento parecido a la insulina-1
IC: músculo isquiocavernoso

L

LA: músculo *levator ani*
LC: *locus coeruleus*
LE: raza de ratas Long Evans
LH: hormona luteotrópica

M

Me: amígdala medial
MH: grupo de machos hermanos

MLE: grupo de machos Long Evans
MMR: grupo de machos de la misma
raza
MTfm: grupo de machos Tfm
MW: grupo de machos Wistar

N

NA: noradrenalina
NDL: núcleo lumbar dorsolateral
NEB: núcleo espinal bulbocavernoso
NEST: núcleo de la estría terminal
NESTim: núcleo de la estría terminal,
parte intermedial
NESTjxt: núcleo de la estría terminal,
parte juxtacapsular
NESTla: núcleo de la estría terminal,
parte lateral anterior
NESTld: núcleo de la estría terminal,
parte lateral dorsal
NESTlp: núcleo de la estría terminal,
parte lateral posterior
NESTlv: núcleo de la estría terminal,
parte lateral ventral
NESTma: núcleo de la estría terminal,
parte medial anterior
NESTmv: núcleo de la estría terminal,
parte medial ventral
NESTpi: núcleo de la estría terminal,
parte posterior intermedia
NESTpm: núcleo de la estría terminal,
parte posterior medial
NESTsc: núcleo de la estría terminal,
parte supracapsular
NESTsv: núcleo de la estría terminal,
parte subventricular
NESTv: núcleo de la estría terminal,
parte ventral
NMDA: receptor N-metil-D-aspartato
NSD-APM: núcleo sexodimórfico del
área preóptica medial
NTOA: núcleo del tracto olfatorio
Accesorio

O

OVN: órgano vomeronasal

P

P: días postnatal
Pb: pares de bases
PCR: *polymerasa chain reaction*
PMCo: amígdala posteromedial cortical
PMV: núcleo premamilar ventral
PO: núcleo preóptico
PrR: receptor de progesterona
PS: núcleo parastrial
PT: propionato de testosterona
PTX: picrotoxina

R

r.p.m.: revoluciones por minuto

S

SGP: sustancia gris periacueductal
SIA: síndrome de insensibilidad a los andrógenos, nomenclatura para humanos
SIAC: síndrome de insensibilidad a los andrógenos completo
SIAM: síndrome de insensibilidad a los andrógenos mínimo
SIAP: síndrome de insensibilidad a los andrógenos parcial
SNC: sistema nervioso central
SO: núcleo supraóptico
SOP: sistema olfatorio principal
SQ: núcleo supraquiasmático
SVN: sistema vomeronasal

T

T: testosterona
Tfm: *testicular feminization*,
nomenclatura para animales
TH: tirosina hidroxilasa

W

WI: raza de ratas Wistar

Capítulo 1

Determinación y diferenciación sexual

La existencia de dos sexos es un hecho generalizado en el reino animal, aunque los procesos de diferenciación que dan lugar a esta dicotomía no son iguales entre especies. Los mecanismos de determinación del sexo pueden clasificarse en tres amplias categorías: determinación del sexo por la temperatura (DST), determinación del sexo por estímulos conductuales o sociales (DSC) y por último determinación del sexo por mecanismos genéticos (DSG) (Crews, 1993).

En la primera categoría se encuadran los reptiles (cocodrilos, tortugas), en los que la temperatura de incubación a la que se sometan los huevos será la que desencadene la formación de un sexo u otro, al modificar la distribución espacial y temporal de los receptores hormonales y de las enzimas claves en la diferenciación. Los animales que pertenecen a la segunda categoría (DSC), que son entre otros varios tipos de peces de arrecifes de coral, cambian su sexo gonadal en función de la percepción del ambiente que, mediante estímulos sensoriales, originan cambios hormonales en el individuo para dirigir la diferenciación hacia un sexo u otro. Por último en los organismos con determinación genética del sexo (DSG), la sexualidad de los individuos se establece en el momento de la fecundación, en función de la constitución cromosómica de los gametos (Crews, 1993).

En mamíferos (pertenecientes a la categoría DSG) el proceso por el cual se desarrolla un fenotipo sexual resulta de complejas interacciones génicas, celulares y hormonales. De estas interacciones surgirán seres con diferencias inter e intraespecíficas, como resultado de las múltiples posibilidades de combinación de estas variables génicas, celulares y hormonales. Una de las diferencias intraespecíficas es la que existe entre los machos y las hembras de una misma especie. En ocasiones estas diferencias son tan llamativas que algunos taxónomos han llegado a errar en la clasificación, considerando a los sexos de una misma especie como pertenecientes a especies diferentes (Wilson, 1980).

Para que se originen los dos sexos, son necesarios una serie de procesos secuenciales y excluyentes de desarrollo en los que se van determinando y diferenciando las características propias de cada uno de ellos.

En un primer momento, con la fecundación, se inicia la determinación sexual. Esta determinación sexual trae consigo la determinación del sexo cromosómico (XX o XY), según los cromosomas sexuales existentes y, posteriormente, la diferenciación gonadal, en la que las gónadas inician su diferenciación hacia ovario o testículo (sexo gonadal) según el sexo cromosómico. Después de la determinación del sexo en el proceso de desarrollo, sucede la diferenciación sexual, que es el mecanismo por el cual las características sexuales secundarias emergen, como consecuencia del sexo cromosómico y del tipo de gónada presente (Crews y Moore, 1986; Habert y cols., 2001). La diferenciación sexual continúa en otros niveles del organismo; tal es el caso del desarrollo del sistema nervioso central (diferenciación sexual del sistema nervioso). Como resultado de todo lo anterior, en el futuro comportamiento de los individuos existirán diferencias entre machos y hembras de una misma especie (diferenciación sexual conductual) en distintas expresiones conductuales, tales como la parental, entre otras.

1.1. DETERMINACIÓN GENÉTICA DEL SEXO.

La observación de los cromosomas sexuales en mamíferos hacía pensar que el determinismo del sexo tenía una base cromosómica. En nematodos, moluscos, equinodermos, artrópodos y mamíferos el sistema de cromosomas sexuales es el XX/XY, siendo la hembra el sexo homogamético (XX), mientras que el macho es el heterogamético (XY). En lepidópteros, tricópteros, reptiles, aves y algunos anfibios, por el contrario, el sexo heterogamético es la hembra y el homogamético el macho (ZW hembra vs. ZZ macho) (Haqq y Donahoe, 1998; Lacadena, 1999; Graves, 2000).

Hasta el año 1959 se pensaba que en mamíferos, al igual que ocurría en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el determinismo del sexo estaba controlado por la dosis o el ratio de cromosomas X, puesto que las moscas XX son hembras (ratio de uno o más cromosomas X) y las X0 machos infértiles (ratio de uno o menos cromosomas X). La presencia del cromosoma Y se proponía como innecesaria para determinar el sexo, pero imprescindible para la fertilidad masculina. Posteriormente se publicaron diversos trabajos sobre el análisis citogenético de individuos con constituciones de cromosomas sexuales poco frecuentes, en los que se ponía de manifiesto que los cromosomas sexuales no funcionaban de la misma manera en los humanos y en el ratón que como se había demostrado que lo hacían en la *Drosophila* (Bullejos, Tesis Doctoral, 1998; Haqq y Donahoe, 1998; Goodwin, 1999; Capel, 2000). Así, el descubrimiento de una mujer 45,X0 (síndrome de Turner) (Ford y cols., 1959) y de un individuo de fenotipo masculino con cariotipo 47 XXY (síndrome de Klinefelter) (Jacobs y Strong, 1959) dejaron clara constancia de que en la especie humana, en ausencia de cromosoma Y, el fenotipo sexual es el femenino, de manera que el cromosoma Y debía actuar como inductor dominante del fenotipo masculino. Esta dominancia pudo demostrarse definitivamente en humanos con la descripción de individuos 47 XXY, 48 XXYY, 48 XXXY y 49 XXXXY con fenotipo masculino (Fraccaro y cols., 1960). De esta forma quedó firmemente establecido que en mamíferos euterianos (placentarios), el cromosoma Y está directamente implicado en el desarrollo del fenotipo y las gónadas masculinas.

El paso previo a la determinación sexual, el originario, a partir del cual empieza la gónada bipotencial en el embrión a diferenciarse hacia un sexo u otro se ha estado buscando desde hace años. Ya Aristóteles en el año 355 A.C. sugirió que el dimorfismo sexual en humanos se debía a la temperatura del semen en el momento de la fecundación, siendo el semen caliente el que originaría a los hombres, mientras que el semen frío sería el que diese lugar a las mujeres (Haqq y Donahoe, 1998). Las primeras explicaciones científicas apuntaban al antígeno Y (H-Y), que fue nombrado por primera vez por Einchwald y Silmsler en 1955 (Eichwald y Silmsler, 1955). Éste se descubrió mediante experimentos de trasplantes de piel entre animales isogénicos (esto es, que poseen exactamente la misma información genética) para estudiar los factores de compatibilidad de diferentes tejidos ante los trasplantes. Cuando a las hembras se les trasplantaba las células linfoides de los machos isogénicos, éstas rechazaban los injertos de piel procedentes de éstos debido a la presencia de un antígeno (una proteína) en la membrana plasmática de las células trasplantadas de los machos, al que se le denominó antígeno H-Y (del inglés *Histocompatibility-Y*) (Koo y cols., 1977). Puesto que la única diferencia genética entre sexos en mamíferos isogénicos era la presencia del cromosoma Y, se pensó que dicho cromosoma contenía el gen estructural o el gen regulador de la expresión de dicho antígeno (H-Y). Esta característica, junto con el hecho de que se encuentra evolutivamente conservado y asociado al sexo heterogamético (Watchel, 1977), llevaron a estos autores a proponer que el antígeno H-Y era el producto del gen determinante de testículo y por lo tanto el factor determinante de la formación de testículos (FDT) (Eichwald y Silmsler, 1955).

Progresivamente se fueron encontrando contradicciones a esta determinación causal entre el antígeno H-Y y la formación de gónadas masculinas, así como debilidades explicativas y contradicciones: en ratones macho que padecen el síndrome de feminización testicular y por lo tanto, presentan genitales externos feminizados, el antígeno H-Y está presente (Koo y cols., 1977) y también añade disonancia el hecho de que en lemures escandinavos (*Myopus schisticolor*), individuos XY con el antígeno H-Y, se desarrollan como hembras normales y fértiles (Wachtel, 1977). Con posterioridad, se ha puesto de manifiesto que la función del antígeno H-Y consiste en un efecto organizador sobre las células germinativas primordiales (CGP) (Haseltine y Ohno, 1981).

En la década de los noventa se encontró una región en el cromosoma Y que parecía ser la respuesta última al proceso. El factor determinante de testículo (FDT) podría ser el gen *SRY* (*Sex Determining Region Y*), situado en el brazo corto del cromosoma sexual Y y que se expresaba en el ratón entre los 10.5 y 12.5 días post coito (d.p.c.) (Berta y cols., 1990; Capel y col. 1999; Capel, B. 2000), en la rata entre los 10.5 y 13.5 d.p.c. (Koopman y cols., 1990) y en humanos entre los 41 y 44 días post ovulación (d.p.o.) (Hanley y cols., 2000), siendo todos estos momentos determinantes en la formación de gónadas masculinas de cada especie. Las investigaciones de manipulaciones genéticas de este gen aportaron indicios de su implicación en la determinación sexual masculina y en la formación de testículos: el trasplante de un fragmento de 14 kilobases del gen *Sry* a ratones XX transgénicos era suficiente para provocar el desarrollo de testículos (Koopman y cols., 1990; Koopman y cols., 1991) mientras que la delección de este gen del cromosoma Y en ratones transgénicos XY^{tdym1} provocaba el desarrollo de ovarios (Lovell-Badge y Roberston, 1990).

El *SRY* codifica una proteína (la SRY) que es la que inicia el camino hacia la formación de gónadas masculinas y/o inhibe la formación de gónadas femeninas, mediante la regulación en la transcripción de otros genes implicados en la gonadogénesis (Lovell-Badge, 1993; Dubin y Ostrer, 1994). La proteína codificada por este gen, al igual que sucede con otros genes implicados en la génesis gonadal, contiene una región conservada evolutivamente (*hight mobility group*, HMG-box), de 72 a 83 aminoácidos de longitud y compuesta por tres hélices α . Todas las mutaciones descritas en el *SRY* que causan reversión sexual completa en la dirección macho a hembra, se localizan en esta región altamente conservada (HMG-box) (Haqq y Donahoe, 1998). Esta proteína reconoce diferentes sitios de unión a distintos genes pudiendo modificar o alterar su expresión durante el proceso de formación gonadal (Lee y Donahoe, 1993).

Dos de los genes influidos por la *SRY/Sry* son el gen regulador de la hormona anti-Mülleriana o sustancia inhibidora de Müller (AMH/MIS) (Gustafson y Donahoe, 1994) y el gen regulador de la enzima Aromatasa P₄₅₀ (Lee y Donahoe, 1993). El primer gen mencionado es el responsable de la liberación de la hormona anti-Mülleriana (AMH/MIS) que fue descrita por primera vez por el profesor Alfred Jost en 1947 (*l'hormone inhibitrice*). Jost propuso que un factor testicular diferente de la testosterona durante el desarrollo embrionario masculino, causaba la regresión de los conductos de

Müller, precursores de las gónadas femeninas, [Jost, 1947; en (Lee y Donahoe, 1993)]. En posteriores investigaciones, se ha puesto de manifiesto que la actuación del *SRY/Sry* sobre la AMH/MIS se lleva a cabo a través de la participación de los genes *SOX9/Sox9* y *SF-1/Sf-1*, asunto que más adelante abordaremos en detalle (Haqq y cols., 1993; Haqq, 1994; De Santa Bárbara y cols., 1998; Barrio y Ezquieta, 2001).

El segundo gen sobre el que la proteína Sry actúa es el de la enzima Aromatasa P₄₅₀, que es la responsable de la conversión de la testosterona al estradiol (Roselli y Resko, 1984). Este proceso de aromatización proporciona parte del estradiol con el que cuentan los organismos para llevar a cabo la diferenciación sexual a diferentes niveles.

Se ha propuesto que la proteína Sry actúa incrementando la actividad de la AMH/MIS y reprimiendo la actividad de la enzima Aromatasa, provocando así que haya más liberación por parte de las células de Sertoli de AMH/MIS y que la testosterona liberada por las células de Leydig no se aromatice a estradiol, al reducirse la actividad de la enzima aromatasa. Como síntesis de la actuación del gen *SRY/Sry* habría mayor cantidad de elementos “masculinizantes” activos que dirijan eficazmente la diferenciación sexual de la gónada bipotencial hacia la formación de testículos (Haqq y cols., 1992; Gustafson y Donahoe, 1994; Kierszenbaum, 1994; Teixeira y cols., 1999).

Pero existen asimismo otros genes aparte de los comentados, sobre los que la proteína del gen *SRY/Sry* está actuando para modificar o alterar su expresión. La existencia de estos otros genes, el papel crítico de la dosis y del momento de actuación para el gen *SRY/Sry* en su expresión durante el desarrollo gonadal masculino efectivo (cualquier alteración en cantidad y momento de expresión modifica su efectividad), la dilatación temporal entre su expresión y la activación de sustancias clave en la gonadogénesis (como la AMH/MIS) y las recientes y abundantes investigaciones llevadas a cabo sobre la genética de la sexualidad (Haqq y Donahoe, 1998; Capel, 2000; Vaiman y Pailhoux, 2000), consolidan cada vez más la idea de que el gen *SRY/Sry* no actúa aislado y que es necesario, pero no suficiente, para llevar a cabo la cascada de acontecimientos desde la gónada bipotencial hasta el dimorfismo sexual.

Puesto que las mutaciones en genes implicados en la determinación sexual no son letales, como sí lo son las relacionadas con órganos vitales como el riñón, pulmón o

corazón, ha sido posible el progresivo esclarecimiento de los diferentes genes que actúan en cascada en la gonadogénesis a través de los pacientes que presentaban infertilidad o reversiones sexuales por mutaciones o lesiones citogenéticas detectables (Capel, 2000; Barrio y Ezquieta, 2001). Los genes que actúan conjuntamente con el *SRY/Sry* para la determinación sexual aún no han sido determinados completamente. En total han sido aislados unos 138 genes expresados en las gónadas, de los cuales 79 se detectaron específicamente en las gónadas en formación y en los conductos sexuales, siendo 21 de estos 79 de expresión sexodimorfa. Gran parte de estos genes son desconocidos y sus actuaciones en el proceso de diferenciación gonadal no han sido determinadas aún (Wertz y Herrmann, 2000). De entre los que sí se han descrito en la literatura, por la existencia de mutaciones en ellos que alteran la formación normal de las gónadas, entre otras razones, nosotros trataremos cinco, el *SF-1/Sf-1*, el *WT1/Wt1*, el *SOX-9/Sox-9*, el *DAX-1/Dax-1* y el *SOX-3/Sox-3*. En general, estos genes actúan en cooperación con el *SRY* para activar la hormona anti-Mülleriana o desempeñan su función en algún punto intermedio entre la expresión del gen *SRY* y la liberación de AMH/MIS.

El primero de los genes que comentaremos es el gen *SF-1/Sf-1* (*steroidogenic factor-1*). Se expresa en la rata entre los 10.5 y 11.5 d.p.c. en un grupo de células que emergen del mesonefros y se separan en dos poblaciones, una que se dirige a las gónadas y otra que se dirige al córtex adrenal (Clarkson y Harley, 2002). Actúa como factor de transcripción para modular otros genes que codifican proteínas involucradas en la formación de esteroides gonadales y adrenales. El gen *SF-1* humano se localiza en el cromosoma 9q33, tiene 30 kb y está constituido por 7 exones (para revisión, Barrio y Ezquieta, 2001). Su función fue determinada a partir de pacientes XY que presentaban mutación en dos pares de bases (pb) de este gen y poseían reversión sexual completa en la dirección de hombre a mujer. En estudios *in vitro*, se demuestra que el gen *SOX9* (que se comentará más adelante) y el *SF1* están implicados en la regulación de la transcripción de la AMH/MIS. Esta actuación conjunta se ve respaldada por la afinidad que estos genes presentan hacia el promotor de la AMH/MIS y por la habilidad de ambos para interactuar efectivamente (De Santa Bárbara y cols., 1998; Hiort y Holtrehus, 2000; Vaiman y Pailhoux, 2000; Barrio y Ezquieta, 2001).

El gen *WT1* (*Wilms' tumor 1*), situado en el cromosoma 11 (11p13), está implicado en la etiología del tumor de Wilms (descrito por Max Wilms en 1889). Se

expresa en la cresta urogenital del ratón XX y XY a partir del día embrionario 10.5 (E10.5), pudiendo codificar al menos 24 proteínas que pueden regular la transcripción de otros genes o el proceso post-transcripcional del ARN (Scharnhorst y cols., 2001). Si se producen mutaciones en este gen en humanos, se originan hasta cuatro patologías diferentes de reversión sexual en XY en la dirección hombre a mujer (Vaiman y Pailhoux, 2000). Se sabe, por el momento y el lugar de actuación de este gen, que en humanos regula y precede a los genes *SRY* y *DAX-1* (Kim y cols., 1999; Houssain y Saunders, 2001). En ratones también se da esta regulación del *Wtl* sobre el *Sry*, pues se ha demostrado que en animales XY con el *Wtl* mutado la transcripción del gen *Sry* era cuatro veces menor comparado con animales controles no mutados. Este dato indica que, en el ratón, el *Wtl* es determinante para la estabilidad en la transcripción o activación del gen *Sry*. También en ratones el *Wtl* está regulando la expresión del gen *Sox9* (Vidal y cols., 2001; Clarkson y Harley, 2002)

Otro inductor esencial del gen que codifica la AMH/MIS es el gen *SOX9* (*Sry-related HMG box-containing genes-9*). Se localiza en humanos en 17q24-q25 y fue identificado a través de una patología ósea, llamada displasia camptomélica, provocada por mutación en este gen. En esta patología se produce, además del problema óseo, una reversión sexual en la dirección hombre a mujer en el 75 % de los pacientes que la padecen. Su actuación parece ir dirigida hacia la expresión de la AMH/MIS, aunque su función en la determinación sexual se revela cada vez más importante (De Santa Bárbara y cols., 1998; Wunderle y cols., 1998; Capel, 2000; Barrio y Ezquieta, 2001; Vidal y cols., 2001). También está implicado en el desarrollo y formación de otros tejidos como el cerebro, el corazón y el riñón (Pompolo y Haley, 2001). Este gen también posee como el *SRY* una proteína con una región conservada filogenéticamente (HMG-box) cuya función es la de unirse específicamente al ADN (Vaiman y Pailhoux, 2000) y de ahí su acrónimo (*SRY like box containing gene-9*). Su función en la determinación sexual masculina se ha puesto de manifiesto en estudios de manipulación genética: el *Sox9* en ausencia del *Sry*, puede iniciar por sí solo la ruta de determinación masculina provocando en ratones XX transgénicos a este gen la formación de testículos. Estos ratones hembras transgénicos presentan el día E13.5 unos testículos histológicamente idénticos al grupo XY intacto y en la etapa adulta expresan conducta de monta normal (Vidal y col 2001; Canning y Lowell-Badge, 2002; Clarkson y Harley, 2002). Su expresión se inicia en los embriones XX y XY en el 10.5 d.p.c., justo antes o alrededor

del momento de expresión del *Sry*, pero a partir del 11.5 d.p.c. se localiza expresamente en la cresta urogenital de los embriones XY, manteniéndose ya durante toda la gonadogénesis masculina. Además se ha demostrado que su expresión en las gónadas es sexodimorfa en varias especies analizadas, como el ratón, el pollo, la tortuga y el aligador (Kent y cols., 1996; Canning y Lovell-Badge, 2002).

En recientes investigaciones se ha planteado la hipótesis de que el principal gen sobre el que actúa el *SRY* en la determinación sexual masculina sea el *SOX9*. Éste tras ser activado por el *SRY* sería el que pusiese en marcha toda la cascada de acontecimientos hacia la diferenciación sexual y gonadal, comportándose el *SRY* como un "activador" del proceso. Esta hipótesis es retomada con posterioridad por otros autores y en general es la más consolidada en las diversas explicaciones genéticas que surgen en la literatura al fenómeno de la diferenciación sexual genética (Canning y Lovell-Badge, 2002). En el cerebro de la rata y el ratón, se ha encontrado la proteína de este gen en los núcleos de las células de regiones cerebrales tales como el cerebelo (especialmente en las células de Purkinje), cerebro posterior, diencéfalo y córtex cerebral, siendo igual entre especies y entre sexos (Pompolo y Harley, 2001).

Existe un gen localizado en la región Xp21 en humanos y Xp24 en cerdos, llamado *DAX-1/Dax1* (*dosage sensitive sex reversal locus, adrenal hypoplasia congenita at chromosome X, number 1*), que se expresa en la cresta urogenital igualmente en los dos sexos los días 11.5-12.5 y también en el testículo adulto y glándulas adrenales (Parma y cols., 1997; Kim y cols., 1999; Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 2001; Clarkson y Harley, 2002). Esta pequeña zona del cromosoma X corresponde al locus DSS (reversión sexual sensible a la dosis), ya que cuando esta región se duplica por mutación, provoca reversiones sexuales en la dirección hembra a macho, debido a la disfunción hormonal relacionada con las glándulas adrenales que acompaña a esta mutación (Haqq y Donahoe, 1998; Achermann y cols., 2001). También parece estar implicado en la función testicular, concretamente en la espermatogénesis, al provocar hipogonadismo hipogonadotrópico en el macho con mutación en este gen, pero los datos en hombre y en ratón, e *in vivo* e *in vitro* son discordantes (Capel, 2000; Vaiman y Pailhoux, 2000; Clarkson y Harley, 2002). Igual que el *SFI*, el gen *DAX1/Dax1* se

expresa en las gónadas, glándulas adrenales e hipotálamo ventromedial (HVM) entre otros lugares, los días E10.5 en ratón y 33 d.p.o. en humanos (Achermann y cols., 2001).

Al estar este gen situado en el cromosoma X y al provocar reversión sexual en la dirección opuesta a la habitual (macho a hembra) se ha sugerido que el *DAX-1* es responsable del desarrollo genital hacia hembra inhibiendo el desarrollo hacia macho. Pero una mutación en el *DAX1* en ratón XY altera sólo la espermatogénesis y no desencadena la formación de ovarios ni altera el desarrollo de los testículos (para revisión, Capel, 2000). En mamíferos euterianos este gen es autosómico, no estando en los cromosomas sexuales, no pudiendo ser por ello el único regulador de la determinación del sexo de los mamíferos en general. La importancia de la dosis en este gen respecto a la determinación sexual, recuerda otros sistemas de formación de sexos en el reino animal (partenogénesis diploide) pudiendo tratarse por ello de una reminiscencia evolutiva o atavismo (Graves, 1998).

El *SOX3* (*Sry-related HMG box-containing genes-3*) es otro gen ligado al cromosoma X que se ha propuesto como antagonista del *SRY* (o "*SRY* femenino"). La proteína que codifica tiene también la región HMG-box, al igual que el *SRY* y el *SOX9*. El *SOX3* además se encuentra ligado al cromosoma X en todos los mamíferos estando además altamente conservado, mientras que el anterior (*DAX-1*) no se encontraba en el X de los marsupiales (Collignon y cols., 1996). Se expresa en la cresta urogenital en la etapa crucial de desarrollo embrionario genital como el *Sry*, desde el día E11.5 y en las mismas células que lo hace éste, siendo además sus proteínas *in vitro* afines a las mismas regiones de ADN que lo son las del *Sry*, sugiriendo que pueden colaborar o competir por éstas (Collignon y cols., 1996). A este gen se le ha propuesto como antecesor en la evolución del *Sry* en mamíferos, atendiendo a la similaridad que hay entre las secuencias altamente conservadas entre las proteínas *SOX3* y *SRY* (Collignon y cols., 1996; Graves, 1998; Nagai, 2001).

Jennifer Graves en 1998 propuso una hipótesis de actuación de este gen, tomando en consideración sus características de expresión en el espacio y en el tiempo, las de otros genes implicados en la determinación sexual (el *SRY* y el *SOX-9*) y la aproximación evolutiva al fenómeno de formación gonadal. Esta hipótesis compila la maraña de datos referente a la genética de la sexualidad y explica el fenómeno de manera integradora. Propone una interacción entre diferentes genes, el *SRY* y el *SOX3*,

para regular al *SOX9*. Concretamente sugiere que en hembras, el *SOX3* inhibiría las funciones del *SOX9*, mientras que en los machos, el *SRY* inhibiría al *SOX3* permitiendo así la actuación del *SOX9* en su función determinante de testículos. La explicación que esta autora propone para justificar esta hipótesis es que al principio en la evolución, la determinación del sexo se llevaba a cabo según la dosis del gen *SOX3*. Primitivamente en los mamíferos homocigóticos sin inactivación de un X, la dosis del *SOX-3* en los dos cromosomas (uno en cada cromosoma X) sería suficiente para inhibir al *SOX-9* y desarrollarse así el sexo femenino (genotipo *SOX3 SOX3*).

Por otro lado en los heterocigóticos, con una sola copia del *SOX-3* (el otro alelo en el cromosoma Y sería nulo, genotipo *SOX3 SOX3^{nulo}*), la inhibición que el *SOX-3* ejerciese sobre el *SOX9* sería insuficiente y el sexo masculino sería el que prevaleciese al expresarse el gen *SOX9* sin problemas. Pero este sistema de determinación sexual tan frágil y vulnerable evolucionó, de manera que el alelo degradado *SOX3^{nulo}* en heterocigóticos empezó a ejercer un efecto inhibitorio sobre el *SOX-3*, pasando a proteger y asegurar la actuación del *SOX9*. La determinación sexual ya no sería dependiente de la dosis de gen *SOX3*, sino que dependería de la inactivación secuenciada y en cascada de unos genes sobre otros, asegurando la determinación sexual de una manera más robusta y con mayor probabilidad de ser seleccionada para ser transmitida.

En síntesis, Graves propone que para la determinación sexual femenina, el gen *SOX-3* inhibe en su actuación al *SOX-9*, interrumpiendo con ello la formación gonadal y testicular masculina y permitiendo la formación gonadal femenina. En la determinación sexual masculina por el contrario, propone que primero actúa el *SRY* (cuyo antecesor evolutivo fue el *SOX3^{nulo}*) y que éste anula al *SOX-3* al competir con él, dejando con ello vía libre de expresión para el *SOX-9* y la cascada de acontecimientos que éste origina (figura 1.1.) (Graves, 1998a; Graves, 1998b; Graves, 2000).



Figura 1.1. Hipótesis de Graves para la determinación genética gonadal. En las hembras, el gen Sox3 inactivaría al Sox9 y la cascada de formación de testículos no puede llevarse a cabo. En los machos, por el contrario, el gen Sry actuaría sobre el Sox3, impidiendo así que éste anule la expresión del Sox9, pudiendo, por ello, llevarse a cabo la cascada de acontecimientos que conduzcan al desarrollo de testículos (Graves, 1998a; Graves, 1998b; Graves, 2000).

1.2. DETERMINACIÓN GONADAL DEL SEXO

El aparato genital se compone de tres estructuras que son las gónadas, los conductos genitales y los genitales externos. Existe un orden en el desarrollo de estas estructuras y sirviéndonos de éste, expondremos escalonadamente la formación del aparato sexual en machos y hembras, comenzando por la formación de las gónadas en el desarrollo embrionario y especificando, posteriormente, la génesis de los conductos genitales y la formación de los genitales externos.

1.2.1. Gónadas

En vertebrados, las gónadas emergen como una estructura dentro del mesodermo intermedio durante la primera mitad del desarrollo embrionario. En esta región se distinguen tres segmentos que son de craneal a caudal el pronefros, de carácter vestigial y que desaparece posteriormente, el mesonefros, que es la región central de donde

surgirán las gónadas y el metanefros, que es la parte posterior más caudal y de donde emergerán los riñones (Kierszenbaum, 1994; Sandler, 1995; Barrio y Ezquieta, 2001).

En el primero de los estadios de desarrollo gonadal, el estadio pregonadal (en la rata a los 12.5 d.p.c.) las células germinativas primordiales (CGP) se trasladan del mesonefros a la cresta urogenital, siguiendo tres pasos: la traslocación del saco vitelino al intestino posterior, la migración a través del mesenterio dorsal y finalmente la colonización de la cresta urogenital, que en este momento es un engrosamiento de la superficie ventral del mesonefros por esta invasión de células (de 49 células en embriones humanos de 15 días aumentan a 586 en embriones de 30 días) (Cañete y Jiménez, 2001) (Figura 1.2.). La migración de las CGP hacia la cresta gonadal depende de dos factores, que son la interacción transitoria de moléculas con los receptores de las CGP y en segundo lugar, la liberación por parte de la cresta gonadal de sustancias quimiotrópicas. (Kierszenbaum, 1994; Capel, 2000; Habert y cols., 2001). También han sido indentificados en el ratón dos genes determinantes en esta migración de las CGP, que son el *c-kit* y *steel* (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 2001). El gen *Sry* se expresa en abundancia durante esta migración de células del mesonefros a la cresta genital en ratones machos, poniendo de manifiesto que su actuación es clave en este fenómeno (Capel y cols., 1999).

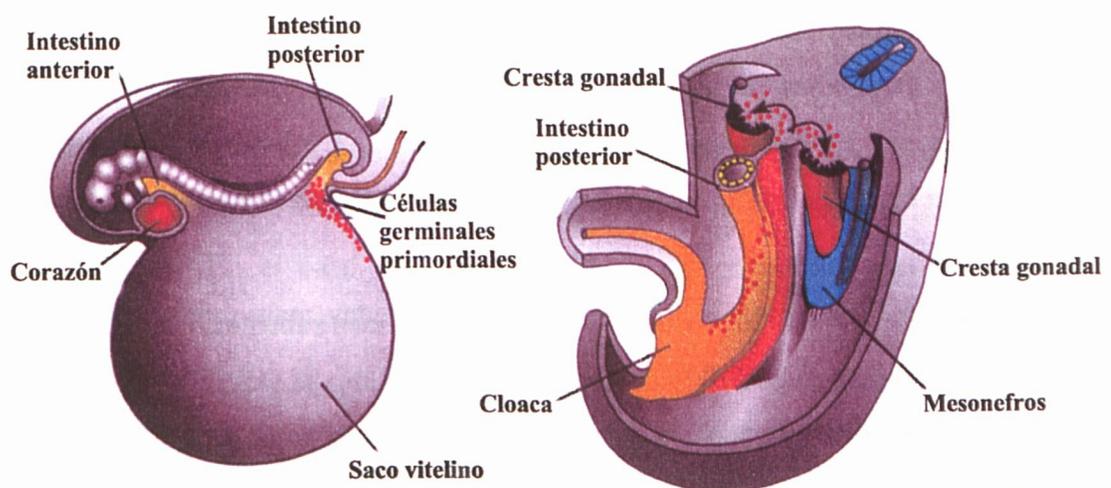


Figura 1.2: Migración de las células germinales primordiales (CGP), representadas en color rojo, a la cresta gonadal, en el estadio pregonadal. Este acontecimiento sucede alrededor del 12 d.p.c. en la rata. (Modificado de Sadler, 1996)

En el segundo estadio, el de gónada indiferenciada o bipotencial (a los 13.5 d.p.c. en rata) se produce el reconocimiento y la interacción en la región de la cresta urogenital entre las CGP que serán los futuros gonocitos, entre las células del epitelio celómico, que serán los precursores de las células foliculares en la hembra o las células de Sertoli en el macho y por último, entre las células mesonéfricas mesenquimales que originarán con posterioridad las células tecales en la hembra y, en el macho, las células de Leydig junto con las células peritubulares y estructuras vasculares (Kierszenbaum, 1994; Capel, 2000; Nef y Parada, 2000).

En el tercer estadio de desarrollo gonadal (en la rata del 14.5 d.p.c. al 16.5 d.p.c.), se produce la definitiva diferenciación sexual. En este último estadio, para la formación de las gónadas femeninas funcionales, son necesarios una serie de eventos: en primer lugar, que el cromosoma Y esté ausente y por tanto, el factor determinante de testículos (FDT) no se exprese; en segundo lugar para la obtención de un ovario fértil, es necesario que existan dos cromosomas X, puesto que en la patología del Síndrome de Turner (44X0), se forman los ovarios pero las células germinales degeneran y el ovario se reduce a un rudimento estéril después del nacimiento (disgenesia ovárica) (Ford y cols., 1959); y en tercer lugar es necesario que los genes implicados en la formación gonadal femenina (*e.g. SOX3, DAX1*) se expresen en el momento adecuado. Si todos estos elementos se dan, los conductos de Wolff degenerarán por la ausencia de testosterona y los conductos de Müller proseguirán su desarrollo por la ausencia de AMH/MIS, transformándose con posterioridad en el útero, los oviductos y la vagina para dar lugar a las gónadas femeninas, a la vez que la formación de los gonocitos, las células foliculares y las células tecales que se iniciaron en el estadio previo, culminan su formación en este estadio (Kierszenbaum, 1994; Capel, 2000; Nef y Parada, 2000).

Por otro lado, para la formación de las gónadas masculinas funcionales, son necesarios otro tipo de eventos diferentes y excluyentes de los anteriores. En primer lugar, es imprescindible que el cromosoma Y esté presente, puesto que un solo cromosoma Y lleva a la diferenciación de testículos independientemente de los cromosomas X presentes; en segundo lugar, es necesario que los genes implicados en la gonadogénesis masculina se expresen en el momento adecuado y siguiendo el orden en cascada preestablecido (*e.g. SRY, SOX9, WT1, SF-1, AMH* y el gen del receptor de andrógenos, *AR*). Si estos dos acontecimientos se producen sin ninguna alteración,

entonces se formarán los testículos continuando el proceso del estadio gonadal anterior, en dos pasos consecutivos: en primer lugar (en el d.p.c. 14.5) se forma el islote testicular de células agregadas, que serán los futuros túbulos seminíferos. En este islote habrá gonocitos, derivados de la división mitótica de las CGP y precursores de las células de Sertoli, derivados de las células celómicas. Las células mesenquimales intersticiales originarán las células de Leydig, las células peritubulares y por último las estructuras vasculares. En segundo lugar (el d.p.c.16.5 en rata) se formará la lámina basal que rodeará al islote de células agregadas. Después de este acontecimiento las células ya son funcionales y segregarán testosterona (Leydig) y hormona antimülleriana (Sertoli), contribuyendo así a la definitiva formación de gónadas masculinas funcionales y culminando con esta aportación hormonal el desarrollo iniciado previamente (Kierszenbaum, 1994; Capel, 2000; Nef y Parada, 2000; Cañete y Jiménez, 2001).

1.2.2. Conductos genitales.

En el mesonefros se encuentran los conductos mesonéfricos (conductos de Wolff) que son los precursores de los órganos sexuales masculinos. Los conductos paramesonéfricos (conductos de Müller), precursores de los órganos sexuales femeninos, aparecen entre los 11.5 y 12.5 d.p.c. en la rata. Ambos conductos están presentes a la vez en el mesonefros durante un breve período de tiempo (Kierszenbaum, 1994; Capel, 2000).

El desarrollo del sistema de los conductos genitales y de los genitales externos depende de la influencia de hormonas que circulan en el feto durante la vida intrauterina o embrionaria. En el caso de la formación de los conductos genitales internos, las hormonas más relevantes son la testosterona y la hormona Anti-Mülleriana (AMH/MIS). El desarrollo gonadal se produce atendiendo al equilibrio que por retroalimentación las hormonas llevan a cabo. El hipotálamo del macho y de la hembra segregan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), de manera tónica y cíclica respectivamente, que desencadena la liberación de hormona luteotrópica (LH) y de la hormona estimulante del folículo (FSH) por la hipófisis anterior o adenohipofisis. En el macho, la LH estimulará la secreción de testosterona por parte de las células de Leydig, que a su

vez, llegado a un punto, por retroalimentación negativa, incidirá sobre el hipotálamo y la hipófisis para que cesen en sus emisiones de GnRH y LH respectivamente. En el macho la FSH estimulará a las células de Sertoli para que segreguen la hormona antimülleriana (AMH/MIS), activinas, que estimulan la secreción de FSH por retroalimentación positiva, e inhibinas, que inhibirán las secreciones de FSH por retroalimentación negativa. En la hembra por el contrario, la LH estimulará a las células tecaes para que segreguen andrógenos y la FSH estimulará a las células granulosas para que segreguen AMH/MIS, estradiol e inhibinas, ejerciendo estas dos últimas una función de retroalimentación negativa sobre la hipófisis y el hipotálamo (Figura 1.3.) (McEwen, 1978; Nelson, 1996; Traggiai y Stanhope, 2002).

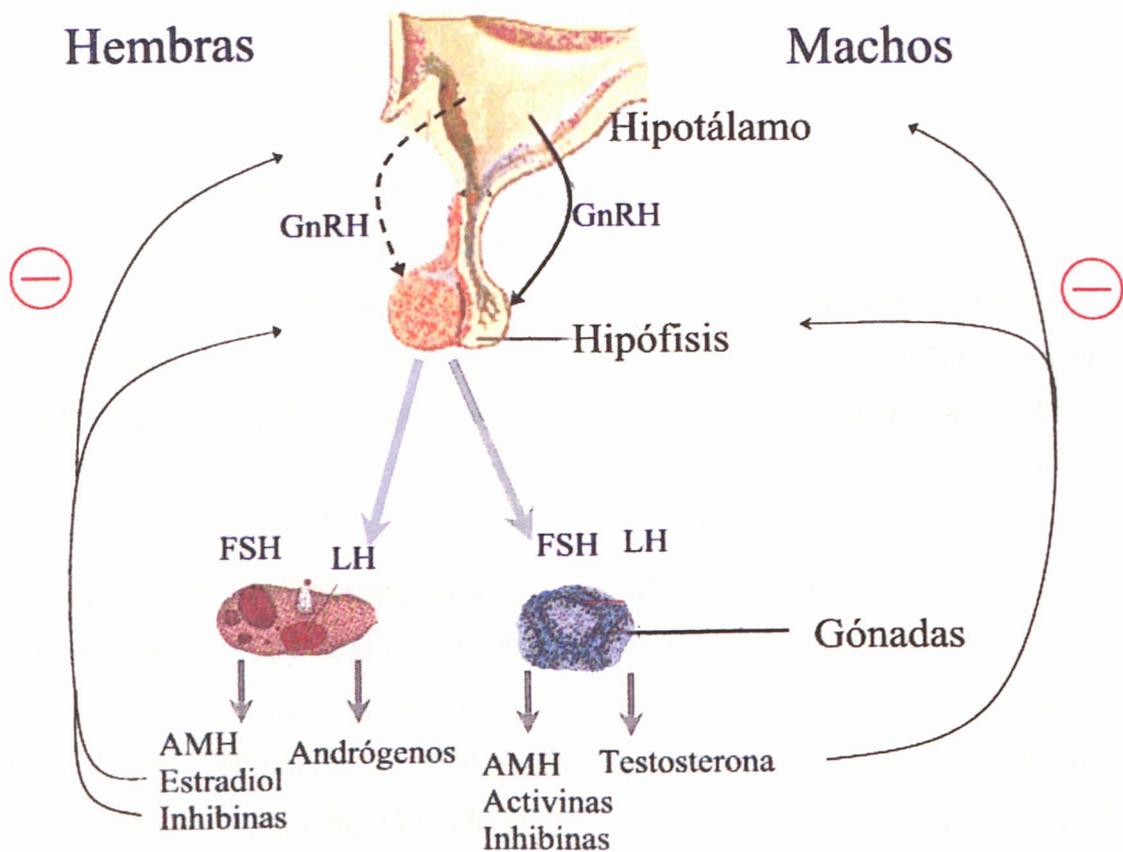


Figura 1. 3: Eje de retroalimentación entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. La liberación de hormonas, por parte de las gónadas, también regulan las secreciones de la hipófisis y del hipotálamo, estableciéndose un circuito interconectado. (Realizado a partir de Nelson, 1996).

Las células de Leydig del macho muestran en su inicio de liberación de testosterona, dos fases distintas de actividad. La primera de estas fases comienza en la rata alrededor del día E16 o E18 y finaliza la segunda semana postnatal, produciéndose una rápida elevación en la liberación de ésta entre las 0 y las 2 horas de nacimiento que posteriormente desciende (Rhoda y cols., 1984). La segunda fase de actividad de células de Leydig en el macho empieza la tercera semana postnatal y ya continúa hasta la etapa adulta (McEwen, 1978). Esta testosterona tiene como función promover el desarrollo de los conductos de Wolff, que son los precursores del epidídimo, del conducto deferente, de la vesícula seminal y de los conductos eyaculatorios del macho. En el inicio de la diferenciación sexual masculina humana, la testosterona es liberada por actuación de la hormona coriónica gonadotrópica humana (hCG) para posteriormente ser regulada por la hormona luteneizante (LH) liberada por la hipófisis fetal, actuando ambas sobre los receptores de membrana LH/hCG que están presentes en las células de Leydig (Rey y cols., 1999). Tanto la testosterona como la AMH/MIS son determinantes en el desarrollo de los conductos genitales internos masculinos, junto con la *Insl3* (*insuline-like3*) que media el descenso de los testículos hasta el escroto y se expresa específicamente en machos (Nef y Parada, 2000; Tomboc y cols., 2000).

Debido a que la cascada de acontecimientos genéticos parece estar encaminada en último término a la expresión de la AMH/MIS, puesto que esta hormona y su expresión alterada han sido y son objetos de extenso estudio en la determinación sexual y ya que se le asignan otras funciones biológicas relevantes en la formación del sexo gonadal diferentes a las clásicas conocidas, nos centraremos en esta hormona y expondremos de ella las características que puedan resultarnos relevantes para posteriores explicaciones referentes al desarrollo gonadal normal y patológico.

La AMH/MIS es de expresión sexodimorfa y su momento de actuación difiere entre especies: en la rata su actuación comienza el día E13, en humanos el d.p.o. 51 (Gustafson y Donahoe, 1994) y en el ratón, el E11.5 (Mishina y cols., 1999). En machos de rata, el ARNm de la AMH/MIS se detecta en el E13 en la cresta urogenital, manteniéndose su actividad máxima entre los días E14.5 y E17.5. Esta liberación por parte de las células de Sertoli se mantiene durante todo el desarrollo desde la diferenciación testicular hasta la pubertad (Rey, 1998). En la rata hembra, el ARNm de la AMH/MIS aparece en una capa de las células granulosa, coincidente con la

iniciación del crecimiento folicular el día postnatal 3 (P3) y en cantidades significativamente inferiores a las del macho (Rey, 1998). Esta expresión del ARNm de la AMH/MIS en las células en división de Sertoli y de las células granulosas es un índice claro de la actividad mitótica (Hirobe y cols., 1992; Gustafson. y Donahoe, 1994).

Esta sustancia no esteroide forma parte de la familia de factores de crecimiento β (TGF- β), localizándose su gen en humanos en el cromosoma 19 (19p13.3-13.3) y en el ratón en el cromosoma 10 (Barrio y Ezquieta, 2001). Posee dos tipos de receptores, desempeñando diferentes actuaciones, aunque relacionadas. Estos receptores son el tipo I (AMHR-I) y el tipo II (AMHR-II), siendo el tipo II el que más claramente está implicado en la gonadogénesis, localizándose alrededor de los conductos Müllermanos fetales, en las células granulosas y en las células de Sertoli desde la vida fetal hasta el período adulto en las ratas (Lee y Donahoe, 1993; Di Clemente y cols., 1994a; Di Clemente y cols., 1994b; Gustafson y Donahoe, 1994; Racine y cols., 1998; Rey, 1998; Josso y cols., 2001). En recientes investigaciones se ha puesto de manifiesto que también existen receptores para la AMH/MIS en las células de Leydig del tejido intersticial testicular, sugiriendo una posible actuación autocrina/paracrina de esta sustancia sobre las gónadas (Rey, 1998; Josso y cols., 2001).

Cuando la AMH/MIS actúa sobre los receptores AMHR-II que se encuentran en las células mesenquimales, induce la regresión de los conductos de Müller en los fetos masculinos mediante la apoptosis o muerte celular provocada por la acumulación de β -catenina en el núcleo peri-Mülleriano. Con esta regresión, el promotor de las gónadas masculinas (de Wolff o mesonéfricos) puede proseguir su desarrollo normal ya sin la presencia del conducto mülleriano, asegurando así que las gónadas femeninas no estén presentes (di Clemente y cols., 1994; Haqq y cols., 1994; Dutertre y cols., 1997; Allard y cols., 2000; Hughes, 2001; Josso y cols., 2001).

Esta sustancia fue descrita por Jost en el 1947, tal y como se comentó previamente, como la sustancia implicada en la formación de gónadas masculina diferentes de la testosterona que inducía la desaparición de los conductos de Müller [Jost, A., 1947; en (Lee y Donahoe, 1993)]. También fue propuesta por este autor como el factor inductor de la masculinización en el fenómeno del "freemartinismo" [Jost y cols., 1975; en (Capel, 2000)]. Este fenómeno se produce en el ganado (vacas, ovejas,

cabras y cerdos) cuando un feto femenino se ha desarrollado dentro del útero materno entre dos machos hermanos y por esto se origina una hembra XX infértil y masculinizada. Esta masculinización se produce al haberle afectado las secreciones hormonales de sus hermanos, puesto que las ha compartido con ellos a través de la circulación de los vasos sanguíneos de la placenta [Lillie, 1917; en (Nelson, 1996; Lee y Donahoe, 1993; Di Clemente y cols., 1994; Capel, 2000; Josso y cols., 2001)]. Se ha encontrado que los niveles de AMH/MIS en plasma en ovejas "freemartin" y en ovejas normales es similar, aunque el volumen de distribución de la AMH/MIS en las ovejas "freemartin" era dos veces superior a las ovejas normales (Vigier y cols., 1984).

El efecto masculinizador de esta hormona ha sido también puesto de manifiesto en sucesivos trabajos de Vigier y sus colaboradores. Por ejemplo, en 1989 encontraron que administrando *in vitro* AMH/MIS purificada bovina a ovarios fetales de rata, además de provocar la formación de túbulos seminíferos, los ovarios tratados liberaban testosterona en lugar de estradiol. Tras este tratamiento *in vitro* encontraron también que se produce un decremento en la biosíntesis de la enzima Aromatasa, reduciéndose con ello la conversión de testosterona a estradiol (Vigier y cols., 1984; Vigier y cols., 1987; Vigier y cols., 1989). Tobet y su equipo, a propósito de la Aromatasa, estudiaron en 1985 la posible relación que podía guardar la posición intrauterina de las hembras en relación a sus hermanos con la actividad de la enzima Aromatasa en los días embrionarios E18 y E20 en las regiones cerebrales del hipotálamo y del lóbulo temporal. Pero pudieron comprobar que no existía correlación entre el número de hermanos machos adyacentes a la hembra y la actividad de la Aromatasa en estas regiones (Tobet y cols., 1985).

Los niveles de esta sustancia en plasma varían a lo largo del desarrollo, dependiendo de diferentes variables, siendo una de ellas el nivel de andrógenos, en una relación inversamente proporcional, puesto que a menor cantidad de testosterona en plasma, mayor cantidad de AMH/MIS (Sriraman y cols., 2001). A pesar de que en los machos los conductos de Müller han sufrido la regresión correspondiente por la actuación de esta hormona en la mitad de la vida fetal, los niveles de esta sustancia en el plasma se mantienen elevados durante toda la vida intrauterina y luego en la postnatal hasta la pubertad (Rey, 1998). Parece que esta relación se produce porque la AMH/MIS regula la síntesis de testosterona, al suprimir la actividad a nivel transcripcional del gen

de la enzima *P450c17*, una de las enzimas claves implicadas en la síntesis de testosterona que cataliza la conversión de progesterona a androstenediona (Teixeira y cols., 1999; Sriraman y cols., 2001). En sucesivas investigaciones y completando las que ya se habían realizado, se encontraron evidencias de que la AMH/MIS influye sobre los genes de la enzima Aromatasa y de la hormona luteotrópica (LH), provocando un descenso en la expresión del ARNm de éstos tras la administración intratesticular de AMH/MIS en fetos de rata. Postnatalmente este mismo tratamiento hace descender el número de receptores para LH tanto en machos como en hembras adultas, aunque este último resultado producido *in vitro*, no pudo replicarse *in vivo* (Vigier y cols., 1989; Lee y Donahoe, 1993; Di Clemente y cols., 1994a; Di Clemente y cols., 1994b; Gustafson y Donahoe, 1994; Racine y cols., 1998; Rouiller-Faber y cols., 1998; Nef y Parada, 2000).

Como resultado de estas variables, los niveles de AMH/MIS en humanos varones son altos durante el desarrollo gonadal, descendiendo a los 2 años de vida y permaneciendo luego estables hasta la pubertad, donde experimentan un nuevo incremento, para luego en el período adulto mantener unos niveles apenas detectables, mientras que en las mujeres los niveles son más bajos en los primeros años de vida, incrementándose mínimamente en la pubertad (Baker y Hutson 1993; Lee y cols., 1996; Lee y cols., 1997; Rey, 1998).

En algunas patologías referidas a la maduración sexual, se observan ciertas anomalías en los niveles de la AMH/MIS. Por ejemplo, en el síndrome de pubertad precoz y pubertad tardía los niveles de AMH/MIS están en consonancia en ambos casos con el grado de desarrollo puberal, siendo en la precoz anormalmente bajos comparados con el grupo normal de la misma edad y en la tardía anormalmente elevada, comparada igual que la anterior. Parece además que los niveles de la AMH/MIS oscilan en los diferentes estadios vitales, no sólo inversamente a como lo hace la testosterona, sino también inversamente a como lo hacen otras sustancias, tales como las gonadotropinas, u otros esteroides e inhibinas, cuyos niveles descienden los dos primeros años de vida, para posteriormente en la pubertad elevarse (Baker y Hutson, 1993).

En la pubertad precoz, los niveles elevados se producen por un tumor en el sistema nervioso central que desencadena la activación anómala del eje hipotálamo-hipófisis activando el receptor de la LH y provocando con ello una hiperestimulación de las células de Leydig para la secreción de testosterona. Con esta hipersecreción de

testosterona y debido a la acción inhibitoria de la testosterona sobre la AMH/MIS, los niveles de ésta última son inferiores a lo normal. Por otro lado, en la pubertad tardía, causada por diferentes motivos o patologías (Traggiai y Stanhope, 2002) existe la misma relación entre los niveles de testosterona y AMH/MIS que en el síndrome de pubertad precoz, es decir, la AMH/MIS es elevada debido a la demora de secreción de testosterona por parte de las células de Leydig y, por lo tanto, ésta no ejerce la inhibición sobre la AMH/MIS (Rey, 1998).

Esta relación entre AMH/MIS y la testosterona es tan fiable que se ha propuesto medir la AMH/MIS para determinar patologías relacionadas con la formación de gónadas defectuosas y diagnosticarlas, para establecer el grado de desarrollo de las células de Sertoli, o para comprobar el efecto de la aplicación de antiandrógenos cuando no es factible la medición de la testosterona en plasma (Rey y cols., 1993; Rey y cols., 1999). El calificativo que Jost propuso para esta hormona (hormona antifemenina) sigue reflejando la verdad, pero sólo en parte, pues como hemos visto en estas investigaciones, la inhibición en la maduración sexual es también extensible al macho, bloqueando la diferenciación de las células de Sertoli y regulando a la baja la hormona masculina por antonomasia, la testosterona (Racine y cols., 1998)

Los pacientes que padecen el síndrome de insensibilidad a los andrógenos presentan niveles elevados de AMH/MIS comparados con un grupo control y esto es debido a que la actuación inhibitoria que ejercería la testosterona sobre la AMH/MIS no puede llevarse a cabo puesto que los receptores de andrógenos no son funcionales (Rey y cols., 1994). Esta es la misma causa de por qué durante las primeras etapas del desarrollo gonadal del macho de rata y ratón, tanto los niveles de AMH/MIS como los de testosterona son elevados no estando contrabalanceados, como lo están en el resto de las etapas del desarrollo; y es que los receptores para andrógenos no se expresan en las células de Sertoli hasta el día postnatal 3 en la rata (Majdic y cols., 1995) y hasta el día postnatal 4 en el ratón (Al-Attar y cols., 1997) no pudiendo por ello intervenir en la inhibición de la liberación de AMH/MIS (Rey, R., 1998).

1.2.3. Genitales externos.

Los genitales externos surgen por el desarrollo diferencial de precursores genitales comunes que existen en los machos y hembras en los primeros estadios del desarrollo gonadal. Estos precursores comunes son el tubérculo genital, los pliegues genitales, la prominencia genital y el surco urogenital. En la hembra estas estructuras se modifican para dar lugar al órgano sexual femenino según estas pautas: el tubérculo genital se transforma en el clítoris, los pliegues genitales pasan a ser los labios menores y la prominencia genital dará lugar a los labios mayores. Por otro lado, en el macho, el desarrollo de los genitales externos sigue otra pauta diferente: el meato uretral se funde, el tubérculo genital se transformará en parte del pene y el glande, los pliegues genitales sufrirán una fusión que resultará el escroto cuyo contenido más tarde serán los testículos y por último la prominencia genital experimenta un alargamiento y fusión que dará lugar al cuerpo del pene (Wilson y cols., 1993).

Mientras que para el desarrollo de los conductos genitales internos, la testosterona y la AMH/MIS eran cruciales, para la formación de los genitales externos masculinos es imprescindible la actuación de la dihidrotestosterona (DHT), derivada de la testosterona por actuación de la enzima 5α reductasa (Wilson y cols., 1993; Celotti y cols. 1997). En el macho la DHT actúa en el seno urogenital para inducir el desarrollo de la uretra y la próstata y también en el tubérculo genital para provocar la fusión de los pliegues genitales y la prominencia genital que acompañan a la formación del pene y del escroto (Wilson y cols., 1993). La 5α -reductasa además está implicada en otras funciones biológicas como la síntesis de neuroesteroides ansiolíticos/anestésicos a partir de la progesterona y la deoxicorticosterona (Poletti y cols., 1998a; Poletti y cols., 1998b; Lephart y cols., 2001).

Existen dos tipos de enzimas 5α -reductasa en mamíferos: la tipo 1 y la tipo 2. Son codificadas por dos genes diferentes y presentan diferente afinidad, siendo la tipo 2 de 10 a 20 veces más afín a la testosterona, androstenediona, progesterona y corticosterona que la tipo 1 (Normington y Russell, 1992; Lephart y cols., 2001). Su actuación va dirigida a catalizar la reducción de testosterona en 5α -dihidrotestosterona (5α DHT), la progesterona en 5α -dihidroprogesterona (5α DHP) y la deoxicortestora en

5 α -dihidrodeoxicorticosterona (5 α DHDOC), siendo estas reducciones irreversibles (Rupprecht y Holsboer, 1999). En humanos la tipo 1, cuyo gen se localiza en el cromosoma 5 (banda p15), se encuentra en pequeña cantidad en la próstata y en mayor cantidad en tejido no genital, como glándulas sebáceas, el riñón y el cerebro, mientras que en la rata, esta enzima tipo 1 se distribuye ampliamente por tejido genital y no genital (Wilson y cols., 1993; Russell y Wilson, 1994; Celotti y cols., 1997; Mensah-Nyagan y cols., 1999; Lephart y cols., 2001). En ambas especies esta enzima se encuentra en el cerebro, en zonas ampliamente mielinizadas (sustancia blanca), sin existir diferencias entre machos y hembras (Tsuruo y cols., 1996; Poletti y cols., 1997; Poletti y cols., 1998a; Poletti y cols., 1998b; Mensah-Nyagan y cols., 1999). En seres humanos la actividad de la isoenzima 5 α -reductasa tipo 1 ha sido localizada también en regiones ricas en mielina, como la sustancia blanca subcortical, así como en el neocórtex cerebral (Steckelbroeck y cols., 2001). Durante la embriogénesis de la rata, en las dos primeras semanas de vida intrauterina, se produce un pico de actividad reductora de esta isoenzima en el córtex cerebral y el hipotálamo, coincidiendo exactamente con el proceso de mielinogénesis por parte de los oligodendrocitos (Melcangi y cols., 1988; Celotti y cols., 1992; Tsuruo y cols., 1996). También en ratas adultas de tres meses de edad se ha detectado su actividad por inmunoensayo en el nervio óptico (Poletti y cols., 1997).

La enzima 5 α -reductasa tipo 1 tiene varias oscilaciones ontogénicas en ratas. En primer lugar, de los días embrionarios E12 al E18, se detecta su actividad en zonas germinales y ventriculares de desarrollo del SNC. Poco después, durante el período fetal tardío y postnatal temprano, esta actividad en zonas proliferativas decrece, pero aparece en regiones cerebrales en proceso de diferenciación y desarrollo, tales como el tálamo o el córtex. Por último, en el postnatal P15, su actividad se encuentra en regiones típicas de sustancia blanca, como el quiasma óptico, el tracto olfatorio lateral, la comisura anterior y el cuerpo calloso (Lauber y Lichtensteiger, 1996), permaneciendo ya estable y en niveles inferiores en su expresión desde el E14 (Poletti y cols., 1998b; Gao y cols., 2002). Su presencia en lugares de proliferación y diferenciación, así como su capacidad de sintetizar neuroesteroides que puedan actuar sobre los receptores de canal GABA_A, han hecho pensar a algunos investigadores que esta isoenzima tipo 1 podría tener una función de importancia en el proceso de desarrollo y diferenciación cerebral (Mellon,

1994; Lauber y Lichtensteiger, 1996; Poletti y cols., 1998a; Poletti y cols., 1998b; Zwain y Yen, 1999).

Otros autores añaden que esta enzima desempeña una función esencial de protección de daño por exceso de hormonas esteroides en las neuronas mediante actuación catabólica (Normington y Russell, 1992).

Para hacer esta afirmación, se basan en las siguientes evidencias. En primer lugar, se sabe que la 5 α -reductasa tipo 1 metaboliza los andrógenos, estrógenos y corticoides sólo cuando han alcanzado una concentración elevada y posiblemente dañina dentro de la célula, protegiendo de esta manera al metabolizarlas del posible daño neurotóxico del exceso de esteroides (catabolismo).

Por otro lado, esta isoenzima también se expresa diferencialmente en los oligodendrocitos, productores de mielina, tal y como comentamos previamente (Poletti y cols., 1997). La mielina, aparte de facilitar y hacer más rápida y eficiente la comunicación entre neuronas, también las protege de posibles daños de agentes externos, poniendo de manifiesto de nuevo la función protectora de esta enzima (Poletti y cols., 1998b). Además, la progesterona, sustrato preferente de la enzima 5 α -reductasa, es capaz de inducir la proteína básica de mielina (PBM) (Schumacher y cols., 2001), a través de un efecto genómico, puesto que se han detectado receptores de progesterona en los oligodendrocitos (Poletti y cols., 1998a; Chan y cols., 2000; Mercier y cols., 2001).

Y como última evidencia de esta función protectora de la enzima 5 α -reductasa, los autores apuntan la existencia de una cepa de ratones portadores de una mutación en el gen de la isoenzima 5 α -reductasa tipo 1 (Mahendroo y cols., 1997). Esta cepa presenta altos índices de mortalidad en sus crías cuando la madre es homocigótica para esta mutación. Concretamente las crías fallecen entre los días embrionarios E10.75 y E11, justo el momento en el que la expresión de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 alcanza su pico, en las dos primeras semanas de vida intrauterina, como previamente comentamos (Melcangi y cols., 1988; Celotti y cols., 1992; Tsuruo y cols., 1996). El motivo de la letalidad de esta mutación es que se concentra un nivel excesivamente alto de estradiol en las células de las crías de estos animales, puesto que la enzima Aromatasa y no la 5 α -reductasa tipo 1, actúa sobre la testosterona, que está de 2 a 3 veces por encima de su

nivel normal, metabolizándola a estradiol, que igualmente supera su cantidad normal 2 ó 3 veces. Administrando un antiestrógeno (tamoxifén) o un inhibidor de la enzima Aromatasa, esta mortalidad desaparece (Mahendroo y cols., 1997). Estos datos, junto con el que se refiere al momento cumbre de actuación de esta enzima, hacen suponer que la 5 α -reductasa tipo 1 es muy relevante para la protección de la toxicidad del estrógeno durante la gestación (Mahendroo y cols., 1997). Ésta posiblemente sea la razón de por qué no existen casos en literatura de mutaciones en humanos en el gen de la isoenzima 5 α -reductasa tipo 1, sino sólo de la tipo 2, puesto que la mutación en la tipo 2 no es incompatible con la vida, mientras que la 1 sí parece serlo (Mahendroo y cols., 1997; Poletti y cols., 1997)

La enzima 5 α reductasa tipo 2, cuyo gen en humanos se sitúa en el cromosoma 2 (banda p23), se localiza básicamente en tejidos andrógeno-dependientes, tanto en rata como en humanos y su actividad es anabólica (Normington y Russell; 1992). La expresión de esta isoenzima empieza a ser detectable en el día embrionario E18, alcanzando su pico de expresión el día postnatal P2, para luego decrecer gradualmente hasta la etapa adulta. Estas oscilaciones se corresponden con la producción de testosterona por parte de los testículos, aumentando y disminuyendo a la vez, ya que es la testosterona la que regula la expresión de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 en machos (Poletti y cols., 1998a; Poletti y cols., 1998b). En la hembra de ratón, la que regula transcripcionalmente esta enzima en el cerebro es la progesterona (Matsui y cols., 2002). En la época fetal humana esta enzima se localiza en la vesícula seminal, el cuerpo cavernoso, el cuerpo esponjiforme, el complejo venoso dorsal, la piel escrotal y la próstata, todos ellos lugares de actuación de la testosterona y la dihidrotestosterona necesarios para el desarrollo de los genitales masculinos (Wilson y cols., 1993; Levine y cols., 1996). Esta ubicación hace suponer que la isoenzima tipo 2 es la responsable de la culminación del desarrollo de los genitales externos masculinos (Wilson y cols., 1993; Russell y Wilson, 1994; Celotti y cols., 1997; Mensah-Nyagan y cols., 1999).

En seres humanos se ha descrito una patología llamada deficiencia de 5 α -reductasa, que se define por la incapacidad de actuación de enzima 5 α -reductasa tipo 2. Hasta 1993, había 72 casos diagnosticados de esta patología: 47 miembros de una familia en la República Dominicana, 12 sujetos de origen turco y 13 afectados de la tribu

de Sambia, en la isla de Nueva Guinea (Wilson y cols., 1993; Wilson, 1999). La mayoría de estos casos se habían producido por una mutación autosómica recesiva en el gen responsable de la codificación de la enzima 5 α reductasa tipo 2 del cromosoma 2, habiéndose descrito hasta 45 tipos diferentes de mutaciones que provocan este síndrome (Wilson, 1999). Todas estas mutaciones originan una enzima no funcional y deficiente, con lo cual, al no poder actuar, no hay suficiente DHT reducida de la testosterona para la correcta masculinización de los genitales externos. La presencia de la isoenzima tipo 1, debido a la menor afinidad que presenta por la testosterona, no es capaz de reemplazar las funciones de la tipo 2 y, aunque existe DHT en pequeña cantidad, no es suficiente para el desarrollo genital masculino normal (Poletti y cols., 1998a). Esta falta de DHT provoca un tipo de pseudohermafroditismo en el que los genitales son ambiguos y se produce aplasia en la próstata (Lecqoc, 1986; Wilson y cols., 1993; Poletti y cols., 1998a; Wilson, 1999; Levine y cols., 2001). Estos chicos son asignados como niñas al nacer pero al llegar la pubertad, las secreciones de GnRH por parte del hipotálamo vuelven a ordenar la liberación de LH y ésta de testosterona por parte de los testículos, provocándose una nueva oleada hormonal, que puede actuar sobre los genitales no diferenciados de estos chicos, de manera que en ese momento se completa la diferenciación hacia hombres (Wilson, 1999). En mujeres, esta mutación es ciega y provoca en ellas efectos muy leves: vello corporal muy escaso, ausencia de acné, menstruación tardía y niveles de testosterona en plasma de normales a elevados (Katz, y cols., 1995). Estas alteraciones leves hacen suponer que la enzima 5 α -reductasa tipo 2 está implicada en funciones tales como el inicio de la menstruación femenina, así como en el crecimiento del vello corporal o el inicio del acné juvenil (Katz, y cols., 1995).

Se ha estado intentando encontrar un ancestro común en las mutaciones encontradas para esta patología en la República Dominicana y en familias francesas y polacas, pero no ha habido éxito, puesto que son enormemente variables incluso dentro de la misma rama familiar (Boudon y cols., 1995; Cai, y cols., 1996).

Estas características y el hecho de que la mayoría de estos pacientes decidan optar por el sexo masculino, a pesar de haber sido mujeres y tratadas como tal hasta el inicio de la pubertad, ha hecho de esta mutación el objeto de muchas investigaciones encaminadas a entender los determinantes de la identidad sexual como innata o

aprendida (Lecqoc, 1986; Wilson y cols., 1993; Russell y Wilson, 1994; Celotti y cols., 1997; Mensah-Nyagan y cols., 1999).

1.3. DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL SISTEMA NERVIOSO EN MAMÍFEROS.

En la naturaleza se dan dos tipos de reproducción, la asexual y la sexual. En la primera de ellas, sólo es necesario la participación de un individuo, sea unicelular, en cuyo caso se reproducirá a través de la bipartición, gemación o esporulación o bien sea pluricelular, reproduciéndose entonces mediante la escisión, gemación y esporulación. Sin embargo, para la reproducción sexual, han de intervenir dos progenitores aportando cada uno de ellos un gameto haploide para la formación del nuevo individuo (Fontanillo y cols., 1985). Mediante ésta última, es posible obtener una mayor variabilidad interindividual y, con ello, mayores probabilidades de supervivencia para la especie en ambientes cambiantes. Pero para que la reproducción sexual se lleve a cabo, es necesario que las características sexuales secundarias adviertan a los miembros de la misma especie quiénes son machos y quiénes hembras. Es por ello por lo que la diferenciación sexual de los individuos de una misma especie, en los diferentes niveles en los que ésta se produce, es de vital importancia para, en primer lugar, que la reproducción sexual devenga y, en segundo lugar, para que se lleve a cabo la selección sexual que, aunque es menos rígida que la selección natural, conlleva menos descendencia y por lo tanto menos éxito evolutivo a los individuos que no sean seleccionados para la reproducción por miembros del sexo contrario de su misma especie (Darwin, 1859).

Estas diferencias entre los sexos han estado presentes en múltiples especies animales de reproducción sexual a través del tiempo. En humanos, asimismo, han podido detectarse evidencias de que las diferencias morfológicas entre hombres y mujeres han estado presente desde al menos el Paleolítico medio (Sherry y Hampson, 1997), siendo también detectables en fósiles de nuestros antecesores primates (*Notharctus venticolus*) (Krishtalka y cols., 1990).

Existen investigaciones que apuntan hacia diferencias sexuales entre hombres y mujeres en determinadas habilidades, dependiendo en la ejecución de éstas del estatus hormonal del individuo que las llevaba a cabo (Sherry y Hampson, 1997; Murkies y cols., 1998; Hampson, 1999; Lund y cols., 2000). Existen varias hipótesis explicativas para estas diferencias en habilidades en seres humanos y todas, de una manera u otra, se remontan a los inicios de la especie humana para referirse a vestigios conductuales impresos en nuestra evolución (Sherry y Hampson, 1997). En roedores, se ha detectado una diferencia sexual en cuanto a la habilidad espacial, siendo los machos mucho más eficientes que las hembras en esta habilidad. Esta diferencia entre sexos en cuanto a la habilidad espacial está mucho más pronunciada en ratones de pradera polígamos (*Microtus Pennsylvanicus*) que en ratones de árbol monógamos (*Microtus Pinetorum*) (Jacobs y cols., 1990).

Existen otros ejemplos de investigación animal referidas al dimorfismo sexual. Por ejemplo, en 1849 el médico suizo-alemán Arnold Adolph Berthold, profesor de fisiología de la Universidad de Göttingen, llevó a cabo un experimento en pollos, manipulando las hormonas mediante la castración y posterior transplante de testículos. Pudo observar que los caracteres sexuales secundarios masculinos, tanto físicos como conductuales, se mantenían en todos los grupos excepto en el que no poseían testículos ni transplante de éstos [Berthold, 1849; en (Nelson, 1996)].

En ratas, Pfeiffer demostró en 1936 que, en ausencia de testículos durante el período perinatal, el patrón de secreción de hormonas gonadotrópicas por parte de la hipófisis en machos era cíclico, como lo sería en la hembra adulta. También pudo comprobar que si la rata hembra era expuesta en época perinatal a secreciones testiculares, el patrón de secreción cíclico propio se bloqueaba [Pfeiffer, 1936; en (Segovia y cols., 1988); Arnold y Gosrki, 1984]. Alfred Jost en 1953 observó que al castrar embriones machos de conejos se desarrollaban como hembras. Si estos embriones eran tratados con testosterona posteriormente a la castración, se restauraba parcialmente el conducto de Wolff, la próstata y los genitales externos. Sin embargo, embriones hembra castrados y tratados posteriormente con testosterona daban lugar a conejas hembras adultas con las características esenciales femeninas, con la única diferencia de que los conductos de Müller eran algo menores de lo normal [Jost, 1953; en (Segovia y cols., 1988; Lacadena, 1999)].

En 1959 Young y su equipo realizaron un estudio que fue determinante para las posteriores investigaciones en el campo de la neuroendocrinología (Phoenix y cols., 1959; Young, y cols., 1964). Encontraron que en cobayas, la ejecución óptima de la conducta sexual típica femenina (lordosis) era inversamente proporcional a la cantidad y al tiempo de exposición prenatal a hormonas masculinas. Esta alteración permanecía en época adulta en las hembras, aunque se les suministrase hormonas femeninas. De este resultado extrajeron la conclusión de que existen sustancias hormonales de actuación prenatal que tienen un efecto organizador sobre el tejido neuronal, estando esta capacidad organizativa limitada a determinados períodos vitales (períodos críticos). Estas mismas sustancias hormonales tienen la capacidad de actuar en época adulta activando los circuitos neuronales que ya han sido organizados (Phoenix y cols., 1959). Esta investigación fue de enorme valor heurístico al establecer conceptos tales como período crítico, organización y activación. Sin embargo, estos conceptos han sido modificados en sucesivas investigaciones. Hoy día se sabe que no existe un único periodo crítico en el desarrollo cerebral (McEwen, 1988) e incluso algunos autores sostienen que las hormonas circulantes adultas vuelven a ejercer efectos organizacionales sobre el tejido neuronal (Cooke y cols., 1999; McEwen, 1999a; McEwen, 2001). En otros estudios se pone de manifiesto que la organización del tejido neuronal es muy dependiente de la conducta del individuo (Breedlove, 1997). Los períodos críticos en neurogénesis se interpretan hoy día como no absolutos, pues pueden reabrirse cuando se activen los mecanismos neuroplásticos pertinentes (Arnold y Breedlove, 1985; Bergado-Rosaro y Almaguer-Melian, 2000).

En los años 70 se produjo un cambio cualitativo en la dirección de las investigaciones sobre el dimorfismo sexual, con los trabajos de Raisman y Field del 71 y 73 (Arnold y Gorski, 1984; Tobet y Fox, 1992; McEwen, 1999a). En estos trabajos se puso de manifiesto que la distribución de las conexiones dendríticas en el área preóptica medial de la rata era diferente en machos y hembras y además, susceptibles de cambio por tratamiento hormonal neonatal (Raisman y Field, 1973). Esta investigación aportó la clave inicial para los posteriores trabajos, puesto que centró la atención sobre los procesos biológicos y hormonales implicados en las diferencias entre sexos y reflejados en diferentes morfologías del sistema nervioso central. A partir de entonces la investigación se centró en las diferencias en el sistema nervioso central, hasta entonces pasadas por alto o inferidas a través de cambios visibles conductuales. Después de este

trabajo, otras investigaciones han ido encaminadas a encontrar diferencias en los cerebros de machos y hembras que, en último término, se traducen de una u otra manera en conducta sexualmente dimorfa. Nuestra aproximación a estas investigaciones seguirá un criterio funcional, centrándonos en el dimorfismo sexual encontrado en el sistema vomeronasal (SVN) y en el núcleo espinal bulbocavernoso (NEB). Esta aproximación se desarrollará sobre estos dos sistemas por tres motivos: el primero, por lo minucioso y exhaustivo de los estudios existentes referidos a estos sistemas y a los procesos implicados en sus desarrollos sexualmente dimorfos. En segundo lugar, por representar el primero de los sistemas (SVN) los mecanismos de diferenciación cerebral y el segundo sistema (NEB) la diferenciación sexual a nivel medular, obteniendo así una aproximación global al fenómeno de diferenciación sexual en el SNC. Y por último, por la relevancia que ambos sistemas han demostrado tener sobre conductas claramente diferentes entre sexos, como por ejemplo, la conducta maternal y la conducta sexual.

1.3.1. Dimorfismo en sistema vomeronasal (SVN)

En un amplio número de especies de mamíferos, las señales olfatorias de alto peso molecular, no volátiles y de contenido proteico, llamadas feromonas, desempeñan una función primordial en la comunicación ectocrina intraespecífica. El término feromona fue acuñado por primera vez por Karlson y Luscher en 1959 a partir de *pherein* (transportar) y *horman* (excitar) (Carlson, 1994). En los roedores, así como en otros órdenes de mamíferos, estos estímulos químicos son captados por los receptores olfatorios de la cavidad nasal, donde se alojan dos tipos de receptores: la mucosa olfatoria, lugar en el que se encuentran las primeras neuronas del sistema olfatorio principal (SOP) y el órgano vomeronasal (OVN), u órgano de Jacobson, lugar donde están las células bipolares que constituyen las primeras neuronas del sistema olfatorio accesorio o sistema vomeronasal (SVN) (Vaccarezza y cols., 1981; Halpern, 1987; Døving y Trotier, 1998). Por la existencia de estos dos sistemas olfatorios diferenciados tanto morfológica como funcionalmente se ha empleado el término de sistema olfatorio dual para referirse a ambos (Winans y Scalia, 1970; Raisman, 1972; Scalia y Winans, 1975). Es importante señalar que algunos autores han propuesto un efecto sinérgico entre ambos tipos de sistemas olfativos, el principal y el vomeronasal o accesorio, puesto

que tras lesionar alguno de ellos, no se ha encontrado una eliminación absoluta de las funciones supuestas a ese sistema (Meredith, 1983). Por ejemplo en hámsteres dorados, al eliminar en machos el OVN, se suprimía la capacidad de distinguir determinados olores (secreciones glandulares marcadoras del terreno), pero no otras (orina), mientras en las hembras esta misma lesión no producía ninguna alteración (Johnston y Peng, 2000).

Las feromonas estimulan al sistema vomeronasal (SVN), existiendo además evidencias experimentales de que estos olores regulan conductas tales como la sexual masculina y femenina (Powers y Valenstein, 1972; Emery, y Sachs, 1976; Wysocki, 1979; Lehman y cols., 1980; Kelche y Aron, 1984; O'Connell y Meredith, 1984; Saito y Moltz, 1986a; Saito y Moltz, 1986b; Halpern, 1987; Wysocki, 1987; Wysocki y Meredith, 1987; Meredith, 1991), también afectan a la gestación (Wysocki, 1979; Bellringer y cols., 1980; Keverne y cols., 1982; Keverne, 1983; Rajendren y Dominic, 1986; Halpern, 1987; Wysocki, 1987; Wysocki y Meredith, 1987; Meredith, 1991), al ciclo estral en la hembra (Johns y cols., 1978; Reynolds y Keverne, 1979; Sánchez-Criado, 1979; Wysocki, 1979; Mora y cols., 1985; Halpern, 1987; Wysocki, 1987; Wysocki y Meredith, 1987; Meredith, 1991) y al inicio de la pubertad así como a los cambios endocrinos que este inicio conlleva (Wysocki, 1979; Lomas y Keverne, 1982; Halpern, 1987; Wysocki, 1987; Wysocki y Meredith, 1987; Meredith, 1991). Igualmente la olfacción de feromonas a través del SVN está mediando el despliegue de la conducta maternal en las ratas (Fleming y cols., 1979; Wysocki, 1979; Fleming y cols., 1980; Saito, 1986; Halpern, 1987; Wysocki, 1987; Wysocki y Meredith, 1987; Menella y Moltz, 1988a; Menella y Moltz, 1988b; Numan, 1988; Saito y cols., 1988; Meredith, 1991; Del Cerro, 1998).

La detección de olores parece ser especie-dependiente, puesto que las neuronas del epitelio sensorial de hembras de raza Wistar responden ampliamente ante orinas secretadas por machos y hembras Wistar, por machos Donryu y por ratones macho C57BL/6, mientras que la respuesta que evocan ante la orina de machos Sprague-Dawley y hámsteres sirios machos es mucho menor. Además la localización de las neuronas del epitelio que respondían ante orina de la propia especie se localizaban en una región concreta (posición apical del epitelio) y las que respondían a orina de otras especies se localizaban en otro lugar distinto (posición basal del epitelio) (Inamura y

cols., 1999). También se ha podido comprobar muy recientemente que existe diferencia entre los sexos en cuanto a sensibilidad ante los olores de ratones, ya que las hembras de ratón presentan mayor capacidad de respuesta así como menor habituación que los machos ante olores feromónicos provenientes de orina de ratón macho y ratón hembra en estro (Baum y Keverne, 2002).

Algunos de los efectos conductuales que las feromonas son capaces de provocar, han sido muy estudiados. Entre ellos, podemos citar el efecto Lee-Boot (Lee y Boot, 1955), que consiste en el retraso del ciclo estral de ratas hembra que comparten jaula, o el efecto Whitten (Whitten, 1959), según el cual las hembras expuestas al olor de orina de un macho pueden sincronizar sus ciclos estrales. Otro de los efectos conocidos es el Vandenberg (Vandenberg, 1969), que implica que el olor de un macho adelanta la pubertad en hembras; y por otro lado, el efecto Bruce (Bruce, 1959) según el cual una hembra fecundada es incapaz de implantar el óvulo fertilizado en el útero si es expuesta durante un período crítico posterior a la fecundación a un macho diferente del que la montó (Halpern, 1983). Este último efecto de Bruce requiere algún tipo de memoria olfativa en la hembra, para conservar el olor del macho que la ha fecundado y poder compararlo con el del macho extraño. Este efecto de recuerdo o aprendizaje del olor se ha supuesto como responsable de otros muchos efectos conductuales mediados por feromonas (Brennan y cols., 1990; Axel, 1995; Keverne, 1995).

La descripción del SVN y del SOP en rata fue realizada por Scalia y Winans en 1975. Éstos hicieron un minucioso estudio sobre la conectividad del sistema olfatorio principal (SOP) y el sistema vomeronasal (SVN), sentando las bases descriptivas de estos sistemas olfatorios que tantas veces se usarían en la investigación posterior. El SOP se origina en los receptores de la mucosa olfatoria que envían aferencias hacia el bulbo olfatorio principal (BOP); desde aquí, la información olfatoria alcanza, a través del tracto olfatorio lateral (lo), el núcleo del tracto olfatorio lateral (LOT), el tubérculo olfatorio (Tu) y los núcleos anterior (Aco) y posterolateral cortical de la amígdala (PLCo). La vía de proyección llega, finalmente, al núcleo lateral del hipotálamo (HL) (Cowan y cols., 1965; Powell y cols., 1965; Scott y Leonard, 1971; Heimer, 1972; Scalia y Winans, 1975). Por otro lado, las conexiones del SVN se originan en las neuronas bipolares que conforman los receptores del órgano vomeronasal (OVN), que proyecta sus axones al bulbo olfatorio accesorio (BOA). El BOA proyecta sus aferencias a través

del tracto olfatorio accesorio, integrado en el tracto olfatorio lateral, hasta el núcleo del tracto olfatorio accesorio (NTOA), así como a los núcleos medial (Me) y posteromedial cortical de la amígdala (PMCo). A través de un componente post comisural de la amígdala llega información vomeronasal hasta el núcleo de la estría terminal medial posterior (NESTpm), que es continuo al área preóptica medial-hipotálamo anterior (APM-HA), núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) y núcleo premamilar ventral (PMV) (Leonard y Scott, 1971; De Olmos e Ingram, 1972; Scalia y Winans, 1975; Conrad y Pfaff, 1976a; Conrad y Pfaff, 1976b; Saper y cols., 1976; Krettek y Price, 1978; Kevetter y Winans, 1981; Weller y Smith, 1982; De Olmos y cols., 1985; Simerly y Swanson, 1986; Tirindelli y cols., 1998; Giorgi y cols., 2000) (Figura 1. 4.).

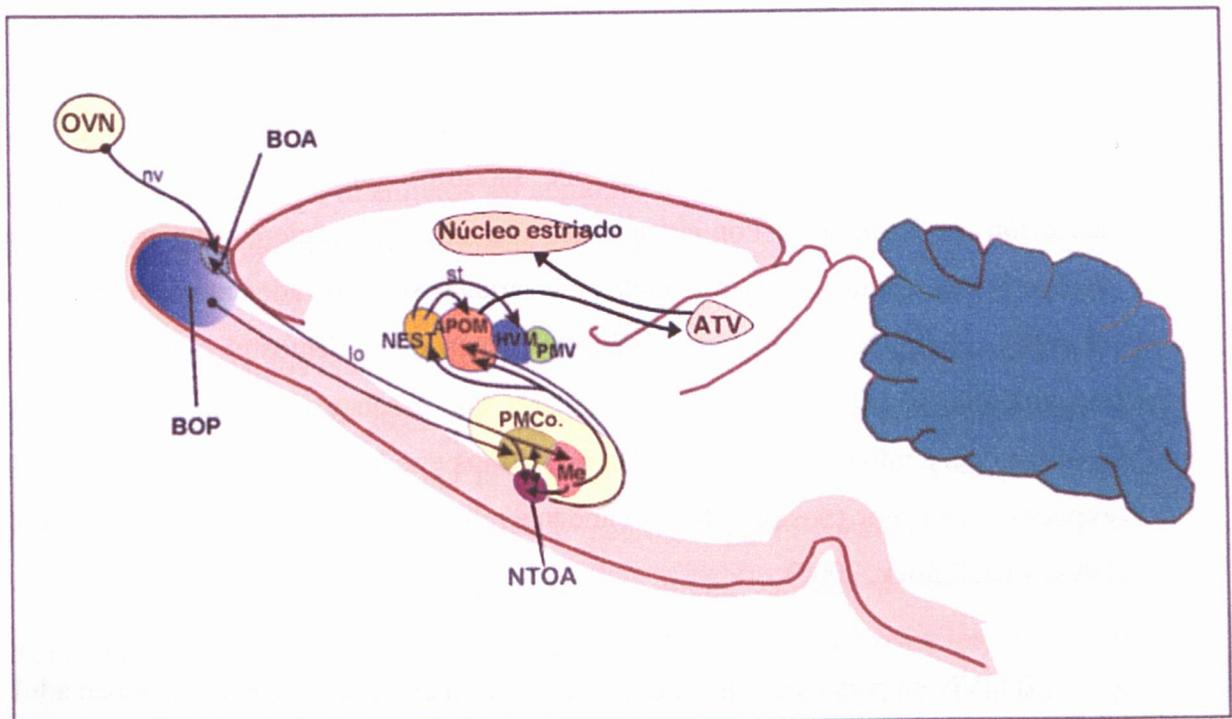


Figura 1. 4: Esquema representativo de las principales vías de relevo del sistema vomeronasal en la rata. Las feromonas son captadas por el órgano receptor del SVN, el órgano vomeronasal (OVN). Después la información alcanza las proyecciones vomeronasales primarias (I): BOA (Bulbo Olfatorio Accesorio). Posteriormente entran en juego las proyecciones vomeronasales secundarias (II): Me (amígdala medial), NEST (Núcleo de la Estría Terminal), NTOA (Núcleo del Tracto Olfatorio Accesorio), PMCo (Amígdala Cortical Posteromedial) y por último, la información llega a las proyecciones vomeronasales terciarias (III): APOM (Área Preóptica Medial), HVM (Hipotálamo Ventromedial), PMV (Núcleo Premamilar Ventral), ATV (Área Tegmental Ventral) (Segovia y Guillamón, 1993; Guillamón y Segovia, 1996). El bulbo olfatorio principal (BOP) es la primera vía de relevo del sistema olfatorio principal, que no está representado en este esquema.

Aunque los seres humanos son capaces de reconocer hasta 10.000 olores diferentes, nuestra habilidad olfatoria es más limitada que en otros animales y las conexiones comentadas para las ratas no poseen su equivalente en personas, al menos en su totalidad (Axel, 1995; Prasad y Reed, 1999). Además existen evidencias de dimorfismo en esta capacidad, siendo las mujeres de diferentes culturas más habilidosas o sensibles a determinados olores que los hombres (Doty y cols., 1985). Por ejemplo con el olor del almizcle, las mujeres son hasta 1000 veces más sensibles en su detección comparadas con hombres [Koelega y Koster, 1974; en (Nelson, 1996)]. También en pruebas de reconocimiento del propio olor corporal, donde las estrategias de eliminación en la elección eran imposibles de aplicar, las mujeres, además de considerar sus propios olores corporales como poco placenteros comparadas con los hombres, demostraron ser mejores en identificarlos (Platek y cols., 2001).

Existen algunos datos aislados en humanos que apuntan ciertas similitudes con los efectos antes comentados para ratas de modificaciones conductuales a través de detección de feromonas. Por ejemplo, se encontró que mujeres que pasaban mucho tiempo juntas tendían a presentar ciclos menstruales sincronizados mediante la actuación de señales químicas (posible efecto Whitten), pero no se demostró que éstas señales se transmitieran vía OVN. También las mujeres que pasaban regularmente cierto tiempo con hombres tendían a presentar ciclos más cortos que las que no lo hacían o no estaban expuestas a su olor (posible efecto Vandenberg) (Carlson, 1994; Stern y McClintock, 1998; McClintock, 2000).

El OVN en personas existe durante el período embrionario, pero en época adulta su existencia es menos evidente (Wysocki y cols., 1982; Wysocki y cols., 1983). En 1703 Frederic Ruysch descubrió la cavidad vomeronasal en seres humanos en la parte anterior del *séptum* nasal del cadáver de un joven. Algo más de un siglo después, en 1813, Ludvig Jacobson describió con gran detalle el órgano vomeronasal en un gran número de especies de mamíferos y se percató de que en humanos no estaba bien desarrollado, concluyendo que podría ser un órgano sensorial del que el ser humano no tuviera noción (Trotier y cols., 2000). En un estudio reciente planteó la posibilidad, empleando técnicas anatómicas, histológicas e inmunocitoquímicas que el órgano vomeronasal existiese en humanos y no sólo en el período fetal, como se había supuesto. Los autores proponen que la existencia de éste, durante la etapa embrionaria, pudiera tener la función de

contribuir a la migración de las células neurosecretoras de la hormona LHRH hasta los lugares definitivos correspondientes en el cerebro. En la época adulta este órgano está atrofiado y disminuido, aunque existe, además de no poseer neuronas ni conexiones. Su relevo más inmediato, el bulbo olfatorio accesorio (BOA) no existe en humanos, al haber involucionado a partir de la octava semana de gestación (Keverne, 1999; Trotier y cols., 2000).

En humanos el epitelio olfatorio está situado en el techo de la cavidad nasal, con lo cual, menos del diez por ciento del aire que entra por las fosas nasales alcanza este epitelio. El hecho de que podamos discriminar entre varios miles de olores diferentes, pero carezcamos de un vocabulario específico descriptivo de estos olores y nos refiramos a ellos según su similitud en olor con una o otra cosa, nos da a entender que el olfato no está tan desarrollado en nosotros como lo están otros sentidos (Carlson, 1994). Aún es necesaria más investigación para determinar con exactitud las similitudes con otros sistemas olfatorios de mamíferos así como las implicaciones conductuales que esta detección sutil de olores en humanos pueda acarrear.

En mamíferos, los olores son captados por el órgano vomeronasal a través de los receptores de membrana de siete regiones transmembranarias, unidos a proteínas G. Estos receptores son codificados por la familia de genes *VIRs* y *V2Rs* y se encuentran distribuidos por las cuatro subpoblaciones de neuronas quimiosensitivas que existen en el OVN, permitiendo la sutil detección de una amplia variedad de olores. En seres humanos se han encontrado genes pertenecientes a *VIR* muy similares a los expresados en rata, con un 52%-59% de identidad en la secuencia de aminoácidos, distribuidos en los cromosomas 7, 16, 20, 13, 14, 15, 21 y 22. Este dato sugiere que, aunque perdida, el ser humano pudo haber contado con la función sensitiva del OVN en algún momento de su evolución, al conservar aún vestigios genéticos de aquello (Moss y cols., 1997; Tirindelli y cols., 1998; Kumar y cols., 1999; Prasad y Reed, 1999; Giorgi y cols., 2000; Zufall y Munger, 2001).

1.3.1.1. Dimorfismo sexual en el órgano vomeronasal (OVN).

El órgano vomeronasal u órgano de Jacobson es una estructura quimiosensitiva en forma de tubo, situada en la porción anteroventral de la cavidad nasal, en el hueso vómer, bilateral al *séptum* nasal. Este órgano convierte estímulos químicos de alto peso molecular a través de neuronas bipolares, en estímulos eléctricos, que serán transmitidos al resto de los relevos que conforman el SVN (Fleming y cols., 1980; Menella y Moltz, 1986b; Saito, 1986; Saito y Moltz, 1986a; Saito y Moltz, 1986b; Saito y cols., 1988; Halpern, 1987; para revisión, Segovia y cols., 1988). La activación del órgano vomeronasal ante feromonas derivadas de la orina ha podido ser demostrada *in vitro*, sugiriéndose que la reacción ante éstas es independiente del resto de conexiones posteriores (Moss y cols., 1997). Es, además, una estructura sexodimorfa en la rata, en cuanto a los parámetros morfológicos de volumen estructural, volumen del neuroepitelio y el número de receptores olfatorios (neuronas bipolares), siendo en todos los casos mayor en machos que en hembras. Estos parámetros, además, son sensibles a manipulaciones hormonales, quedando invertidos tras orquidectomizar a machos y androgenizar a hembras con propionato de testosterona (PT), ambos en el día de su nacimiento (P1) (Segovia y Guillamón, 1982). De igual manera se encontró que manipulaciones hormonales en época adulta, mediante castración de machos y hembras de tres meses de edad, provocaban ligeros cambios morfológicos en ambos sexos, pero sin invertir los parámetros, dejando entrever que el momento determinante para establecer el patrón sexodimorfo es la época perinatal (Segovia y cols., 1984a).

Este hallazgo encaminó a los investigadores a plantear la hipótesis de que el resto de las estructuras o núcleos de relevo neuronales implicados en la detección y procesamiento de los estímulos olorosos del sistema vomeronasal, podrían ser igualmente sexodimorfos y verse asimismo influidos por los esteroides en época perinatal (Segovia y Guillamón, 1982). Por ello, desde 1982 se viene investigando el dimorfismo sexual existente en diferentes núcleos pertenecientes al SVN y progresivamente se ha podido vislumbrar que la hipótesis primera de los investigadores (Segovia y Guillamón, 1982) era certera. Los trabajos que abordaremos a continuación ponen esto de manifiesto.

1.3.1.2. Dimorfismo sexual en el bulbo olfatorio accesorio (BOA).

Los receptores sensoriales del OVN proyectan sus axones al bulbo olfatorio accesorio (BOA), donde sinaptan con las dendritas de las células mitrales de esta estructura. El BOA se encuentra en una posición dorsocaudal dentro del bulbo olfatorio. Consta de varias capas formadas por varios tipos de neuronas, que son las células mitrales y las granulares, que en preparaciones histológicas se representan por tinciones claras y oscuras, respectivamente (Struble y Walters, 1982). Aparte de diferenciarse por su afinidad a la tinción, estas dos subpoblaciones tienen diferentes períodos de neurogénesis, siendo las mitrales de formación prenatal (E17-E19) mientras que las granulares son postnatales (P1-P20) (Segovia y cols., 1986).

El BOA de la rata es sexodimorfo en varios parámetros, presentando en todos ellos el macho valores morfométricos mayores que la hembra. Estos parámetros son el volumen total, el volumen de cada una de sus capas, el número de neuronas de cada capa, el tamaño del soma de las células mitrales (Segovia y cols., 1984a; Segovia y cols., 1984b; Segovia y cols., 1986) y el número de brazos dendríticos que posee el tallo dendrítico principal (Caminero, Tesis Doctoral, 1989; Caminero y cols., 1991) siendo en los cuatro primeros casos reversibles tras castrar a machos y androgenizar con PT a hembras, alcanzando cada grupo, tras éstas manipulaciones, los valores propios del grupo sexual contrario. Se ha demostrado que el momento de estas manipulaciones es muy importante, siendo las secreciones de andrógeno durante el período prenatal y prepuberal críticas para el desarrollo de esta estructura (Segovia y cols., 1984b; Segovia y cols., 1986; Valencia y cols., 1986; Roos y cols., 1988; Roos, y cols., 1989). En el BOA existe amplia actividad de ARNm de receptores de andrógenos y estrógenos (*AR* y *ER*) (Simerly y cols., 1990)

Ha habido otros tratamientos hormonales que han tenido éxito en cuanto a la inversión de estos parámetros morfológicos en machos y hembras. La administración de benzoato de estradiol (BE) en el día P1 a machos castrados que poseían valores feminizados, logró incrementar hasta valores masculinos propios del macho control el número de células mitrales, mientras que la dihidrotestosterona (DHT) no fue capaz de provocar este incremento en machos castrados (Pérez-Laso y cols., 1996). Este dato hace sugerir a los autores que la masculinización de las células mitrales del BOA se debe a la

actuación del estradiol aromatizado de la testosterona durante la época perinatal (Pérez-Laso y cols., 1996).

Se han practicado otro tipo de manipulaciones en el BOA, usando ansiolíticos derivados de la benzodiacepina, cuyos efectos sobre el sistema nervioso central son, en su mayoría, conocidos. Concretamente se procedió a administrar perinatalmente a ratas diazepam (DZ) en dos momentos: prenatalmente (del E14-E21) y postnatalmente (del P1-P16). Con esta manipulación se observó que se había producido un decremento en el número de células mitrales y granulares del macho, sin afectar a la hembra, efecto similar al que se hubiera producido por castración temprana del macho (Segovia y cols., 1991; Pérez-Laso y cols., 1996). Igualmente si lo administrado era picrotoxina (PTX), un antagonista no competitivo de GABA a las hembras y diazepam (DZ) a los machos, se pudo observar que, el número de células mitrales del BOA, se veía incrementado en el primer caso (PTX a hembras) y disminuido en el segundo (DZ a machos) y todo ello sin afectar a los niveles en plasma de testosterona, estradiol o progesterona (Segovia y cols., 1996).

1.3.1.3. Dimorfismo sexual en el núcleo del tracto olfatorio accesorio (NTOA).

Este núcleo cerebral recibe aferencias mayoritariamente del BOA y está implicado en la conducta maternal de la rata, pues se ha demostrado que tras lesionarlo, se produce una facilitación del inicio de la conducta maternal, tanto en machos como en hembras vírgenes (Del Cerro y cols., 1991; Izquierdo y cols., 1992). Esta estructura es igualmente sexodimorfa en varios parámetros, tales como el volumen de la estructura, número de neuronas y ratio entre neuronas y glías, siendo en todos ellos mayor en los machos que en las hembras. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre machos y hembras en cuanto al número de células gliales que esta estructura contiene. Manipulando hormonalmente mediante orquidectomía de machos y androgenización de hembras, ambos el día postnatal P1, estas diferencias entre sexos quedaban invertidas. Este tratamiento, sin embargo, no afecta ni modifica a las células gliales de ningún sexo (Collado y cols., 1990).

Se han realizado otra serie de manipulaciones hormonales para estudiar el proceso de diferenciación de este núcleo con benzoato de estradiol (BE) y con DHT, encontrando resultados similares a los que se dieron en el BOA. Administrando BE o DHT el día del nacimiento (P1) a machos castrados, cuyos valores morfológicos por esta castración serían iguales que los encontrados en las hembras, se pudo demostrar que el estradiol provocaba un incremento en el volumen y el número de neuronas hasta asimilar estos parámetros a los que se daban en los machos controles no castrados, mientras que la DHT no sólo no tuvo el mismo efecto de masculinización del NTOA, sino que se pudo detectar una disminución significativa de los parámetros citados en éstos machos castrados y tratados con DHT comparados con los machos controles y los castrados tratados con BE (Collado y cols., 1993). Con estos datos se demostró que el mecanismo de masculinización del NTOA más probable, es el que está mediado por el efecto del estradiol (Collado y cols., 1990; Collado y cols., 1993).

En otro estudio se administró DHT a machos postnatalmente (P6-P20) y a hembras un antiandrógeno, acetato de ciproterona (AC) en el mismo período postnatal. Observaron que la DHT provocó un decremento en el volumen del NTOA de los machos hasta niveles similares a los de las hembras control, mientras que en las hembras, el AC provocó un incremento del volumen, pero sin alcanzar los valores de los machos controles (Collado y cols., 1992).

Respecto al efecto antimasculinizante de la DHT, existe otro ejemplo de éste sobre otra estructura cerebral de rata, la amígdala medial (Me), en el que la DHT actuó como un antiestrógeno que repercutió en una masculinización deficiente de esta estructura amigdalina (Malsbury, 1993). La DHT ha demostrado tener incidencia en la actividad de la enzima Aromatasa, inhibiéndola en ratas macho (Roselli y Klosterman, 1998; Negri-Cesi y cols., 2001). Al inhibirla en su actuación, habría menos estradiol aromatizado para realizar la masculinización y por ello, un peor e incompleto desarrollo masculino del NTOA. Por otro lado, también existen ejemplos que hacen referencia a un posible efecto antiestrogénico de la DHT en relación, por ejemplo, con células cancerígenas mamarias, tanto en la mujer como en el ratón (McIndoe y Etre, 1981; Casey y Wilson, 1984; Keefer y cols., 1987; Stover y cols., 1987).

En cuanto al tratamiento con acetato de ciproterona (AC) a las hembras, este antiandrógeno dificulta la fijación de los andrógenos en sus receptores al ocuparlos. Esta fijación en los receptores por parte del AC impide que la testosterona y la DHT circulante en plasma puedan adherirse a sus receptores ocupados (Nelson, 1996). En los animales con mutación en el gen para la isoenzima 5 α reductasa tipo I, como comentamos previamente, los niveles de estradiol aromatzado de la testosterona son tan elevados que llegan a ser tóxico y letales para las crías, puesto que se acumula el estradiol al no poder reducirse a DHT (Mahendroo y cols., 1997). En la hembra con AC el incremento de testosterona circulante, que no puede actuar, contaría con una ruta metabólica útil, que sería la aromatización a estradiol, que provocaría una masculinización del NTOA en las hembras tratadas con AC, pero nunca hasta asimilar al macho, puesto que los niveles de testosterona potencialmente aromatizable en plasma de la hembra, será necesariamente inferior al que existe en los machos.

El NTOA de ratas machos y hembras presenta un desarrollo ontogenético diferente en cuanto al número de neuronas y al volumen, determinándose en ambos casos el dimorfismo sexual en época postnatal (Collado y cols., 1998a). La edad a la que los machos alcanzan el volumen del NTOA adulto es el día P15. En cuanto al número de neuronas, en un principio machos y hembras ven aumentar la cantidad de sus neuronas de forma similar, pero en el P15 se produce el punto de inflexión a partir del cual ya empiezan a diferenciarse sexualmente (Collado y cols., 1998a). Esta diferenciación en el desarrollo parece deberse a la actividad apoptótica diferencial en machos y hembras durante la primera semana de vida, puesto que se pudo detectar una diferencia significativa en cuanto a la ratio de células apoptóticas por neuronas, siendo en el macho significativamente mayor (Collado y cols., 1998a).

1.3.1.4. Dimorfismo sexual en el núcleo de la estría terminal (NEST).

La sustancia gris que rodea la estría terminal, fue denominada por primera vez por Cajal como núcleo intersticial de la Estría [Ramón y Cajal, 1911; en (Ju y Swanson, 1989)]. Posteriormente Johnston, en 1923, le dio el nombre con el que hoy se le conoce (Núcleo de la Estría Terminal, NEST) y lo definió como una densa colección de células

cercana al punto de contacto de la estría medular y la columna del fórnix que continúa por debajo de la comisura anterior y sigue a la columna del fórnix hasta el hipotálamo (Johnston, 1923).

El NEST forma el suelo del ventrículo lateral y limita dorsomedialmente con la parte ventral del *séptum* lateral y la zona *limitans* y lateralmente con la cápsula interna, que lo separa del complejo caudado-putamen del globo pálido. Caudalmente, limita con la estría medular y en parte con la columna del fórnix, rostralmente limita con el núcleo *accumbens* y por último en la parte ventral desaparece con el área preóptica (figura 1.5.) (De Olmos y cols., 1985). La estría terminal divide el núcleo al atravesarlo en la parte anterior y posterior, mientras que la comisura anterior divide la parte anterior y posterior de la ventral (De Olmos y cols., 1985). Aunque esta definición y sus límites han parecido ser común en los diferentes autores que se han ocupado de la nomenclatura de este núcleo (De Olmos e Ingram, 1972), lo cierto es que no ha habido mucho consenso en su denominación. Algunos autores consideraron este núcleo como parte del sistema olfatorio subcortical [Allison, 1953; en (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988)] y otros lo consideraron como extensión de la amígdala, concretamente del grupo amigdalino medial y central (Johnston, 1923; De Olmos y cols., 1985; Cassell y cols., 1999). De hecho, existen evidencias de que en humanos y en monos existe una continuidad en características cito y quimio-arquitectónicas entre la amígdala y el NEST (Martin y cols., 1991). Incluso en la denominación de sus subdivisiones existe divergencia de criterios, empleándose en la literatura científica las nomenclaturas de dos grupos de autores diferentes que analizaron y clasificaron las subdivisiones del NEST en ratas Sprague-Dawley y Long Evans (Ju y Swanson, 1989; Moga y Saper, 1989, respectivamente). En este trabajo hemos adoptado el criterio clasificador de los siguientes autores: De Olmos y cols., 1985; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Moga y Saper, 1989; Paxinos y Watson, 1998.

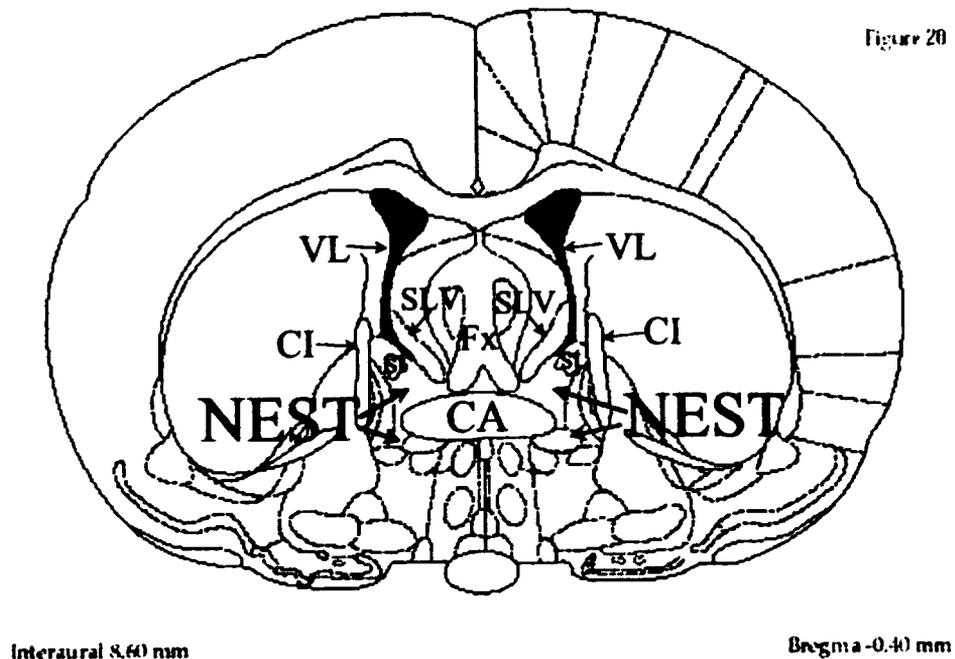


Figura 1.5.: EL dibujo muestra la situación del Núcleo de la Estria Terminal (**NEST**) con respecto a otras estructuras en un plano coronal. **CA:** comisura anterior; **CI:** cápsula interna; **Fx:** fórnix; **SLV:** Séptum lateral ventral; **st:** stria terminal; **VL:** ventrículo lateral. (Tomado del atlas Paxinos y Watson, 1998).

Tradicionalmente el NEST se había dividido en dos partes fundamentales: la lateral y la medial (Krettek y Price, 1978; McDonald, 1982). Aunque hay autores que siguen sosteniendo la existencia de dos divisiones, atendiendo a criterios de aproximación rostrocaudal (parte anterior y posterior: Ju y Swanson, 1989), la mayoría de los autores dividen el NEST en tres partes: parte medial, parte lateral y parte ventral (De Olmos y cols., 1985; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Moga y Saper, 1989; Paxinos y Watson, 1998). Dentro de estas principales subdivisiones sigue habiendo discordancia en cuanto a la nomenclatura, aunque básicamente se refieren a lo mismo.

La parte medial del NEST se divide en seis núcleos: medial anterior (NESTma), medial ventral (NESTmv), posterior medial (NESTpm), posterior intermedia (NESTpi), subventricular (NESTsv) e intermedial (NESTim). La parte lateral del NEST se divide

igualmente en seis núcleos: lateral anterior (NESTla), lateral dorsal (NESTld), lateral ventral (NESTlv), lateral posterior (NESTlp), supracapsular (NESTsc) y juxtacapsular (NESTjxt). Por último la parte ventral del NEST, se divide en los subnúcleos preóptico (PO) y parastrial (PS) (De Olmos y cols., 1985; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Moga y Saper, 1989; Paxinos y Watson, 1998; Stefanova y cols., 1998; Stefanova y Ovscharoff, 2000).

En estas subdivisiones existen asimismo diferencias en cuanto a las células que lo componen. Mediante la técnica de tinción de Golgi, se pudo determinar que la subdivisión medial se caracteriza por poseer neuronas con forma ovoide, de 14- 18 μm de largo y 10 μm de ancho, cuyos brazos dendríticos se extienden de 300 a 400 μm y varían en cuanto a densidad de espinas dendríticas (McDonald, 1983; De Olmos y cols., 1985). Por otro lado, las células pertenecientes a la subdivisión lateral, poseen forma ovoide con tamaños uniformes de 14-17 μm y con 4 ó 5 radiaciones dendríticas que se extienden de 150- 200 μm , teniendo las dendritas secundarias y las más alejadas mucha más arborización. La longitud de los axones es de 50 a 100 μm . Dentro de esta subdivisión, la subpoblación juxtacapsular se caracteriza por poseer neuronas más pequeñas (9-13 μm) y por la menor distancia recorrida por sus axones (McDonald, 1983; De Olmos y cols., 1985).

En cuanto a la neuroquímica del NEST, posee células y fibras inmunorreactivas a varios tipos de neuropéptidos. Éstos son la neurotensina (NT-ir), en las subdivisiones NESTld, NESTsc, PO, NESTla, NESTma, PS, NESTpm y NESTlp; la somatostatina (SS-ir) en las subdivisiones NESTld, NESTla, NESTma, NESTpl, NESTpi, NESTpm y PO; también posee encefalina (ENK-ir) en las subdivisiones NESTld, NESTlv, NESTpl, NESTsc, NESTma, NESTvm, NESTpm y NESTpi (Moga y cols., 1989; Lee y Davis, 1997; Erb y Stewart, 1999). En la región NESTpm, existen neuronas que responden inmunocitoquímicamente a la sustancia P (SP-ir) (Malsbury y McKay, 1994). También se pudo encontrar factor liberador de corticotropina (CRF-ir) en las células de las poblaciones pertenecientes al NESTdl, PS, NESTvl, NESTma, NESTla, NESTpm, NESTpl y al PO (Moga y cols., 1989; Lee y Davis, 1997; Erb y Stewart, 1999). La liberación antes mencionada de CRH por parte del NEST ha sido relacionada con la función que este núcleo parece desempeñar en respuestas de ansiedad ante el estrés (Marjoleen y cols., 1992; Lee y Davis, 1995; Vankova y cols., 1996; Lee y Davis, 1997;

Erb y Stewart, 1999; Schulkin, 1999). Existen, igualmente, células inmunorreactivas a la hormona antidiurética vasopresina (VP-ir) en el NEST, sensible a los esteroides gonadales, puesto que tras castración a ratas machos, la VP experimenta un descenso en su expresión en el NEST mientras que si se administra neonatalmente PT o BE o propionato de DHT (DHTP) o BE + DHTP se produce en todos los casos un incremento de células vasopresinérgicas en el NEST (Miller y cols., 1992; De Vries y Boyle, 1998; Han y De Vries, 2003). Además, la expresión de la VP es diferente entre sexos, existiendo de 2 a 3 veces más células que la expresan en ratas machos que en hembras (Planas y cols., 1994; Planas y cols., 1995; De Vries y Boyle, 1998). En el NEST, conjuntamente con la VP, se expresa la galanina (GAL) y ésta última, que es de expresión similar entre sexos, es la que media la diferencia entre machos y hembras de la VP por su actuación en época perinatal (Planas y cols., 1994; Planas y cols., 1995). También en el NEST existe distinción entre géneros en cuanto a la inmunorreactividad al GABA, al existir más neuronas GABA-ir por mm^3 en el macho que en la hembra Sprague-Dawley. Esta proporción puede invertirse en los machos hasta alcanzar los niveles de las hembras, tras ser castrados (Stefanova y cols., 1998; Stefanova y Ovscharoff, 2000). Otra de las hormonas que existen en el NEST, concretamente en la subdivisión dorsal y ventral, es la colecistoquinina (CCK) e igualmente en el NEST del macho hay más neuronas inmunorreactivas a ésta que en la hembra (Andres y cols., 1993; Chung y cols., 2000). También en el NEST se han encontrado receptores para la oxitocina (Insel, 1992; Insel y cols., 2001; Kendrick y cols., 1997).

Existen asimismo, otros neurotransmisores asociados a esta estructura, como la noradrenalina (NA), la serotonina (5-HT) y la Dopamina (DA) (Aston-Jones y cols., 1999; Lonstein y cols., 2000; Stack y cols., 2002). Por esta razón propone al NEST como sustrato neurológico de respuestas de ansiedad en rata y humanos (Onaka y Yagi, 1998; Kloet, 2000). Otro de los neurotransmisores cuya presencia en el NEST es muy relevante es la 5-HT, ya que las regiones NESTm y NESTl poseen receptores para ella (Rainnie, 1999). Por último, la dopamina (DA) se incrementa extracelularmente en el NEST, de manera dosis-dependiente, tras la administración de drogas de abuso tales como morfina, nicotina, cocaína y etanol (Carboni y cols., 2000). La función que el NEST desempeña en las conductas de consumo de drogas de abuso parece ser importante, puesto que tras inyectar metilnaloxonio, un antagonista de los receptores de opiáceos, en el NEST y el núcleo *accumbens* en ratas dependientes a la heroína, se

redujo significativamente su consumo por autoadministración de una manera dosis-dependiente, sin afectar a las ratas no dependientes a la heroína (Walker y cols., 2000).

El NEST posee receptores para los andrógenos (Simerly y cols., 1990; Lisciotto y Morrell, 1994; Bakker y cols., 1997; McAbee y DonCarlos, 1999a; McAbee y DonCarlos, 1999b), para los estrógenos (Simerly y cols., 1990; Yuan y cols., 1995) y para la progesterona (Wagner y cols., 1998). El NESTpr (nomenclatura de Ju y Swanson, 1989, que equivale al NESTpm de Moga y cols., 1989) posee altas concentraciones de células inmunorreactivas al receptor de andrógenos (*AR-ir*) (Bakker y cols., 1997; Lisciotto y Morrell, 1994). La cantidad de receptores de andrógenos que haya en el NESTpr dependen de la actuación de la testosterona o el estradiol en época temprana del desarrollo. Para demostrar esto, McAbee y DonCarlos en 1999 administraron cinco sustancias diferentes diariamente desde el P0 hasta el P5 o P10 a machos castrados el día que nacieron y éstas fueron: propionato de testosterona (PT), o dietilestilbestrol (DES), o dihidrotestosterona (DHT) o el antiandrógeno flutamida (Flu) o vehículo (Veh). Comprobaron que solamente los animales que recibieron PT y los que recibieron DES experimentaron un incremento en sus expresiones del ARNm del *AR* en el NESTpr, disminuidas por efecto de la castración, hasta asimilarse a los machos intactos controles, mientras que los demás grupos presentaba actividad del ARNm del *AR* similar a la encontrada en las hembras (McAbee y DonCarlos, 1999a; McAbee y DonCarlos, 1999b). Estos resultados condujeron a los investigadores a afirmar que son los estrógenos, directamente o aromatizados desde la testosterona, y no los andrógenos, los que están regulando la expresión del *AR* en estas regiones cerebrales (McAbee y DonCarlos, 1999a; McAbee y DonCarlos, 1999b).

En cuanto a los receptores de estrógeno en el NEST, en la rata hembra adulta éstos se expresan acorde al estado cíclico, siendo la ocupación de receptores de estradiol (*ER*) baja durante el estro (del 9%) y ascendiendo hasta el 46 % de ocupación en proestro (Yuan y cols., 1995). Tratándose de los machos, la unión del estradiol a sus receptores varía dependiendo de la región cerebral en cuestión, habiendo en el NEST la cifra de 55 % de receptores ocupados en machos intactos (Yuan y cols, 1995). Si se someten a los machos a manipulaciones hormonales, como por ejemplo la gonadectomía, la ocupación en el NEST es del 0%, pero si tras gonadectomizarles se les administra PT, esta cifra de ocupación asciende hasta el 54 % (casi idéntico al grupo

intacto). Si lo que se les administra es BE sin gonadectomizarlos, la ocupación alcanza el 100% de los receptores disponibles (Yuan y cols., 1995).

Pasaremos ahora a abordar la conectividad del NEST desde la complejidad de su estructura, con las subdivisiones citoarquitectónicas que la componen. En términos de conectividad olfatoria, el NEST medial puede considerarse como parte del SVN, siendo el NESTpm vomeronasal por excelencia mientras que el NEST lateral formaría parte del SOP (De Olmos y cols., 1985; Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Segovia y cols., 1993). Las subdivisiones del NEST medial mantienen conexiones recíprocas con el BOA y el APM (De Olmos y cols., 1985). Una de las conexiones más relevantes por su masividad es la que se establece entre el NEST y la amígdala (Swanson y Petrovich, 1998; Dong y cols., 2001). El NESTpm recibe y envía proyecciones al Me e igualmente el NESTma recibe aferencias de la Me (De Olmos e Ingram, 1972; Swanson y Cowan, 1976, 1979; De Olmos y cols., 1985). Pero recientemente también se han podido detectar otras conexiones con la amígdala desde el NEST. Se trata de la subdivisión supracapsular (NESTsc), situada sobre de la cápsula interna, que mantiene conexión bidireccional con la amígdala (Shammah-Lagnado y cols., 2000).

El córtex entorrinal, el córtex insular agranular y el córtex perirrinal, pertenecientes al bulbo olfatorio principal del SOP, envían eferencias a la parte lateral del NEST, mientras que éste último (NESTl) envía proyecciones a la sustancia *innominata* y ésta al núcleo central de la amígdala, estableciendo un *continuum* (De Olmos y cols., 1985).

El NEST ventral recibe densas proyecciones noradrenérgicas de la médula oblongada y del A6 (*locus coeruleus*) a través de los grupos celulares noradrenérgicos A1 y A2 (Brownstein y Palkovits, 1998; Onaka y Yagi, 1998; Forray y cols., 2000).

En cuanto a las eferencias del NEST, podemos decir que envía proyecciones a la sustancia *innominata*, al núcleo *accumbens*, a varias partes del hipotálamo incluida el área preóptica, el área tegmental ventral, el núcleo medio y dorsal del Rafé y el *locus coeruleus* (Swanson y Cowan, 1976, 1979). La subdivisión NESTpm envía eferencias al

AVPv y al área preóptica, siendo la primera de carácter sexodimorfo, al poseer más fibras la conexión NESTpm-AVPv del macho que de la hembra (Hutton y cols., 1998)

La subdivisión lateral juxtacapsular del NEST (NESTjxt), relacionado con el control de respuestas viscerales, el control somatomotor y con el control de respuestas autonómicas proyecta a las siguientes regiones: la Me, la zona subcomisural y lateral anterior caudal del NEST (nomenclatura de Ju y Swanson, 1989), al complejo caudado-putámen, al núcleo basolateral anterior amigdalino, a la sustancia *innominata*, a la sustancia negra, al núcleo reticular mesencefálico, a la zona límbica, al hipotálamo, al tálamo medial y a la sustancia gris periacueductal (Dong y cols., 2000).

Pasaremos ahora a tratar el dimorfismo sexual de este núcleo cerebral. En su volumen global no presenta dimorfismo en ratas Wistar ni en Sprague-Dawley (Del Abril y cols., 1987; Stefanova y Ovtcharoff, 2000), pero sí lo hace en algunas subdivisiones.

Por ejemplo, el NESTpm presenta un volumen mayor en machos que en hembras de rata Wistar (Del Abril y cols., 1987), en cobayas (Hines y cols., 1992; Hines y cols., 1985) y en ratas Sprague-Dawley (Chung y cols., 2000). En ratas Wistar este dimorfismo quedaba invertido tras castrar a los machos y androgenizar a las hembras el P1 (Del Abril y cols., 1987).

Por otro lado, la subdivisión NESTma presenta el patrón opuesto al comentado, al presentar un mayor volumen las hembras que los machos de ratas Wistar (Del Abril y cols., 1987; Guillamón y cols., 1988b). El volumen de los machos alcanzaba al de las hembras si eran gonadectomizados en el P1, pero en las hembras el volumen no disminuía hasta los niveles masculinos si eran androgenizadas el día P1 (Guillamón y cols., 1988b).

En ratas Sprague-Dawley, midiendo el volumen de las subdivisiones NESTm, NESTl y NESTv sin distinciones, no se encontró dimorfismo sexual en ninguna de éstas ni a lo largo de diferentes momentos vitales, en las edades de 6, 20, 120 ó 360 días de vida. Esta similitud se mantuvo a pesar de realizarles manipulaciones hormonales, tales

como la castración neonatal o en pubertad, o la administración neonatal de inhibidor de Aromatasa o de antagonista de estrógeno (Stefanova y cols., 1998; Chung y cols., 2000; Stefanova y Ovtcharoff, 2000).

Comentaremos brevemente el dimorfismo existente en el núcleo parastrial (PS), puesto que algunos autores lo han considerado como parte de la estría terminal subdivisión ventral (NESTv) (Paxinos y Watson, 1998; Stefanova y cols., 1998; Stefanova y Ovscharoff, 2000). Esta estructura es un grupo de células situadas bajo la comisura anterior y se compone de un grupo de células rostrales, que fue anteriormente denominada *round nucleus* (Raisman y Field, 1973) y un grupo de células fusiformes en forma ovoide (Simerly y cols., 1984). Este núcleo presenta el mismo patrón de dimorfismo sexual respecto al volumen que el que presenta la subdivisión NESTma, esto es, las hembras presentan un volumen mayor que los machos. Esta diferencia se invertía en los machos, hasta alcanzar valores femeninos en el volumen del PS, si eran gonadectomizados el día P1 e igualmente quedaba invertido en las hembras, reduciéndose su volumen hasta los valores masculinos, si eran androgenizadas el día del nacimiento (P1) (Del Abril y cols., 1990).

Volviendo al NEST y abordando ahora el dimorfismo sexual referido al número de neuronas, diremos que los machos Wistar poseen un número más elevado de éstas en la subdivisión NESTpm, siendo además reversible tras manipulación hormonal, tanto en el macho tras gonadectomizarlos en P1, como en la hembra tras androgenizarlas el mismo día (Guillamón y cols., 1988b)..

En la subdivisión NESTma, que presentaba un patrón de diferenciación sexual en la dirección hembra > macho respecto al volumen (Del Abril y cols., 1987), cuando lo analizado es el número de neuronas, sigue existiendo el patrón de diferenciación sexual de hembra > macho en ratas Wistar (Guillamón y cols., 1988b). Este patrón es susceptible de ser invertido tras orquidectomizar a machos el día P1, aumentando en ellos el número hasta asimilarse a las hembras, pero no tras androgenizar a hembras el día P1, no disminuyendo con esto el número de neuronas que las hembras presentan (Guillamón y cols., 1988b).

También la subdivisión NESTIa presenta un patrón de diferenciación similar al comentado respecto al mayor número de neuronas en hembras que en machos Wistar. En esta subdivisión, sin embargo, sí son eficaces los tratamientos hormonales que invierten los patrones en ambos sexos: tras androgenizar a ratas hembra Wistar en éstas se reduce su número de neuronas en el NESTIa y tras gonadectomizar a ratas macho Wistar, en éstos se incrementaba hasta valores femeninos el número de neuronas del NESTIa (Guillamón y cols., 1988b). Ni la subdivisión NESTma ni la NESTIa han sido estudiadas en otras razas diferentes de la Wistar.

Lo que sí se analizó en ratas Sprague-Dawley fue la densidad neuronal en las subdivisiones NESTm, NESTI y NESTv, de nuevo sin distinciones, y no se encontró dimorfismo en ninguna de ellas. Ni las manipulaciones del ambiente hormonal neonatalmente con la administración de inhibidor de Aromatasa o de antagonista de estrógeno, ni la castración temprana o en la pubertad, tuvieron alguna incidencia significativa sobre las diferencias entre sexos respecto a la densidad neuronal de ratas Sprague Dawley (Stefanova y cols., 1998; Stefanova y Ovtcharoff, 2000).

En seres humanos se han descrito diferencias sexuales en la dirección hombre > mujer en la parte central del NEST (NESTc), que se corresponde con el NESTpm de la rata, siendo ésta en volumen 2,47 veces mayor en el hombre y existiendo diferencias significativas en el número de neuronas a partir sólo de la época adulta (Allen y Gorski 1990; Zhou y cols., 1995; Kruijver y cols., 2000; Chung y cols., 2002). Este dimorfismo y su tardía determinación se relacionaron con tendencias sexuales, puesto que el número de neuronas del NESTc existente en los hombres transexuales (hombre-mujer) era similar al encontrado en mujeres heterosexuales (Zhou y cols., 1995). Por otro lado, el número de neuronas cuantificadas en hombres homosexuales y heterosexuales no se diferenciaban entre sí, pero superaban significativamente a los hallados en hombres transexuales y en mujeres heterosexuales, habiéndose controlado las posibles oscilaciones hormonales en todos los grupos experimentales (Kruijver y cols., 2000).

El dimorfismo encontrado en el NESTpm tanto en número de neuronas como de volumen, podría deberse a una diferencia en cuanto a células apoptóticas entre los sexos. En animales Sprague-Dawley en los que, como comentamos previamente, los machos poseen mayor volumen que las hembras en el NESTpr, esta diferencia se daría porque existe un mayor número de células apoptóticas en la hembra que en el macho (Chung y cols., 2000). La hembra alcanza su cenit de actividad apoptótica el P6, aunque el dimorfismo definitivo se establece a partir del día P12. El hecho de administrar PT a machos castrados y a hembras permitía reducir la incidencia de apoptosis en estos grupos (Chung y cols., 2000). La testosterona o un derivado de ésta parece ser la que esté mediando la diferenciación de esta estructura cerebral, según los estudios previamente comentados.

Como dato importante, también, para entender el proceso de diferenciación sexual del NEST, añadiremos el trabajo de Zhou de 1996. Detectaron que la administración de estradiol a hembras ovariectomizadas, incrementaba la actividad de la proteína fosforilada pCREB (del inglés *cAMP response element-binding protein*) en el NEST en una duración de hasta 15 minutos seguidos a la administración (Zhou y cols., 1996). Este resultado fue detectado en otras regiones cerebrales, como el área anteroventral periventricular (AVPv) y el área preóptica (Gu y cols., 1996; Zhou y cols., 1996). Puesto que esta proteína está implicada en la supervivencia neuronal (Walton y cols., 1999) su función en la diferenciación sexual podría ser relevante.

Por último, comentaremos las implicaciones conductuales que este núcleo ha demostrado tener. Está relacionado con tareas de ejecución y aprendizaje motor, puesto que tras lesionarlo en machos adultos Wistar, se pudo comprobar cómo su ejecución empeoraba en cuanto a un aumento de inmovilidad y a un menor número de conductas de escape (Schulz y Canbeyli, 2000). También está relacionado con la conducta agresiva, ya que lesionando a machos el NEST, se disminuía en ellos la agresividad hacia otro macho intruso (Albert y cols., 1989b). Otra de las conductas en la que este núcleo se ve involucrado es la conducta maternal. Una de las pruebas de esta implicación es que la sección de la estría terminal facilita la aparición de ésta conducta en hembras vírgenes expuestas al olor de las ratas (Fleming y cols., 1980). Tras lesionar el propio núcleo, se pudo comprobar que conductas como la de acarreo (retrieval) y otras se veían perjudicadas en ratas que habían tenido crías (Numan y Numan, 1996). La

inmunocitoquímica del *c-fos* indica actividad de los cuerpos celulares neuronales y ha sido detectada un aumento de ésta en la subdivisión ventral del NEST durante el despliegue de conducta maternal, indicando una clara implicación de esta subdivisión en la mencionada conducta (Kalinichev y cols., 1990; Numan y cols., 1998; Komisaruk y cols., 2000; Lonstein y De Vries, 2000). Por último, el NEST es importante para la ejecución de la conducta sexual. Tras lesionar el NEST a machos adultos Long Evans, que habían tenido experiencia sexual previa, experimentaron un declive y deterioro en la ejecución de la conducta de monta, traducido en un enlentecimiento generalizado de todos los parámetros implicados en la conducta copulatoria, como latencia de monta, latencia de intromisión, frecuencia de monta, frecuencia de intromisión, intervalo de interintromisión e intervalo post-eyaculatorio (Emery y Sachs, 1976; Valcourt y Sachs, 1979). En un trabajo más reciente y más preciso en cuanto a la lesión del NEST (se seleccionó para lesionar específicamente el NESTpm en ratas Wistar) se pudo comprobar que esta lesión indujo un deterioro en la conducta sexual de ratas machos sin experiencia, tanto en el inicio de la conducta copulatoria, como en la consecución de la eyaculación, mientras que en machos que sí poseían experiencia sexual previa a la lesión no les afectó al inicio de la conducta copulatoria, pero incrementó la latencia en la eyaculación, sugiriendo que esta subdivisión del NEST es muy relevante para la correcta consecución de la conducta sexual masculina (Claro, Tesis Doctoral, 1992; Claro y cols., 1995). Por otro lado, el Núcleo de la Estría Terminal, sin precisar distinciones, está relacionado con la conducta de lordosis femenina, ya que lesionando las fibras conectadas con la amígdala y el NEST, esta conducta se veía deteriorada (López y Carrer, 1982; López y Carrer, 1985).

1.3.1.5. Dimorfismo sexual en la amígdala medial (Me).

Esta estructura forma parte de la "amígdala vomeronasal" (Kevetter y Winans, 1981) y está implicada en conducta maternal y sexual (Fleming y cols., 1980; Kevetter y Winans, 1981; Lehman y Winans, 1982; Kondo y cols., 1997). La subdivisión citoarquitectónica medial parece ser vital para la conducta sexual del macho, concretamente para la erección del pene (Kondo y cols., 1997). La Me posee receptores de estrógeno y andrógeno (Simerly y cols., 1990) e igualmente presenta dimorfismo sexual en parámetros tales como la cantidad de espinas dendríticas o el volumen de la

estructura, siendo en ambos mayores en el macho que en la hembra (Nishizuka y Arai, 1981; Mizukami y cols., 1983; Hines y cols., 1992). Sin embargo, estas diferencias son reversibles con el tratamiento hormonal pertinente. Por ejemplo, ya que el volumen dimorfo sexualmente de la Me parece quedar definido entre los días postnatales P21 al P30, la administración de BE a ratas hembra del P1 al P10, antes de que se determine el dimorfismo revierte esta diferencia y, la administración a hembras de PT el día P5, incrementa el número de espinas sinápticas hasta valores similares al macho (Nishizuka y Arai, 1981).

Por otro lado, existen otras subdivisiones de la amígdala que presentan patrones de diferenciación sexodimorfos. Concretamente la parte posteromedial cortical de la amígdala (PMCo) presenta un patrón diferente entre sexos en cuanto al número de neuronas y volumen de la estructura, siendo en ambos casos mayor en los machos de rata Wistar (Vinader-Caerols y cols., 1998). Pero si a estos animales se les administra BE a hembras el día de nacimiento, sus parámetros de volumen y número de neuronas se masculinizan y aumentan e igual sucede si se administra BE el mismo día postnatal a machos castrados, que poseen por esta castración valores feminizados (Vinader-Caerols y cols., 2000).

En las subdivisiones posteroventral y posterodorsal de la amígdala medial (MePV y MePD, respectivamente) también existe dimorfismo en la dirección macho > hembra en parámetros de volumen total de la estructura (Kerchner y cols. 1995). Este dimorfismo no pudo invertirse en los machos hasta valores femeninos tras la exposición de estrés prenatal de sus madres (Kerchner y cols. 1995). Puesto que en regiones tales como el núcleo sexodimorfo del área preóptica medial (NSD-APM), el núcleo espinal bulbocavernoso (NEB) y el núcleo dorsolateral (NDL), que se comentarán posteriormente, el estrés provoca una masculinización incompleta por el déficit en secreción de testosterona que dicho estrés conlleva (Grisham y cols., 1991; Kerchner y Ward, 1992), la masculinización completa de las MePV y MePD tras exposición a estrés prenatal hizo sugerir a los autores que el efecto de este estrés es selectivo y dependiente de períodos críticos de desarrollo (Kerchner y cols., 1995).

Por otro lado, Cooke y su equipo, en 1999, encontraron que realizando una manipulación hormonal en época adulta de ratas Long Evans machos y hembras, los parámetros de volumen y tamaño de los somas neuronales del núcleo posterodorsal de la amígdala medial (MePD), en principio mayores en el macho, quedaban igualados eliminando su diferencia sexual (Cooke y cols., 1999). Llevaron a cabo su investigación castrando a machos adultos y administrando a hembras PT durante cuatro semanas. Esta manipulación produjo en el macho una reducción del MePD, al medirlo cuatro semanas después de la castración, hasta valores propios femeninos, mientras que la administración de PT a hembras adultas, logró incrementar el MePD hasta valores masculinos (Cooke y cols., 1999; McEwen, 1999a; McEwen, 2001). Con este dato los autores sostienen que los procesos de diferenciación sexual son extensibles más allá del período pre y perinatal, al menos en esta región de la amígdala (McEwen, 1999a; McEwen, 2001).

1.3.1.6. Dimorfismo sexual en núcleo sexodimórfico al área preóptica medial (NSD-APM).

El área preóptica medial (APM) es una estructura hipotalámica ampliamente estudiada y pionera en cuanto al estudio del dimorfismo sexual. Este núcleo se compone de tres divisiones citoarquitectónicas, que son la parte central del núcleo preóptico (NPMc), la parte medial del núcleo preóptico (NPMm) y la parte anteroventral del núcleo preóptico (NPMav) (Gorski, 1984; Bloch y Gorski, 1988). Contiene igualmente receptores de andrógenos y estrógenos (Simerly y cols., 1990) y forma parte del entramado neuronal que compone el SVN. Recibe aferencias del OVN y a través de la estría terminal, le llegan conexiones de la Me, el NESTma y el NESTpm (De Olmos y cols., 1985).

La primera referencia que se hizo en cuanto a su dimorfismo sexual tuvo lugar en 1968 por Dörner y Staudt que estudiaron el volumen nuclear en rata de esta estructura y encontraron que las hembras poseían valores más altos que los machos, reduciéndose hasta en un 50% tras orquidectomizar a los machos el P1 (Dörner y Staudt, 1968).

Posteriormente el equipo de Gorski se refirió a un conjunto de células del APM, que era considerablemente mayor en los machos que en las hembras y denominaron a esta estructura núcleo sexodimorfo del área preóptica medial (NSD-APM) (Gorski y cols., 1978). Esta región abarca varias subdivisiones del APM, que son la APMc, la APMav y parte de la APMm (Bloch y Gorski, 1988). Las subdivisiones AMPc y AMPav son sexodimorfos individualmente y responsables del dimorfismo del NSD-APM (Davis y cols., 1996). El volumen de este núcleo, medido de varias formas y siempre replicado, es de tres a cuatro veces superior en machos que en hembras (Gorski y cols., 1980; Döhler y cols., 1984; Gorski, 1984; Hines y cols., 1985; Meredith y cols., 2001) y también es mayor en el macho la densidad neuronal y el tamaño celular (Gorski y cols., 1980).

Para averiguar qué provocaba esta diferencia entre machos y hembras se procedió a realizar diferentes manipulaciones hormonales en diferentes períodos del desarrollo. Se comprobó que la zona definida como NSD-APM quedaba establecida el día embrionario 18 (E18) (Jacobson y Gorski, 1981). El tratamiento con PT a hembras los días E16-E17 resultaba ineficaz para aumentar el volumen de este núcleo, resultando efectivo, sin embargo, para este propósito la misma administración de PT durante los días E18-E20 (Rhees y cols., 1990). Asimismo, en época postnatal, la inyección de PT a machos castrados el día del nacimiento en los días P2 (Jacobson y cols., 1981), P3, P4 o P5 provocaba un incremento del volumen del NSD-APM, hasta asimilarlos a los machos control, mientras que en los días P6, P7 o P8 lo que provocaba era un decremento del volumen del NSD-APM. En hembras sucedía lo mismo cuando se suministraba PT en los primeros días, esto es, se incrementaba el volumen del NSD-APM (Döhler y cols., 1986), pero en los P6, P7 y P8, el volumen se mantenía igual que sin tratamiento (Rhees y cols., 1989).

Otras manipulaciones hormonales llevadas a cabo en este núcleo fueron, por ejemplo, la administración de tamoxifén a machos, un antiestrógeno, desde el E16 y de estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES) a hembras pre y perinatalmente. A los dos meses de edad estos animales fueron sacrificados y se observó que el volumen del NSD-APM del macho tratado con tamoxifén disminuía hasta cantidades propias de las hembras y a su vez las hembras incrementaban su volumen tras ser tratadas con DES (Döhler y cols., 1982; Döhler y cols., 1983; Döhler y cols., 1984; Döhler y cols., 1986).

La masculinización diferencial del volumen de este núcleo puede ser debida a varios factores. En primer lugar, por efecto de la testosterona sobre el incremento del número de neuronas en el macho, mediante la estimulación de la neurogénesis y/o afectando a la migración neuronal. Otra posible actuación de la testosterona para provocar la masculinización de este núcleo es a través de la prevención de la muerte neuronal o apoptosis. Respecto a las primeras opciones, existen evidencias de que en el APMc la testosterona probablemente no actúe favoreciendo la neurogénesis (Dodson y cols., 1993). Por otro lado, el patrón de migración del NSD-APM desde el neuroepitelio no es diferente en machos y hembras, ni se ve afectada por la castración de los machos neonatalmente (Jacobson y cols., 1985). Por lo tanto, el mecanismo explicativo sugerido para explicar este dimorfismo en el NSD-APM es una tasa diferencial de muerte celular o apoptosis por efecto de la testosterona o de un derivado de ésta (Davis y cols., 1996). La apoptosis es un proceso de muerte celular mediante el cual, a través de la degradación de la cromatina nuclear por efecto de las endonucleasas, se produce la condensación del citoplasma y el núcleo, lo cual conlleva que la célula se fragmente en cuerpos apoptóticos. El resultado de este proceso origina que el núcleo celular se vuelva picnótico y éste junto con el resto de los cuerpos apoptóticos, sean posteriormente fagocitados y degradados por macrófagos u otras células vecinas (Kerr y cols., 1972; Compton, 1992; Sastry y Rao, 2000).

En el APMc se produce una diferencia sexual en cuanto a la incidencia de apoptosis. Durante los días postnatales P7 y P10, la incidencia de apoptosis es superior en la hembra y esta superioridad se mantiene por más tiempo que en el macho. En éstos hay un pequeño pico de incidencia apoptótica el P6 pero luego desciende (Davis y cols., 1996). Otros autores encuentran que el número de células apoptóticas en rata, tanto en machos como en hembras experimenta un incremento entre los días P4 al P7 (Yoshida y cols., 2000). La testosterona administrada a machos castrados inhibió hasta tres veces la incidencia de apoptosis en esta región, hasta situarla al mismo nivel que los machos intactos (Davis y cols., 1996).

El NSD-APM se ha descrito también como dimorfo sexualmente en humanos, respecto al volumen y al número de neuronas, presentando los hombres en ambos casos valores mayores que las mujeres (Swaab and Fliers, 1985; Allen y cols., 1989; Hofman y Swaab, 1989). En humanos se le ha denominado núcleo intersticial del hipotálamo 3

(NIHA-3) (Allen y cols., 1989) y ha sido relacionado además con la homosexualidad (LeVay, 1991; LeVay, 1995). LeVay definió un sustrato biológico para la homosexualidad, al afirmar que esta subdivisión del hipotálamo tenía el mismo volumen en mujeres y hombres homosexuales, ambos inferiores a los hallados en hombres heterosexuales (LeVay, 1991; LeVay, 1995), pero estos resultados, así como el procedimiento seguido para su obtención, han suscitado mucha polémica y críticas al respecto.

1.3.1.7. Dimorfismo sexual en otros núcleos hipotalámicos que reciben proyecciones del OVN.

El hipotálamo ventromedial (HVM) recibe aferencias de la Me y del NESTpm (De Olmos y cols., 1985) y está implicado en el control de la conducta reproductiva femenina (Pfaff y Sakuma, 1979a; Pfaff y Sakuma, 1979b) y en la conducta de ingesta (Striker y Verbalis, 1991). Los primeros estudios de esta región apuntaron hacia una diferenciación sexual macho > hembra en cuanto al tamaño global de la estructura, que podía ser invertido tras orquidectomizar a machos en el P1. Esta alteración en volumen del HVM tras orquidectomizar al macho tiene, asimismo, reflejo en cuanto a la conducta sexual, puesto que, tras este tratamiento, aumenta la probabilidad de que el macho exhiba lordosis y disminuye la misma de desplegar conducta de monta en época adulta (Dörner y Staudt, 1968).

Otros parámetros morfológicos en los que el HVM ha mostrado ser sexodimorfo son la organización sináptica, la expresión de ARNm de oxitocina (OX) y la inmunorreactividad de la colecistoquinina (CCK) (Matsumoto y Arai, 1986; Micevych y cols., 1987; Bale y Dorsa, 1995). En cuanto a la primera, el número de espinas sinápticas del hipotálamo ventromedial parte ventral lateral (HVM-VL) es más abundante en los machos normales, estando éste reducido tras castrarlos el P1 e incrementado en las hembras tras androgenización temprana en el P5 (Matsumoto y Arai, 1986). Respecto a la OX y CCK, en ambos casos en los machos, la expresión es mayor (Micevych y cols., 1987; Bale y Dorsa, 1995).

Inyectando estrógenos a ratas hembra adultas induce el crecimiento de nuevas sinapsis en el HVM (Frankfurt y McEwen, 1991), mientras que este efecto está ausente en machos adultos castrados (Segarra y McEwen, 1991). Estos datos reflejan la existencia de plasticidad en época adulta, así como la existencia de más de un período crítico de actuación de los esteroides para establecer las diferencias sexuales en el HVM (McEwen, 1999a).

Por último, comentaremos brevemente el núcleo premamilar ventral (PMV) y el núcleo supraóptico (SO). Respecto al PMV, que también recibe aferencias del OVN (Larriva-Sahd, y cols., 1993) se pudo comprobar que mostraba dimorfismo sexual en la dirección macho > hembra en cuanto al tamaño del núcleo de las neuronas (Dörner, 1976). Por su parte, el SO, mayor en los machos que en las hembras, presenta también cambios relacionados con la edad en parámetros tales como volumen total y volumen neuronal (Madeira y cols., 1993).

Una vez comentadas las diferencias sexuales existentes en los núcleos pertenecientes al entramado neuronal del SVN, pasaremos a tratar otros núcleos que han demostrado ser muy relevantes en el entendimiento del proceso de diferenciación sexual. Estas estructuras presentan el patrón de hembra mayor que macho y son el núcleo anteroventral periventricular (AVPv) y el *locus coeruleus* (LC).

1.3.1.8. Dimorfismo en estructuras en las que las hembras muestran mayor patrón morfológico que los machos y que están relacionados con el SVN (AVPv y LC).

La mayoría de las estructuras del SVN presentan el patrón de dimorfismo sexual en la dirección macho > hembra, excepto, tal y como se comentó previamente, las subdivisiones del NESTma y NESTla, así como el núcleo PS. En la estructura NESTma y en el núcleo PS, la hembra posee mayor volumen que los machos (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Del Abril y cols., 1990) y en las subdivisiones NESTma y NESTla, el número de neuronas es más elevado en las hembras (Del Abril y

cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Sin embargo, aunque en el SVN estas estructuras son las únicas encontradas que presenten este patrón de diferenciación, en otros núcleos cerebrales, como el AVPv y el LC, este patrón está presente.

El área anteroventral periventricular (AVPv) de la región preóptica es un núcleo mayor en volumen en las hembras y situado en la parte rostral de la zona periventricular del hipotálamo (Arai y cols., 1993). Este núcleo es un componente esencial del circuito neuronal que, mediante las proyecciones que envía a neuronas hipotalámicas que contienen GnRH, convierte la retroalimentación positiva de los estereoides ováricos en las secreciones fásicas de LH que preceden a la ovulación. Igualmente media la secreción de prolactina mediante las proyecciones a neuronas dopaminérgicas del núcleo tuberoinfundibular (Gu y Simerly, 1997; Simerly, 1998; Simerly, 1999).

Las principales aferencias de este núcleo son el núcleo arcuato del hipotálamo (Arc), el núcleo posterior de la amígdala (PA) y la parte medial del área preóptica medial (APMm), que contienen altas concentraciones de neuronas que expresan *ER* y *PrR* (Simerly, 1998). Otras aferencias son el núcleo dorsomedial del hipotálamo (HDM), núcleo periventricular del hipotálamo (PV), núcleo paraventricular del hipotálamo (HPV), núcleo premamilar ventral (PMv), sustancia gris periacueductal (SGP), núcleo paraestrial (PS), núcleo supraquiasmático (SQ) y parte posteromedial del núcleo de la estria terminal (NESTpm) (Gu y Simerly, 1997; Simerly, 1998).

De entre todas estas conexiones, cabe destacar la que se establece entre el NESTpm y el AVPv. El NESTpm, que como se comentó previamente es mayor en los machos, envía proyecciones masivas al AVPv (Hutton y cols., 1998). Lo llamativo de esta conexión es que es diferente entre los sexos, puesto que en los machos se produce a partir del P9 un desarrollo masivo de las proyecciones del NESTpm al AVPv, mientras que en las hembras estas proyecciones son más débiles, siendo la densidad de los axones de esta conexión en el macho de 10 días, 20 veces mayor que en la hembra (Hutton y cols., 1998; Simerly, 1999). Este mismo resultado se encontró *in vitro*, demostrando que la exposición postnatal a testosterona induce una actividad quimiotrópica en el AVPv sobre el NESTpm, que resulta en un patrón sexodimorfo de conectividad. Estos datos

sugieren que los esteroides pueden influir tanto en la supervivencia neuronal, como en su conectividad y todo dentro de un mismo circuito (Hutton y cols., 1998; Ibanez y cols., 2001).

La población de neuronas dopaminérgicas en el AVPv es sexodimorfa, siendo de nuevo mayor el número de neuronas inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa (TH) en el AVPv de las hembras que en los machos (Murakami y Arai, 1989; Simerly y cols., 1997; Orikasa y cols., 2001). Esta diferencia es dependiente del receptor de estrógeno ER α , puesto que en ratones machos y hembras con este receptor mutado por *knock-out* (ERKO α), el número de células inmunorreactivas a la TH era similar al encontrado en hembras sin mutación, siendo estos valores hasta tres veces superiores a los hallados en machos sin mutación (Simerly y cols., 1997). El hecho de que en ratones macho con el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (*Tfm*) por mutación en el gen del receptor de andrógenos (*AR*), no existiese el mismo incremento en la población de neuronas dopaminérgicas, condujo a los autores a afirmar que es el receptor de estradiol alfa (ER α) y no el receptor de andrógenos (*AR*) el responsable del patrón masculino de menor número de neuronas dopaminérgicas en el AVPv. Estos datos indican que para el desarrollo del patrón normal masculino de esta población neuronal es necesaria la presencia de un ER α intacto (Simerly y cols., 1997, Fannon y cols., 2002). Sin embargo, dadas las características de la mutación provocada, no es posible delimitar el momento temporal en que este receptor adquiere protagonismo para este decremento en el macho, puesto que la mutación está presente desde el inicio del desarrollo (Simerly y cols., 1997). Cabe destacar que las hembras ERKO α poseían niveles de estradiol circulante en plasma 10 veces superior a las hembras sin mutación (Rissman y cols., 1997a), pudiendo haberse producido la actuación de este estradiol sobre el receptor ER β y proteger así a las células de la muerte neuronal (Simerly y cols., 1997). Existe además un patrón diferente entre sexos en cuanto a la expresión de ARNm del ER β , siendo mayor en las hembras la densidad y el número de células ER β positivas que en los machos, pudiendo aumentarse esta cantidad el P14 en los machos tras orquidectomizarlos neonatalmente (Orikasa y cols., 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que el número de células apoptóticas en el área preóptica del AVPv es mayor en machos y en hembras androgenizadas (Arai y cols.,

1994). Tratando a hembras con andrógenos perinatalmente se produce un decremento en el tamaño del AVPv (Murakami y Arai, 1989; Arai y cols., 1994). Estos datos vienen a confirmar que los andrógenos inducen la diferenciación sexual en el AVPv prolongando el período de muerte celular en el desarrollo de esta estructura (Arai y cols., 1994).

La mayoría de las neuronas del AVPv expresan genes que codifican receptores para estrógenos y progesteronas (Simerly, 1998). También hay neuronas que expresan receptores de glutamato subtipo NMDA (NMDAR1) y subtipo AMPA (GluR1, GluR2 y GluR3) (Gu y cols., 1999).

Otro de los efectos que produce la administración de estradiol sobre este núcleo tras ovariectomizar a ratas hembras es el incremento de la actividad de la proteína fosforilada *pCREB* (del inglés *cAMP response element-binding protein*), cuya duración es de hasta 4 horas posteriores a la administración (Gu y cols., 1996). Tratando previamente con Nafoxidine, un antagonista de estrógenos, este incremento del *pCREB* no se producía. La progesterona también, administrada de forma similar que el estradiol, provocaba primero un decremento y luego un incremento de la actividad de la *pCREB*, pero este incremento no duraba más de 2 horas (Gu y cols., 1996). Este resultado fue encontrado en otras regiones cerebrales, tales como el área preóptica y en el núcleo de la estria terminal, como comentamos previamente (Zhou y cols., 1996).

Otra de las regiones sexodimorfas en la dirección hembra > macho es el *locus coeruleus* (*LC*). Este núcleo es un grupo de neuronas situado en la protuberancia o puente, a lo largo del margen lateral del IV ventrículo y medial al núcleo mesencefálico del nervio trigémico (Snell, 1994). Envía proyecciones al BOA y al NEST y, a su vez, recibe aferencias del NEST y del HVM (Swanson y Hartman, 1975; Saper y cols., 1976; McLean y cols., 1989; Forray y cols., 2000). Este grupo de células es la fuente más importante de noradrenalina (NA) del sistema nervioso en el ser humano y la rata (McLean y cols., 1989; Ordway y cols., 1997; Callado y Stamford, 2000) y presenta dimorfismo puesto que el volumen y el número de neuronas de ratas Wistar es mayor en hembras que en machos (Guillamón y cols., 1988a; De Blas y cols., 1990; Luque y cols., 1992). En ratas Sprague-Dawley el *LC* dorsal posee un volumen mayor en el macho que

en la hembra (Babstock y cols., 1997). En seres humanos esta estructura es mayor en las mujeres, produciéndose variaciones en el número de neuronas del *LC* de ambos sexos asociados con la edad y con patologías tales como el Alzheimer (Zwieten y cols., 1994; Bush y cols., 1995; Manaye, y cols., 1995; Bus y cols., 1997; Ohm y cols., 1997).

Por otro lado, la cantidad de neuronas inmnoorreactivas a la dopamina β -hidroxilasa es mayor en las hembras (Luque y cols., 1992). En seres humanos, la cantidad de noradrenalina que sea sintetizada en estas neuronas, está asociada a diferentes patologías, tales como la ansiedad y la depresión. La estimulación eléctrica del *LC* en animales experimentales les induce un estado muy similar a la ansiedad (Stahl, 1998). En cuadros clínicos de depresión mayor, la proteína de membrana responsable de dar fin a la actuación de la NA en el espacio sináptico del *LC*, conocida como el transportador presináptico o bomba de recaptación del tipo receptor adrenérgico α_2 , está reducida en comparación con un grupo sin cuadro depresivo (Klimek y cols., 1997). Esta reducción puede deberse a un efecto de regulación a la baja de esta proteína transportadora por motivo de una disponibilidad insuficiente de este neurotransmisor en el espacio sináptico (Klimek y cols., 1997; Stahl, 1998). Este autorreceptor adrenérgico α_2 inhibe la liberación de NA en el *LC* (Callado y Stamford, 2000), estando situado en las dendritas (autorreceptor somatodendrítico α_2) o en la terminal sináptica (receptor α_2 terminal). Este autorreceptor α_2 es además objeto de terapias farmacológicas tanto por exceso (ansiedad) como por defecto (depresión) de liberación de NA (Stahl, 1998).

Tal y como apuntamos previamente, este núcleo es mayor en la hembra (Guillamón y cols., 1988a; De Blas y cols., 1990; Luque y cols., 1992). Además, esta diferencia se establece postnatalmente, ya que en un principio en el desarrollo en machos y hembras el crecimiento del volumen y número de neuronas del *LC* va al unísono, estableciéndose las diferencias en volumen el P90 y en número de neuronas el P60 (Pinos y cols., 2001). Sin embargo, esta diferencia puede revertirse en la hembra mediante orquidectomía postpuberal (90 días de edad), reduciéndose el número de neuronas hasta valores similares al macho, mientras que en el macho orquidectomizado, esta inversión no se produce (De Blas y cols., 1990). Asimismo, el tratamiento con PT a

hembras en el P1 produjo una significativa reducción del número de neuronas y volumen del *LC* (Guillamón y cols., 1988a).

Otra de las manipulaciones experimentales que se han practicado y que han conseguido invertir el patrón habitual de dimorfismo sexual en este núcleo, en ratas Wistar machos y hembras, ha sido la administración de diazepam (DZ) en diferentes momentos del desarrollo (Rodríguez-Zafra y cols., 1993). La inyección prenatal (E14-E21) en el macho de DZ produjo un incremento en el número de neuronas y en el volumen del *LC* adulto (a los 90 días), mientras que en las hembras, tanto el tratamiento prenatal como el postnatal (P0-P16) de DZ produjeron un decremento en los parámetros citados (Rodríguez-Zafra, 1993).

Las subunidades de receptor GABA_A mejor detectadas en los núcleos pontinos y nervios craneales en la médula, donde se encuentra el *LC*, fueron las $\alpha 1$ -, $\beta 2$ y $\gamma 2$ (Pirker y cols., 2000). La combinación de estas tres subunidades en un mismo receptor GABA_A es necesaria para crear un sitio de unión a las benzodiazepinas (McEwen, 1991a; Stahl, 1998; Rupprecht y Holsboer, 1999). Las BZD actuarían sobre el receptor GABA_A del *LC* como moduladores alostéricos positivos, esto es, incrementando y potenciando la conductancia al Cl⁻ a través del canal de cloro del receptor GABA_A tras unirse al sitio receptor para BZD que existe en el complejo GABA_A y en presencia del propio GABA (Stahl, 1998).

Antes de pasar a tratar el sistema del núcleo espinal bulbocavernoso (NEB), vamos a comentar otras diferencias entre sexos en estructuras cerebrales en la rata y el ser humano. Por ejemplo, la comisura anterior (CA) es diferente morfológicamente entre machos y hembras de ratas Long Evans, presentando en los machos un tamaño mayor que en las hembras, aunque el incremento que se produce entre los días P68 y P175 es mayor en la hembra (Noonan y cols., 1998). Las regiones supuestamente cognitivas de la rata, tales como el córtex, hipocampo y cuerpo calloso son sexodimorfos (Juraska, 1991). Diamond en 1987 demostró la existencia de un desarrollo opuesto y asimétrico para el grosor de la corteza cerebral de la rata (Diamond, 1987). Concretamente demostró que el córtex derecho en el macho era más delgado que el izquierdo a la edad

de 904 días, mientras que en la hembra, el córtex izquierdo era más delgado que el derecho desde la edad de 7 a 400 días. Ovariectomizando a las hembras el P0 se comprobó que a los 90 días, cambiaba su grosor propio por el del macho, siendo el derecho más delgado que el izquierdo (Diamond, 1987). Otras diferencias que este autor encontró se referían a la concentración en el córtex del receptor de estrógeno (en el macho concentrado mayoritariamente en el córtex izquierdo y en la hembra en el derecho) y al número de neuronas y glías en la corteza cerebral, teniendo el macho mayor concentración de éstos en el córtex del hemisferio derecho y la hembra en el izquierdo (Diamond, 1987). Teskey y su equipo encontraron en 1999 que en ratas Long Evans, tras estimularles eléctricamente el neocórtex frontal, las hembras presentaban un descenso en la densidad, longitud y ramificaciones de las espinas dendríticas basilares y apicales en esta región cortical a los 7 días de estimulación, mientras que los machos se producía el mismo descenso, pero a los 25 días de estimulación (Teskey y cols., 1999). Recientemente se ha podido demostrar que el grosor del córtex cerebral en ratones machos es mayor que en hembras y además, dependiente de los esteroides gonadales y no de la presencia o ausencia del gen *Sry* (Markham y cols., 2003).

En el ser humano también existen diferencias sexuales en estructuras cerebrales. Algunas han sido ya comentadas al ser integrantes del circuito del sistema vomeronasal, tales como el núcleo intersticial 3 del hipotálamo, NIHA-3 (Allen y cols., 1989; LeVay, 1991, LeVay, 1995), el núcleo sexodimorfo del área preóptica medial NSD-APM (Swaab and Fliers, 1985; Hofman y Swaab, 1989) y la parte central del núcleo de la estría terminal (NESTc) (Allen y Gorski 1990; Zhou y cols., 1995; Kruijver y cols., 2000; Chung y cols., 2002). En humanos también existen diferencias en cuanto al volumen del lóbulo parietal inferior (LPI), poseyendo los hombres mayor volumen en el hemisferio izquierdo que las mujeres (Frederikse y cols., 1999). También el *splenium* del cuerpo calloso es diferente morfológicamente entre sexos, siendo mayor en las mujeres medido *in vivo* mediante resonancia magnética (Allen y cols., 1991). La simetría cerebral, asimismo, difiere entre hombres y mujeres, ya que los hombres exhiben asimetrías más acentuadas y mayor dominancia del hemisferio derecho que las mujeres, que presentan patrones de lateralización más difusos (Wisniewski, 1998).

La mayoría de los estudios de dimorfismo sexual realizados en seres humanos han ido encaminados a buscar sustratos neurobiológicos explicativos para la orientación homosexual. Otro ejemplo de este interés es el trabajo realizado por Allen y Gorski en 1992 sobre la comisura anterior. Este conjunto de fibras es mayor en las mujeres (Allen y Gorski, 1991) y se comprobó que en hombres homosexuales era de mayor tamaño comparado tanto con hombres como con mujeres heterosexuales, en un 34% y un 18% respectivamente, sirviendo estas diferencias para explicar las distinciones relativas a habilidades cognitivas (verbales) que se han encontrado en hombres homosexuales (Allen y Gorski, 1992; Hampson, 1999).

Sin embargo, relacionar el tamaño de las estructuras cerebrales con la funcionalidad de éstas, aplicando el principio de masa de Jerison, según el cual, la masa de un tejido neuronal que controla una función determinada es apropiada con la cantidad de información necesaria para la ejecución de dicha función [Jerison, 1973; en (Jacobs y cols., 1990)], es, como poco, muy arriesgado. Ya en el siglo XIX, los anatomistas identificaban el menor peso del cerebro de la mujer y su mayor simetría anatómica como indicios de la inferioridad del intelecto femenino (De Vries y Boyle, 1998). En el SVN la mayoría de los núcleos de relevo que lo componen son mayores en el macho, sin ir necesariamente asociado a una mejor o más eficaz ejecución de las tareas relacionadas con estos núcleos.

Como veremos con posterioridad, las conductas sexualmente dimorfas en la rata responden a la activación de todo el circuito componente del SVN, interrelacionado e interconectado. Algunos autores incluso sostienen que las diferencias morfológicas sexuales en estructuras pertenecientes al SVN, como el APM, facilitan la expresión de conductas de manera similar en machos y hembras, en vez de hacerlas divergentes (De Vries y Boyle, 1998). Si en especies simples como la rata, no es aplicable la correlación tamaño de estructura cerebral-función, tanto menos lo será para el ser humano, en conductas tan sumamente complejas y tan dependientes de variables externas como la conducta sexual. El significado funcional de las diferencias sexuales morfológicas cerebrales para la conducta sexual de la rata macho han sido abordadas desde la perspectiva de que los parámetros mayores en éstos servirían para, en primer lugar, permitirles exhibir la conducta sexual y en segundo lugar, inhibir de manera tónica la expresión de conductas propias de la hembra tales como la que exhibe durante la

reproducción (lordosis) y la conducta maternal (Segovia y Guillamón, 1993). Sin embargo, es necesaria más investigación para determinar el significado funcional de los mayores parámetros morfológicos cerebrales en la hembra (Segovia y Guillamón, 1993; Del Cerro, 1998; Segovia y cols., 1999).

Otro aspecto en el que difieren los hombres y las mujeres es el relacionado con el sistema inmune (Klein, 2000; Martin, 2000). Los machos de muchas especies, desde los nematodos y los insectos hasta los peces, reptiles pájaros y mamíferos tienen una esperanza de vida más corta que las hembras (Olsen y Kovacs, 1996; Klein, 2000). Los hombres son más susceptibles que las mujeres en desarrollar infecciones tales como disentería, gonorrea, meningitis, neumonía, rabia, sífilis, tétano y ciertos tipos de cánceres (Goble y Konopka, 1973). Los linfocitos T, mediante las células T colaboradoras, supresoras o citotóxicas, tienen la función de ser efectores de procesos de inmunidad por células y la de regular a los linfocitos B plasmáticos y de memoria, cuya misión es la de producir anticuerpos. Las células T migran de las células primordiales de la médula ósea y sufren un proceso de destrucción masiva antes de convertirse en células T maduras. Alrededor del 90% de estos linfocitos son destruidos y gran parte de ellos por acción de los corticosteroides y los glucocorticoides, a través de la inducción de apoptosis (Eisen, 1983; Streit y Kincaid-Colton, 1996; Kirsh y cols., 1999). El timo, formado en su totalidad en el momento del nacimiento por células provenientes del hígado y de la médula ósea roja, experimenta igualmente una atrofia gradual por motivos naturales, o bien de forma rápida debida a una exposición a agentes estresantes (involución accidental) (Eisen, 1983).

Esta facilitación de la muerte celular en los linfocitos ha sido demostrada también para los esteroides gonadales. Los andrógenos aceleran la apoptosis del timo, ya que administrando PT a ratas macho castradas, el tamaño en el timo se redujo entre las 2 y las 4 horas de la administración (Olsen y cols., 1998). La exposición de células inmunes a 5α -DHT *in vitro* induce la fragmentación y la apoptosis del ADN de éstas, pero sólo con altas concentraciones de receptor de andrógeno (AR) (Chapman y cols., 1996). En ratones *Tfm* tratados con PT, no se observó el incremento mencionado de apoptosis (Olsen y cols., 1998). Los gatos (*Felis catus*) machos enfermos con el virus de inmunodeficiencia felina (VIF) muestran más apoptosis de linfocitos que las hembras (Hofmann-Lehmann y cols., 1998). Además en las gatas hembra con bajos niveles de

estradiol en plasma se dio más apoptosis de células inmunes que en las que tenían los niveles de estradiol más altos y castrando a machos no se produjo ninguna variación en la apoptosis inducida por el VIF (Hofmann-Lehmann y cols., 1998). Los andrógenos y estrógenos tienen una función en la regulación de la inmunidad y cómo responden las células inmunes a los esteroides gonadales se establece según la exposición temprana a éstos durante el desarrollo (Martin, 2000). En ratones macho *Tfm*, la cantidad de linfocitos del macho es similar a los hallados en la hembra sin mutación, superando ambos en 36 veces a la cantidad existente en el macho sin mutación (Olsen y Kovacs, 1989; Olsen y Kovacs, 1996; Olsen y cols., 1998).

1.3.2. Sistema del núcleo espinal bulbocavernoso (NEB)

El núcleo espinal bulbocavernoso (NEB) es un grupo discreto de motoneuronas espinales localizadas en el cuerno ventral medular del asta gris anterior situada entre el quinto y sexto segmento lumbar en la rata. Estas motoneuronas están inervando mediante sus fibras eferentes a dos músculos estriados perineales que son el *levator ani* (*LA*) y el bulbocavernoso (*BC*), así como el esfínter anal. El complejo *LA-BC* controla el reflejo de erección del pene del macho durante la conducta copulatoria, activándose rítmicamente durante la erección y eyaculación del macho (Bredlove y Arnold, 1981; Nordeen y cols., 1985; Christensen y cols., 1999).

Existe otro grupo de motoneuronas situadas en el mismo segmento lumbar que es el núcleo dorsolateral (NDL) que inerva al músculo isquicavernoso (*IC*) (Bredlove y Arnold, 1981; Tobet y Fox, 1992). En seres humanos el músculo del bulbocavernoso, inervado por el núcleo de Onuf (homólogo humano del NEB en la rata), se sitúa alrededor de la uretra con la función de proporcionar el fluido seminal durante la eyaculación y contraerse de manera voluntaria al final de la micción para vaciar totalmente la vejiga (Forger y Bredlove, 1986; Yang y Bradley 1999).

Las motoneuronas y las dianas musculares del núcleo espinal bulbocavernoso en roedores machos son muy sensibles a los andrógenos (Fishman y cols., 1990; Christensen y cols., 1999). Machos genéticos tratados prenatalmente (E11-E21) con

flutamida, un antiandrógeno y gonadectomizados al nacer, poseen menor número de neuronas en el NEB y el NDL, menor área somal y nuclear en el NEB y menor peso en los músculos perineales, mientras que a las hembras genéticas este mismo tratamiento no les produce ninguna variación (Breedlove y Arnold, 1983a; Ward, 1992). Tras castrar a ratas machos, se observa en el NEB de adultos un significativo descenso del tamaño neuronal (Breedlove y Arnold, 1981), así como un decremento de la longitud de las dendritas (Kurz y cols., 1986) y también una reducción del número y tamaño de las sinapsis sobre estas neuronas, siendo todas estas reversibles mediante la administración posterior de andrógenos (Matsumoto y cols., 1988; Tobin y Payne, 1991). Sin embargo, esta reversibilidad se restringe a un período del desarrollo concreto, antes de que se produzca la muerte de las células, puesto que una vez que se produce, no pueden ser rescatadas por los andrógenos (Christensen y cols., 1999). Administrando propionato de testosterona (pero no dihidrotestosterona ni estradiol) prenatalmente (última semana de gestación) o neonatalmente (días P1 a P5) a ratas hembra o a machos castrados se produce un incremento en el número de motoneuronas del NEB (Breedlove y cols., 1982; Breedlove y Arnold, 1983b; Rand y Breedlove, 1992).

La influencia de los andrógenos sobre esta estructura medular no se limita a la contribución de la supervivencia celular, también influye en el establecimiento de las conexiones sinápticas del NEB con el *LA*. Se quiso comprobar cuál de estos tratamientos, benzoato de estradiol (BE), o propionato de dihidrotestosterona (DHTP) o ambos (BE + DHTP), o propionato de testosterona (PT) o por último, vehículo (Veh), administrados a machos castrados en el P7 era capaz de inducir la pérdida de inervación en el desarrollo de músculos esqueléticos, mediante la eliminación sináptica neuromuscular. Se pudo comprobar que sólo el PT y la mezcla de DHTP + BE eran capaces de inducir esta pérdida (Jordan y cols., 1995).

Igualmente se ha podido comprobar en diferentes investigaciones que los andrógenos regulan la expresión genética de proteínas citoesqueléticas estructurales en el NEB, tales como la β -actina y β -tubulina (Matsumoto y cols., 1993; Matsumoto, y cols., 1994) pudiendo estar estas proteínas implicadas en el mecanismo molecular del mantenimiento de la morfología adulta del NEB del macho (Christensen y cols., 1999). En general, parece establecerse que estas proteínas actúan sólo sobre las motoneuronas

que inervan músculos esenciales para la conducta sexual del macho (Christensen y cols., 1999)

El NEB está presente también en hembras, pero en un tamaño 3 veces menor, ya que sólo poseen de esta estructura las motoneuronas que controlan el esfínter anal. De adultas no poseen el BC mientras que el *LA* es un delgado músculo que rodea el conducto anal (Breedlove y Arnold, 1981; Nelson, 1996; Christensen y cols., 1999). Si a ratas hembra se les administra perinatalmente estradiol, su NEB a la edad P10 es idéntico del que tendrían sin ningún tratamiento, pero si lo que se les administra es E más DHT, a esta edad poseen el mismo número de motoneuronas en el NEB que los machos sin tratar (Goldstein y Sengelaub, 1990). También las hembras experimentan un incremento del número de motoneuronas del NEB tras la administración de PT durante los primeros tres días postnatales (P1-P3) (Fishman y Breedlove, 1992).

Podrían establecerse dos periodos secuenciales en la formación del NEB en machos y hembras. En el período prenatal no existen diferencias entre los machos y las hembras en el número de neuronas del NEB, incrementando en ambos por igual. Del E18 al E20 el número de motoneuronas del NEB han aumentado similarmente en machos y hembras, pero en el E22, las hembras se mantienen y en los machos se produce un incremento (Christensen y cols., 1999). Posteriormente, en el período postnatal, la muerte celular hace decrecer las motoneuronas del NEB en las hembras un 70 % y en los machos en un 25%, estableciéndose las diferencias adultas a partir del P10 (Nordeen y cols., 1985; Tobet y Fox, 1992; Christensen y cols., 1999).

Para explicar esta diferencia entre sexos y teniendo en cuenta la relevancia que han demostrado tener los andrógenos en el desarrollo de esta estructura, se ha recurrido a la actuación de los andrógenos sobre el NEB en períodos críticos de muerte neuronal postnatal. Éstos actuarían en el macho protegiendo de esta muerte neuronal o promoviendo la supervivencia neuronal, permitiendo así que conserven un mayor número de neuronas hasta el estado adulto (Nordeen y cols., 1985; Fishman y Breedlove, 1992).

El ARNm del receptor de andrógenos se empieza a expresar el E12.5 en la embriogénesis del ratón. Durante el desarrollo de los genitales externos se detecta la

expresión del *AR* en el tubérculo genital de ambos sexos, en la prominencia genital, que posteriormente serán los labios mayores y en el escroto. En el macho se detecta también en los conductos mesonéfricos (Wolff), en el epidídimo, en la vesícula seminal, en los conductos deferentes y en los conductos eyaculatorios. Otros sitios donde el ARNm del *AR* está expresándose a partir del P10 son la glándula adrenal, el músculo *levator ani* y los testículos, aunque en este último lugar con menor intensidad (Jordan y cols., 1997; Crocoll y cols., 1998). En ratas macho adultas, se localiza la presencia del *AR* en las motoneuronas del núcleo espinal bulbocavernoso (NEB), del núcleo dorsolateral (NDL) y del núcleo retrodorsolateral (NRDL), siendo la presencia de *AR* más evidente en el NEB. En ratas macho gonadectomizadas y en ratas macho no tratadas pero portadoras de la mutación de insensibilidad a los andrógenos (*Tfm*) no se detectaron receptores de *AR* en ninguna de las motoneuronas de las regiones mencionadas (Freeman y cols., 1995). En estas ratas (*Tfm*), se ha comprobado que los tamaños neuronales de las motoneuronas del NEB en machos *Tfm* eran idénticos a los de las hembras sin mutación y ambos significativamente menores que los de los machos sin mutación. Esto sugiere que la testosterona efectúa su protección sobre las motoneuronas del macho en función de su posibilidad de actuación sobre los *AR* en el período crítico, no siendo efectiva la testosterona si actúa sobre unos receptores insensibles (Breedlove y Arnold, 1981; Freeman y col 1996; Watson y cols., 2001). En hembras *Tfm* mosaicos ($X_{Tfm}X$), esto es, en la mitad de sus células expresan el *AR* intacto (sin mutación) y en la otra mitad de sus células expresan el *AR* mutado (*Tfm*), se pudo comprobar que sólo las motoneuronas sin mutación respondían a los andrógenos incrementando el tamaño del soma en el NEB (Watson y cols., 2001) y disminuyendo la expresión del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP, del inglés *Calcitonin Gene-Related Petide*) (Monks y cols., 1999).

Otras variables que influyen en el tamaño de las motoneuronas del NEB son la edad y la experiencia sexual. Respecto a la primera, Matsumoto recientemente comprobó que el número y el tamaño de los contactos sinápticos de las motoneuronas del NEB disminuían con la edad en las ratas, probablemente debido a las oscilaciones descendentes de andrógenos circulantes (Matsumoto, 1998; Matsumoto, 2002). Por otro lado, Breedlove en 1997 demostró cómo la experiencia sexual adulta alteraba los parámetros de las motoneuronas del NEB. Castró a veinte machos Sprague-Dawley a la edad de 117 a 123 días y les implantó una cápsula de testosterona para que su ejecución

sexual no se deteriorase. Como resultado encontró que los diez machos que habían practicado la cópula poseían tamaños de los somas y los núcleos celulares en el NEB significativamente menores que los machos que no habían copulado (Breedlove, 1997).

1.3.3. Mecanismos explicativos de la diferenciación sexual.

Con lo expuesto hasta ahora, parece ponerse en evidencia que el dimorfismo sexual que existe en algunas estructuras del SVN donde el patrón que predomina es el de macho > hembra, se deben a la actuación del estradiol aromatizado de la testosterona, como es el caso del BOA (Pérez-Laso y cols., 1996), del NTOA (Collado y cols., 1990; Collado y cols., 1993), del NSD-APM (Döhler y cols., 1982; Döhler y cols., 1986; Davis y cols., 1996), de la Me (Mizukami y cols., 1983) y de la PMCo (Vinader-Caerols y cols., 1998). En otras estructuras del mismo patrón, aunque no se haya demostrado el efecto del estradiol mediante la aromatización, éste parece ser el más probable, como en el caso del NESTpm (Del Abril y cols., 1987; Guillamón y cols., 1988b) y del HVM (Dörner y Staudt, 1968). Otras estructuras, sin embargo, parecen ser sensibles al efecto de la testosterona sin aromatizar, como el caso del NEB y del NDL (Breedlove y Arnold, 1981; Breedlove y Arnold, 1983a; Kurz y cols., 1986; Matsumoto y cols., 1988; Fishman y cols., 1990; Tobin y Payne, 1991; Ward, 1992; Jordan y cols., 1995; Christensen y cols., 1999).

Una vez presentados estos datos que avalan y documentan la existencia de diferencias sexuales en el sistema nervioso de mamíferos, queda plantearse qué explicaciones han aportado los investigadores sobre estos hechos. Éstas han ido al son del pensamiento dominante de la época respecto a las posibilidades o imposibilidades de cambio de las células del sistema nervioso central. Por un lado y siguiendo la inercia del razonamiento de la determinación sexual genética, figuran los trabajos en los que se refleja que los esteroides no son los mediadores principales en las diferencias entre géneros, sino que lo son los genes. Fue Santiago Ramón y Cajal quien, haciendo referencia al crecimiento dendrítico en las células de Purkinje, ya sugirió que las posibles modificaciones que se produjeran sobre estas células, habían de llevarse a cabo sobre un esquema genómico previo (Torand-Allerand, 1986). El entorno histórico en el que esta afirmación se produjo seguía una línea de razonamiento, que asumía que, una

vez terminado el desarrollo cerebral, las fuentes de crecimiento y de generación de los axones y dendritas se paralizan, siendo las vías nerviosas de los cerebros adultos algo fijo, terminado, inmutable (citado en Bregado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000).

Esta concepción determinista sobre las células nerviosas se fue desvaneciendo progresivamente al encontrar evidencias de que sus características y su adaptabilidad, limitada pero considerable, eran incompatibles con esta creencia. A este cambio contribuyeron, por un lado, los hallazgos encontrados referentes a los ambientes enriquecidos, que promovían tanto en humanos como en rata el desarrollo exuberante de neuronas corticales y células gliales. Por otro lado, también la capacidad probada de ramificación colateral de neuronas tras una lesión, con el objeto de rescatar funciones perdidas. Y finalmente y relacionada con la anterior, el cerebro no dañado también es capaz de cambios estructurales y plásticos de especialización sensorial (McEwen, 2001). Estos hallazgos dieron pruebas de la plasticidad funcional del cerebro, en la que las hormonas circulantes en plasma juegan un importante papel.

Aunque si bien es cierto que la tendencia actual más fuerte para explicar la diferenciación y el desarrollo de las células neuronales es esta última comentada, existen algunos datos para los que la explicación del efecto hormonal no es eficaz y para los que se sigue recurriendo a la explicación determinista genética. Tal es el caso del trabajo de Reisert y Pilgrim de 1991, en el que demostraron que neuronas sexodimorfas en cuanto al patrón de secreción de dopamina, mantenían este dimorfismo en tejido embrionario *in vitro* y aisladas de cualquier influencia epigenética hormonal (Reisert y Pilgrim, 1991). Los autores sostienen que la posible explicación de este dimorfismo viene dada por la información genética que portan las células y que les induce a sobrevivir o no, pudiendo incidir en la actividad hormonal que les pueda influir para este fin (Pilgrim y Reisert, 1991; Arnold, 1996).

Existen ejemplos más recientes de este hecho, empleando animales manipulados genéticamente, en los que su sexo genético era independiente del sexo gonadal fenotípico. En estos casos, pudieron comprobar cómo las células neuronales provenientes de animales XX o XY diferían fenotípicamente, sugiriendo que la actuación inicial del cromosoma X o Y con los genes que estos conlleven, condiciona, de alguna manera, el desarrollo sexodimorfo de la neuronas (Carruth y cols., 2002; Xu y

cols., 2002). En otros estudios más específicos se manipuló el gen *Sry*, de manera que los grupos experimentales eran genéticamente XX y XY con ovarios y XX, XY con testículos, pudiendo aislar el efecto de gonadal del cromosómico. Entre otras variables dependientes registraron el dimorfismo sexual en estructuras neuroanatómicas como el *séptum*, el hipotálamo, la espina dorsal lumbar y el grosor del córtex y encontraron que en la mayoría de los parámetros sexualmente dimorfos registrados, lo determinante era el sexo gonadal, pero respecto al *séptum* lateral y a la densidad de fibras inmunorreactivas a la vasopresina en éste, el patrón genético XY, con o sin testículos, inclinaba la balanza sexodimorfa, teniendo los machos genéticos más fibras VS-ir en el *séptum* que los grupos XX, con o sin testículos (De Vries y cols., 2002; Markham y cols., 2003). Este resultado hizo sugerir a los autores que los genes sexuales, independientemente de la corriente hormonal predominante que exista debido a las gónadas con las que cuente el organismo, contribuyen a la diferenciación sexual del cerebro.

La mayoría de los autores en la actualidad, sostienen, o han sostenido, una postura integrativa y ecléctica en este punto, considerando que la expresión genética está regulando diferencialmente el cerebro, influyendo en su desarrollo y muy probablemente siendo alterada por el ambiente hormonal durante el transcurso de la vida (McEwen y Finch, 1992).

En nuestra aproximación a los mecanismos explicativos de la diferenciación sexual del sistema nervioso, nos centraremos en el efecto de los esteroides gonadales, concretamente del estradiol, sobre las células neuronales en épocas determinadas del desarrollo. Para tratar este tema seguiremos un criterio ordenado y secuencial en el tiempo, según la actuación de las enzimas y esteroides que tomen parte en este proceso. Por ello, empezaremos abordando la enzima Aromatasa (Aro) y la proteína α feto-proteína (AFP), por ser ambas responsables de la cantidad de estradiol (E_2) que haya en plasma durante la diferenciación sexual en los períodos críticos. Posteriormente trataremos la actuación de este esteroide sobre su receptor (*ER*), para abordar los cambios genómicos y no genómicos que la actuación del E_2 ejerce sobre el crecimiento neurítico y la arborización, así como sobre la neuroprotección celular en la apoptosis y la oxidación. Por último, abordaremos la actuación no genómica de neuroesteroides sobre los receptores NMDA y $GABA_A$.

1.3.4.1. Hipótesis de la Aromatasa.

La enzima Aromatasa (Aro) es la responsable de la catalización de la testosterona en 17β -estradiol (E_2), de la androstenediona en estrona y de la 16α -hidroxiandrostenediona en estriol (Naftolin y cols., 1982; Naftolin, 1994). Es el producto del gen *CYP19* que forma parte de la superfamilia de citocromo P-450, situado en humanos en el cromosoma 15. La Aro es un complejo enzimático de recaptación de membrana, localizada en el retículo endoplasmático y en la membrana nuclear del interior de la célula (Naftolin y cols., 1982; Naftolin, 1994; Roselli y Resko, 1997; Negri-Cesi y cols., 2000; Lephart y cols., 2001). Su actividad está presente en varias regiones cerebrales durante el desarrollo, especialmente en el área preóptica del hipotálamo y en el sistema límbico (McEwen, 1978; Balthazart y Ball, 1998; Negri-Cesi y cols., 2000; Lephart y cols., 2001) y ampliamente en el NEST (Roselli y cols., 1996; Roselli y Resko, 1997; Negri-Cesi y cols., 2001). Otros lugares donde esta enzima se expresa son las gónadas, la placenta, la próstata y el tejido adiposo (Lephart y cols., 2001), así como en los astrocitos (Zwain y Yen, 1999; Negri-Cesi y cols., 2000) y en el hipotálamo tras lesión por ácido kaínico, con la consecuente facilitación de la reparación de la zona dañada mediante la actuación del E_2 (García-Segura y cols., 1998a).

En su expresión y actividad, esta enzima es diferente entre sexos, existiendo niveles enzimáticos mayores en el macho que en la hembra (Abdelgadir y cols., 1994; Beyer y cols., 1994; Roselli y cols., 1996; Lauber y cols., 1997; Roselli y Resko, 1997; Roselli y Klosterman, 1998; Negri-Cesi y cols., 2001). Durante la época embrionaria temprana sin embargo, este dimorfismo aún no está presente. Concretamente, en el E13 se encontraron neuronas inmunorreactiva a la Aromatasa (Aro-ir) en machos y hembras en el área preóptica (APM), el día E15 en el NEST, el día E16 en el núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM) y el E19 en el núcleo arcuato (Arc), empezando a diferenciarse sexualmente a partir de los últimos días de la gestación (Tsuru y cols., 1994). Entre los días embrionario E18 y E20, la actividad del ARNm del gen de la enzima Aro es especialmente abundante en las regiones cerebrales del NPM, del NSD-APM, del NEST y del Me de los machos (Lauber y Lichtensteiger, 1994; Lauber y cols., 1997). Postnatalmente el ARNm del gen de la Aro en ambos sexos experimenta una elevación en el P2 (Raab y cols., 1995), momento en el que su presencia en el NEST y el NSD-

APM es significativamente mayor en los machos (Lauber y cols., 1997), para descender en su expresión progresivamente, hasta el estadio adulto, estando prácticamente ausente ya el P20 (Raab y cols., 1995).

Existen diferentes propuestas explicativas respecto a esta diferencia sexual enzimática. Se sugirió que los andrógenos eran los reguladores principales de esta enzima y ya que existe una diferencia en la concentración de éstos entre sexos, la actividad de la Aro sería igualmente diferencial. La concentración de andrógenos en plasma es mayor en los machos que en hembras, por actuación de las células de Leydig y corteza suprarrenal. En éstas los andrógenos liberados por la glándulas adrenales, la placenta y la teca interna del folículo maduro en los ovarios no alcanzan los niveles en plasma que existe en los machos. Esta diferente cantidad de andrógenos entre los sexos incidiría en una mayor actividad de la Aromatasa en los machos (Roselli y Resko, 1984). Se demostró que la testosterona estimulaba la actividad de la Aromatasa en el área preóptica del hipotálamo en un 133%, mientras que la DHT lo hacía en un 92% y la administración del antiandrógeno flutamida reducía la actividad de la Aromatasa en la misma zona en un 42% (Roselli y Resko, 1984). La castración a machos, igualmente, reducía la expresión del ARNm del gen de la enzima Aro y su actividad de la enzima Aromatasa, siendo restituidas tras la administración de testosterona o dihidrotestosterona o de E₂ junto con DHT, pero no de E₂ sólo (Roselli y Resko, 1984; Roselli, 1991a; Abdelgadir y cols., 1994; Roselli y cols., 1997).

Por otro lado, en ratones machos que poseen una mutación en el receptor de andrógenos que provoca su insensibilidad (*Tfm*), se encontró que la conversión de la enzima Aro total en el hipotálamo y el córtex cerebral fue 1.5 veces menor que en los machos sin mutación, igualándose al grupo de hembras sin mutación (Rosenfeld y cols., 1977). Los tratamientos reconstitutivos de andrógenos, no pudieron incrementar la actividad de la Aro en estos machos *Tfm* en las regiones del área preóptica del hipotálamo y de la amígdala, lugares en los que la actividad de la enzima Aro estaba de un 40% a un 70% disminuida (Roselli y cols., 1987), poniendo en evidencia que la concentración de receptores de andrógenos funcionales correlaciona con la inducción de la actividad de la enzima Aro (Roselli y Resko, 1993).

En cultivos cerebrales del hipotálamo, aislados de cualquier influencia hormonal, se pudo comprobar que igualmente existía esta diferencia entre machos y hembras en cuanto a la actividad de la enzima Aro y a la expresión de células inmunorreactivas a ésta (Aro-ir) (Beyer y cols., 1994; Negri-Cesi y cols., 2001). Aunque el nivel de actividad de la enzima Aro era similar en machos y hembras, lo que difería era la mayor proporción de neuronas masculinas que expresaban Aromatasa (Beyer y cols., 1994). En regiones cerebrales como el APM, el NEST, el área preóptica periventricular (APOPV), el hipotálamo anterior (HA) y el HVM, la actividad diferencial de la Aromatasa en machos y hembras se debe a una diferente velocidad máxima de actuación de la enzima con la testosterona (Roselli y cols., 1996). Se observó que esta diferencia se ponía de manifiesto en las regiones APM, HA e HVM de machos sólo tras administrar determinadas dosis de testosterona, en un rango de 0.3 a 35 ng/ml, mientras que, en el NEST y en el APOPV, cualquiera de las dosis fisiológicas de testosterona administrada provocaba mayor actividad y velocidad máxima de actuación de la Aro (Roselli y cols., 1996; Roselli y Resko, 1997). Esta diferencia de respuesta ante dosis diferentes de testosterona de la enzima Aromatasa ha hecho sugerir a los autores que existe dimorfismo sexual en cuanto al mecanismo de inducción enzimático influido, por un lado por la cantidad de testosterona que haya circulante en plasma y por otro lado, por la región cerebral concreta sobre la que ésta actúe (Roselli y cols., 1996; Roselli y Resko, 1997).

Las propuestas más recientes señalan que la testosterona y/o sus metabolitos actúan en el cerebro en desarrollo para determinar esta capacidad de aromatización específica de cada sexo (Roselli y Klosterman, 1998). También se ha sugerido una posible actuación sinérgica entre los andrógenos y los estrógenos, pudiendo adherirse los esteroides a los *AR* y *ER* de las mismas células y regular así, mediante actuación intracrina, la síntesis de Aromatasa (Roselli, 1991b; Balthazart y Ball, 1998). Otras propuestas interesantes proponen que, puesto que las fibras inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa (TH-ir) se encuentran cercanas de las células Aro-ir, la dopamina (DA) o la noradrenalina (NA) pudieran estar estimulando la síntesis de Aromatasa a través de los receptores D1 en el caso de la DA, que incrementarían la actividad del AMPc y ésta a su vez a la *pCREB*, o disminuyéndola tratándose de la NA a través del autorreceptor α_2 , que por el contrario, inhibiría el AMPc (Balthazart y Ball, 1998). Este

último supuesto alude a posibles mecanismos trans-sinápticos de regulación de la enzima Aromatasa.

La Aromatasa metaboliza la testosterona a estradiol y ésta última se ha propuesto en repetidas ocasiones como la responsable de la existencia de dimorfismo sexuales en el SNC. Como comentamos con anterioridad, en el SVN el BOA (Pérez-Laso y cols., 1996), el NTOA (Collado y cols., 1990; Collado y cols., 1993), el NSD-APM (Döhler y cols., 1982; Döhler y cols., 1986; Davis y cols., 1996), la Me (Mizukami y cols., 1983) y la PMCo (Vinader-Caerols y cols., 1998) parecen deber su patrón sexualmente dimorfo a la actividad del estradiol. Junto con estos datos, la hipótesis de la aromatización se sustenta en estos principios. En primer lugar, los andrógenos aromatizables mimetizan el efecto masculinizante que la testosterona efectúa sobre regiones del SNC, en ratas hembras tratadas neonatalmente e impiden la desmasculinización en ratas machos castrados neonatalmente. En segundo lugar, un producto intermedio en la metabolización de la testosterona a estradiol, la 19-hidroxitestosterona, es más efectiva en la masculinización de hembras que la testosterona, al aplicarlas ambas neonatalmente. En tercer lugar, el estradiol ha demostrado ser eficaz en la masculinización de las regiones cerebrales como las anteriormente comentadas, mientras que los antiestrógenos y los inhibidores de la enzima Aromatasa en hembras neonatas impiden este efecto masculinizador. Y por último, el estradiol ha demostrado ser efectivo en la estimulación del crecimiento dendrítico y en la protección de muerte neuronal, mientras que por el contrario, los andrógenos no aromatizables, como la DHT, han fallado en este propósito (Negri-Cesi y cols., 2000).

Ratones *knock-out* para el gen responsable de la aromatización, el *cyp19*, poseen un anormal desarrollo gonadal. Las hembras ArKO poseen ovarios con numerosos folículos y células granulosas, pero no tienen cuerpo lúteo y el desarrollo de las glándulas mamarias es muy tardío (Ficher y cols., 1998). Los machos ArKO son inicialmente fértiles, pero van volviéndose infértiles progresivamente, pues su espermatogénesis se ve mermada (Robertson y cols., 1999). Lo interesante de estos animales es que debido a su mutación, sus niveles de testosterona en plasma son elevados, así como los niveles de las hormonas LH y FSH (Ficher y cols., 1998). Por

otro lado, animales machos, que han sido inyectados con inhibidor de Aromatasa los días E21 y E22, presentan, en estado adulto, un desarrollo gonadal normal respecto a los testículos, la vesícula seminal, la próstata ventral y el músculo *levator ani*, pero sólo el 50 % de éstos pueden copular eficazmente, puesto que igualmente en éstos animales, la espermatogenia experimenta un detrimento. De hecho, el 25% de estos machos, siendo adultos, no despliegan conducta sexual de monta, sino de lordosis, tras administrarles benzoato de estradiol (Gerardin y Pereira, 2002).

En seres humanos también se han registrado casos de mutación en este gen *CYP19*. Dos hermanos gemelos hombre y mujer presentaban la misma mutación en el *CYP19*, en la región altamente conservada, concretamente por una sustitución en el par de base 1123 (C → G), originando una cisteína en vez de una arginina en la posición 375 (R375C) (Morishima y cols., 1995). Durante la gestación, la madre de estos chicos presentó signos de progresiva virilización (acné severo, hirsutismo, clitoromegalia y su voz se volvió más grave), que remitieron por completo tras el parto. Como consecuencia de la mutación en los gemelos se produjo, en la chica portadora, una masculinización genital parecida a la que presentan las hembras de hiena, debido a una alta concentración en plasma de testosterona, androstenediona y 17-hidroxiprogesterona, unido a niveles bajos de estradiol. En el chico, los niveles hormonales en plasma eran elevados para la testosterona, la 5- α -dihidrotestosterona y la androstenediona, mientras que el estradiol y la estrona eran bajos. Éste presentaba asimismo una estatura excesivamente elevada (de 204 cm), osteoporosis e hiperinsulemia. En ambos sexos sus preferencias sexuales estaban de acuerdo con su sexo genético (Morishima y cols., 1995; Bulun y cols., 1996; Grumbach y Auchus, 1999).

Hay otros casos publicados en la literatura sobre humanos con déficit de esta enzima, como una niña japonesa con genitales externos masculinizados y una chica de 18 años con amenorrea y pseudohermafroditismo (Bulun, 1996). Estos ejemplos aclaran cuán importantes son los estrógenos para el desarrollo correcto masculino, en cuanto a la concentración de gonadotropinas y esteroides en plasma y para el desarrollo femenino, en cuanto a la posibilidad de evitar alteraciones morfológicas perdurables por efecto del

déficit de estradiol y el exceso de andrógenos (Grumbach y Auchus, 1999; Roshira y cols., 2001).

Si la hipótesis de la Aromatasa es correcta y tras la aromatización de la testosterona circulante en plasma a estradiol, las regiones cerebrales cuyas neuronas contienen receptores para estrógeno pasan a tener valores morfológicos mayores, entonces ¿por qué en la hembra, en la que las hormonas más abundantes son los estrógenos, no existen estos valores morfológicos mayores, a no ser que sean inyectadas con testosterona o con E₂ de manera exógena? Para responder a esta pregunta, se han planteado diversas posibilidades. La primera de ellas hace referencia a lo que ya se ha comentado con anterioridad, en relación a la diferente cantidad de testosterona en plasma en los machos y en las hembras en momentos tempranos del desarrollo, que incidiría en una mayor actividad aromática en ellos (Rhoda y cols., 1984; Roselli y Resko, 1984; Roselli, 1991a; Abdelgadir y cols., 1994; Roselli y cols., 1997). En general, las aproximaciones explicativas comentadas con anterioridad, que tratan de dar luz sobre la diferencia en la actividad de la enzima Aromatasa entre machos y hembras, podrían explicar por qué en la hembra la cantidad de estradiol aromatizado es menor que en el macho (Beyer y cols., 1994; Roselli y cols., 1998; Roselli y Resko, 1997; Balthazart y Ball, 1998; Roselli y Klosterman, 1998; Negri-Cesi y cols., 2000; Negri-Cesi y cols., 2001).

Por otro lado, se ha recurrido a la existencia de la α -feto-proteína (AFP) para explicar esta paradoja en la hipótesis de la aromatización. La AFP es una proteína fetal presente en la mayoría de los vertebrados, incluido los humanos, que es sintetizada en grandes cantidades por las células endodermales del saco vitelino, por el hígado fetal y por el tracto intestinal, distribuyéndose a través de la circulación por el líquido cefalorraquídeo, el espacio extracelular y el líquido amniótico (Torand-Allerand, 1984; Torand-Allerand, 1986; Nishi y cols., 1991). Pertenece a la familia multigénica que comprende a los genes que codifican la albumina, la alfa-albumina y la proteína recaptadora de la vitamina D (Gabant y cols., 2002). En ratones, su presencia es muy elevada desde el E7 al P25 (Torand-Allerand, 1984) y su capacidad de recaptación del estradiol es muy alta (Nichi y cols., 1991), pero posteriormente esta cantidad desciende

en el plasma de las hembras (McEwen, 1978). La actuación que se le supone a la AFP es un efecto protector sobre los conductos reproductores y el cerebro del feto, recaptando o secuestrando el exceso de estradiol circulante del estrógeno maternal e impidiendo la actuación sobre sus receptores, mediante la retardación del E₂ en los ER por acción de masa (McEwen, 1978; Nishi y cols., 1991). También se le ha atribuido la capacidad de inhibir el crecimiento de tumores estrógeno-dependientes (Jacobson y cols., 1990). La AFP transporta los esteroides inactivándolos biológicamente, pero no los elimina, pudiendo ser una reserva de estradiol para el organismo en algún otro momento del desarrollo. De hecho, su existencia en el interior de las células del SNC, así como la facilitación que parece ejercer en el transporte de los estrógenos hacia el interior de éstas, han hecho poner en cuestión este efecto protector que a la AFP se le ha sugerido (Döhler y cols., 1984; Torand-Allerand, 1984). En recientes investigaciones se ha puesto de manifiesto que la AFP no es esencial para el desarrollo embriológico, pero que es importante para la fertilidad femenina, puesto que en ratas que poseen una mutación en el gen responsable de esta proteína, los machos adultos son fértiles y viables reproductivamente, mientras que las hembras no lo son, probablemente por una disfunción en el eje hipotálamo-hipófisis, que les provoca una anovulación (Gabant y cols., 2002).

En seres humanos cantidades excesivamente altas de AFP en el líquido amniótico durante la gestación son indicativos de presencia de síndrome de down en el feto (Sher y Shohat, 1997). Otros casos anormales en cuanto a la cantidad de AFP/hCR en el líquido amniótico han sido relacionado con casos de trisomía 2 y 16 (Wolstenholme y cols., 2001).

En general y teniendo en cuenta lo previamente expuesto, parece establecerse que la cantidad de esteroides en plasma potencialmente utilizable en los momentos críticos de diferenciación sexual dependen del ritmo de la biosíntesis de éstos, del ritmo al que los esteroides sean biológicamente inactivados por mecanismos catabólicos y/o por la tasa de metabolización en el hígado y por último, de la afinidad con la que los esteroides se unan a las proteínas transportadoras en plasma (Nelson, 1996).

1.3.4.2. Mecanismos genómicos y no genómicos.

Las hormonas esteroideas, provenientes de las glándulas suprarrenales y de las gónadas, en su concepción, clásica o genómica, actúan a través de los receptores específicos de hormonas. Una vez alcanzada su célula diana, el esteroide se disocia de la proteína transportadora y se difunde a través de la membrana para unirse al receptor específico volviéndolo activo, formando el complejo hormona-receptor. Este complejo es transportado hasta el núcleo de la célula donde actuará, si es agonista, causando cambios conformacionales en el receptor volviéndolo activo, para que interactúe con los factores generales de transcripción, coactivadores o correpresores, que estimularán o inhibirán la transcripción del ARNm específico, regulando con ello la expresión genética de los elementos de respuesta hormonal (ERH). Si por el contrario es un antagonista, causará cambios conformacionales diferentes en el receptor que interferirán con la unión del ligando al ADN y prevendrán la posterior transcripción (Kawata y cols., 2001). Como resultado de esto, se verá afectada la traducción de proteínas o enzimas que la célula posteriormente origine (Falkenstein y cols., 2000a). Las características de este proceso genómico de actuación del esteroide son su prolongación en el tiempo, tardando en su efecto de horas a días, la posibilidad de ser modificado a través de antagonistas o agonistas específicos del esteroide que posean afinidad por el receptor de esteroide y por último la durabilidad de los cambios que ocasiona (Falkenstein y cols., 2000a).

Sin embargo, existen actuaciones de los esteroides que poseen otras características completamente diferentes de las expuestas para la actuación genómica, que vendrían a ser los efectos activacionales o no genómicos (Phoenix y cols., 1959; Young, y cols., 1964; Beyer y Feder, 1987). Las características de esta actuación del esteroide son que sus efectos se ponen de manifiesto de manera muy rápida (de segundos a minutos), que no pueden ser modificados o alterados mediante antagonistas o agonistas que inhiban o activen respectivamente la transcripción que el esteroide en cuestión llevase a cabo y por último, que por lo general origina cambios transitorios y efímeros (Falkenstein y cols., 2000a). Esta actuación y sus características discordantes respecto a los clásicos efectos conocidos genómicos han sido conocidas desde hace tiempo. Ya en 1942, Hans Selye fue el primero en describir un efecto rápido anestésico de la progesterona, tras su administración intraperitoneal a ratas [Selye, 1942; en (Mellon,

1994; Falkenstein y cols., 2000a; Schmidt y cols., 2000)]. En 1963, Spach y Streeten también encontraron un efecto cardiovascular agudo en hombres tras administrarles aldosterona. En éstos, la resistencia vascular periférica y la presión sanguínea aumentaron, mientras que el ritmo cardíaco disminuyó, tan sólo 5 minutos después de administrarles la aldosterona [Spach y Streeten, 1963; en (Mellon, 1994; Falkenstein y cols., 2000a; Schmidt y cols., 2000)]. Por último, otro ejemplo de actuación no genómica fue el llevado a cabo por Pietras y Szego en 1975, con el que demostraron una actuación rápida del estrógeno sobre el fluido de Ca^{2+} en las células endometriales [Pietras y Szego, 1975; en (Falkenstein y cols., 2000a; Schmidt y cols., 2000)]. A pesar de estos ejemplos, el efecto no genómico de los esteroides no ha sido tenido en cuenta como objeto de investigación hasta hace poco tiempo (Mellon, 1994; Falkenstein y cols., 2000a).

Recientemente, en el "Primer Congreso Internacional sobre respuestas rápidas de las hormonas esteroides" celebrado en Mannheim, Alemania en 1998, se propuso y discutió una clasificación de estos efectos atendiendo a dos ejes explicativos. Por un lado a la acción directa o indirecta del esteroide sobre el receptor, según su actuación requiera o no la participación de otros agonistas para su efecto y por otro lado a la actuación específica o no específica del esteroide sobre el receptor, dependiendo de la existencia o no de un receptor determinado para el esteroide. Según esta clasificación y cruzando las posibilidades, existirían seis formas diferentes de actuar de los esteroides de manera no genómica, para las que existen ejemplos en la investigación de todas menos de dos. Este esquema, denominado clasificación de Mannheim de la actuación no genómica de los esteroides, es de enorme valor clarificador (Falkenstein y cols., 2000a; Falkenstein y cols., 2000b).

1.3.4.3. Mecanismos de actuación del estradiol.

Pasaremos ahora a tratar la actuación del estradiol a nivel genómico y no genómico. Para ello empezaremos abordando las características y particularidades del receptor de estrógenos. El *ER* fue identificado y clonado por primera vez en dos laboratorios diferentes, en el año 1986. Hasta el año 1995 se había pensado que existía

un único *ER*, pero en ese año se puso de manifiesto la existencia de un segundo *ER*, el *ERβ*, con lo cual al *ER* previo a este descubrimiento se le llamó *ERα*. El *ER* ha sido considerado, tras un análisis filogenético de todos los receptores de esteroides, el primer receptor de esteroides que apareció en vertebrados mamíferos, seguido por el receptor de progesterona, evolucionando el resto de receptores de esteroides a partir de éste (Thornton, 2001). Este dato nos deja constancia de la importancia que este receptor ha tenido en la evolución. Actualmente se conoce la existencia de dos subtipos de receptores *ERβ*, el *ERβ1* y el *ERβ2*, diferenciándose ambos en que el *ERβ1* puede actuar con el coactivador *SRC-1* (del inglés *Steroid Receptor Coactivator-1*), mientras que el *ERβ2* no lo hace (McEwen y Alves, 1999; McEwen 1999b). Los receptores *ERα* y *ERβ* pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, cuyos miembros comparten una estructura común, que son tres dominios funcionales independientes. Estos dominios son la terminal NH₂ o dominio A/B, el dominio de unión del ADN (*DBD*) o dominio C y el dominio de unión del ligando (*LBD*) o dominio D/E/F (Beato, 1989; Carson-Jurica y cols., 1990; Truss y Beato, 1993; Paech y cols., 1997; Aranda y Pascual, 2001; Pike y cols., 2001; Olefsky, 2001).

La actuación del estradiol sobre este receptor es a grandes rasgos y sintetizada, la que se expuso previamente para la acción genómica de los esteroides. Sin embargo, en sucesivas investigaciones, se ha ido vislumbrando un mecanismo de actuación más y más complejo, que aún no es conocido en su totalidad, en el que intervienen coactivadores y correpresores que modifican la intensidad o efectividad de la respuesta del ligando, así como otros compuestos químicos endógenos que modifican en último término, el producto final de la actuación del estradiol sobre el *ERα* o *ERβ* (Klinge, 2001; Lackey y cols., 2001). De todos estos compuestos nos interesa destacar un coactivador del receptor nuclear, el *SRC-1*, que fue de los primeros en ser identificado y de ahí su acrónimo, que pertenece a la familia de coactivadores p160/SRC (Di Croce y cols., 1999; Freedman, 1999; Aranda y Pascual, 2001; Nilsson y cols., 2001). Esta proteína interactúa con el *ER*, preferentemente con el *ERα*, sólo en presencia del estrógeno o de algún agonista y su actuación va dirigida a estimular la actividad transcripcional del estradiol (Aranda y Pascual, 2001; Lackey y cols., 2001; Nilsson y cols., 2001).

Auger y su equipo realizaron una investigación en el año 2000, en la que manipularon la eficacia del coactivador *SRC-1* y registraron el efecto de esta manipulación sobre el dimorfismo sexual del NSD-APM y sobre conductas sexuales masculinas y femeninas de ratas (Auger y cols., 2000). Administraron el antisentido del *SRC-1* o una sustancia similar al antisentido pero sin la función de éste, en el hipotálamo de ratas hembras el día del nacimiento y un día después. A su vez, el P1 les inyectaron PT en dosis suficientes conocidas para la masculinización. A la edad de 13 días, se procedió a analizarles el volumen del NSD-APM. Por otro lado, machos y hembras que fueron administrados con el antisentido del *SRC-1* de idéntica manera que las hembras destinadas al examen morfológico, fueron inyectados el P1 con PT las hembras y con vehículo los machos y a los 45 días de edad, todos fueron gonadectomizados. Semanas después de esta intervención, se suministró a ambos grupos las hormonas necesarias para que exhibiesen conducta sexual femenina (BE y progesterona) o cápsulas de testosterona para que exhibiesen la conducta sexual masculina.

El resultado de esto fue que el volumen del NSD-APM de las hembras tratadas con el antisentido fue significativamente menor, en un 46 %, que las hembras tratadas con la sustancia control, dejando entrever que el antisentido del *SRC-1* no había dejado que el estradiol, aromatizado de la testosterona administrada el P1, efectuase la conocida masculinización del NSD-APM en las hembras, al no poder actuar eficazmente sobre el receptor nuclear $ER\alpha$. Respecto a las conductas sexuales, se pudo registrar que los machos y las hembras tratadas con el antisentido y con las hormonas necesarias, desplegaron conducta sexual femenina de manera prácticamente idéntica, mientras que no sucedió lo mismo con la conducta sexual masculina, en la que los machos tratados con el antisentido fueron más eficaces que las hembras tratadas con lo mismo (Auger y cols., 2000). Estos resultados sugieren la existencia de otros muchos eventos celulares responsables de la diferenciación sexual morfológica y conductual y, por supuesto, ayudan a volver más complejo el fenómeno y a hacerlo más fascinante como objeto de futuras investigaciones.

Los receptores para estrógenos $ER\alpha$ y $ER\beta$ tienen diferentes lugares de expresión. En humanos el $ER\alpha$ se encuentra en el las glándulas mamarias, en el útero, el cérvix y la

vagina, mientras que el *ERβ*, de expresión más limitada, se encuentra en el ovario, la próstata, los testículos, pulmones, hipotálamo y timo (Hall y cols., 2001). En la rata, antes de que se hiciera la distinción entre los receptores *ERα* y *ERβ*, la distribución del *ER* se localizaba en el córtex cerebral en desarrollo, en el hipotálamo, en los núcleos medial y cortical de la amígdala, en la médula espinal, en el área preóptica medial, en el núcleo ventromedial, en el núcleo del *séptum* lateral y en el núcleo de la estría terminal (Simerly y cols., 1990; Ciocca y Roig, 1995).

En investigaciones más recientes, se pudo especificar que el ARNm del *ERα* se expresa mayoritariamente en el epidídimo, los testículos, la pituitaria, útero, riñón y glándulas adrenales y mamarias y de una manera más leve en el tálamo e hipotálamo y la corteza cerebral. Respecto al ARNm del *ERβ* en la rata, la expresión más marcada se detecta en el ovario y la próstata y de manera más discreta en los testículos, el útero, en la vejiga y en los pulmones, siendo prácticamente indetectable en la pituitaria, el epidídimo, el timo, varias regiones del cerebro y en la médula espinal (Kuiper y cols., 1997; Kawata y cols., 2001). Cabe destacar que existen fluctuaciones de expresión de ARNm del *ER* en la rata hembra que responden a los diferentes momentos de ciclicidad estral (Shughrue y cols., 1992; Haywood y cols., 1999).

En las regiones cerebrales donde existen la presencia de *ER* se pudo detectar, a través de técnicas de inmunorreactividad de tinción fluorescente, que tanto el *ERα* como el *ERβ* están presentes en el núcleo de la célula y no en los nucleolos, constatando así su identidad, ya conocida, de receptores nucleares (Kawata y cols., 2001). La afinidad que ambos receptores presentan por los diferentes estrógenos que existen difieren, tanto para los fisiológicos como para los sintéticos, dejando entrever un abanico de actuación más amplio para los estrógenos sobre sus receptores (Kuiper y cols., 1997).

En investigaciones con animales *knock-out* para los dos subtipos de receptores de estradiol, se ha podido comprobar que los animales *knock-out* para el *Era* (AERKO), son infértiles ambos sexos, aunque expresan sin alteración el gen del otro receptor *ER*, el *Erβ*. Estos animales, tanto machos como hembras, presentan alteraciones endocrinas, al poseer elevados niveles de estradiol, de testosterona y de LH (Rissman y cols., 1997a; Couse y Korach, 1999). Por otro lado, en los animales con el *Erβ* mutado (BERKO), los machos son infértiles y las hembras subfértiles (tienen camadas muy reducidas) aunque

éstas tienen niveles normales de estradiol en plasma (Couse y Korach, 1999). Curiosamente, tanto machos como hembras con esta mutación, muestran severas anomalías en la morfología cerebral a los dos meses de edad, consistente en un déficit del número de neuronas en el córtex somatosensorial y una excesiva proliferación de células gliales astrocíticas en el sistema límbico, pero no en el córtex (Wang y cols., 2001).

Una vez planteada las características de la actuación genómica del estradiol, así como las características de su receptor, pasaremos a exponer la actuación no genómica del estradiol. Existen evidencias experimentales que apuntan que el estrógeno pudiera estar actuando de esta manera, al unirse a algún receptor de membrana en las neuronas para estimular la actuación de señales intracelulares de segundos mensajeros, tales como el AMPc o el IP₃. Esta unión afectaría indirectamente a la transcripción de otros genes (McEwen y Alves, 1999; McEwen, 1999b; Küppers y cols., 2001; Behl, 2002). Si la actuación la realiza a través del segundo mensajero AMPc, el proceso sería a grandes rasgos el siguiente: tras la reconfiguración de la proteína G por actuación de una hormona sobre el receptor de membrana, la adenilciclase, activada por este cambio, movilizará al AMPc para que active las proteinkinasa A (PKA), que a su vez incrementará la actividad de la *pCREB* (del inglés *cAMP response element-binding protein*) (McEwen y Alves, 1999; McEwen, 1999b; Küppers y cols., 2001; Behl, 2002). Como comentamos con anterioridad, administrando estradiol a hembras ovariectomizadas, se registraba un incremento de la actividad de la proteína fosforilada *pCREB* en el NEST, en una duración de hasta 15 minutos seguidos a la administración (Zhou y cols., 1996). En el AVPV y el área preóptica también pudo encontrarse este resultado (Gu y cols., 1996; Zhou y cols., 1996).

La *CREB* es una proteína que está implicada en el control transcripcional de muchos genes, interactuando sinérgicamente con el coactivador de receptor nuclear ya comentado *SRC-1* (Smith y cols., 1996). La forma activa de esta proteína es la que ha sido fosforilada (*pCREB*) (Moore y cols., 1996) y su actuación también se dirige hacia otras funciones del organismo, tales como la excitación celular nerviosa, los ritmos circadianos, del desarrollo del SNC, la proliferación de la pituitaria y la formación de memoria a largo plazo (Silva y cols., 1998; Glazewski y cols., 1999; Walton y cols., 1999). Esta proteína tiene una función activa en la diferenciación sexual, puesto que la

exposición de estradiol a neuronas hipotálamicas *in vitro* provocó por un lado un incremento en la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas y simultáneamente un incremento en la expresión de la proteína *pCREB* (Murphy y Segal, 1997). Algunos autores han afirmado que los estrógenos favorecen o estimulan los mecanismos de neuroplasticidad sináptica y crecimiento a través de la cascada *AMPC-PKA-CREB*, participando en la supervivencia celular e incrementando la resistencia de la apoptosis neuronal *in vitro* (Meyer y cols., 1993; Gu y Moss, 1996; Walton y cols., 1999; Bergado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000; Küppers y cols., 2001; Behl, 2002).

Una vez planteados los efectos genómicos y no genómicos del estradiol, pasaremos a comentar los datos existentes en la literatura que apuntan a los efectos proliferativos o protectores del estradiol. La actuación del estradiol que media la proliferación, crecimiento dendrítico o protección de las neuronas han sido probados repetidas veces en la literatura. Uno de los primeros ejemplos, al que se ha acudido de manera recurrente, por lo espectacular de sus resultados, es el trabajo de Torand-Allerand de 1980 (Torand-Allerand, 1984; Torand-Allerand, 1986). En éste se pudo comprobar cómo en secciones *in vitro* del APM de animales embrionarios de 22 días de vida, la administración de E_2 o de testosterona provocaba un crecimiento exuberante de la arborización dendrítica, mientras que, si lo suministrado eran anticuerpos del E_2 , este efecto se veían anulado (Torand-Allerand, 1984; Torand-Allerand, 1986). Aunque en estos primeros resultados, la autora interpretó que el efecto producido por el E_2 era genómico, dada la posibilidad de manipulación del resultado a través del *ER*, en sucesivas investigaciones la misma autora y su equipo han especificado que el efecto del estradiol sobre su receptor puede ser de dos maneras. Por un lado, de manera directa actuando sobre el *ER*, que regularía la transcripción para alterar los genes relacionados con el crecimiento y el citoesqueleto (Turner y cols., 1994), o por otro lado, de manera indirecta, a través de mecanismos autocrinos o paracrinos que afectasen a sustancias neurotróficas y a sus receptores, tales como el factor de crecimiento nervioso (*NGF*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*), o las neurotrofinas 3 ó 3/4 (*NT-3*, *NT-3/4*) y a sus receptores *trkA*, *trkB* y *trkC*, respectivamente (Miranda y cols., 1993; Torand-Allerand, 1996a; Torand-Allerand, 1996b).

Los autores proponen que, en esta segunda manera de actuación indirecta, el estradiol actuaría sobre las neurotrofinas para activarlas y ambas sustancias

interactuarían sinérgicamente de múltiples maneras, posiblemente redundantes, con el resultado de la diferenciación y la supervivencia neuronal. Esta actuación indirecta además puede llevarse a cabo a través de mecanismos genómicos como no genómicos de manera tan relacionadas, que aislar sus efectos sobre uno u otro es prácticamente imposible (Miranda y cols., 1993; Torand-Alleran, 1996a; Torand-Allerand, 1996b).

El efecto proliferativo del estradiol ha sido demostrado en más ocasiones. En secciones del hipocampo de ratas hembras se observó que según la variación del ciclo de estro, la densidad de las espinas dendríticas del hipocampo aumentaban o disminuían. Esto condujo a pensar que era el estradiol el que estaba provocando este efecto y para demostrarlo, se administró estradiol a hembras adultas tras ovariectomizarlas. Tras esta manipulación, se pudo comprobar un aumento en la densidad de las espinas dendríticas, así como un aumento de las terminales presinápticas y de las sinapsis que en ellas pudiera producirse (Breedlove y Jordan, 2001). Sin embargo, este efecto proliferativo del estradiol parece limitarse a la proliferación dendrítica y no a la neurogénesis. En secciones del córtex en desarrollo de ratas el E14, se demostró que ni la testosterona ni el estradiol afectaban a la neurogénesis, al no modificar el número de células positivas para la BrdU. No obstante, los autores apuntan la posibilidad de que ambos esteroides pudieran estar actuando a través de la regulación de la muerte o supervivencia neuronal (Zhang y cols., 2000), aunque en otra investigación se ha cuestionado esta actuación del estradiol sobre la apoptosis en la corteza cerebral (Harms y cols., 2001).

Existen evidencias de que los estrógenos incrementan la expresión de proteínas antiapoptóticas en cultivos del hipocampo de ratas de 16 a 18 días embrionario (Pike, 1999). Los genes productores de estas proteínas, los *bcl-2* y *bcl-x_L*, ambos pertenecientes a la familia Bcl de genes, son protooncogenes reguladores de la apoptosis neuronal, estando el primero de ellos ampliamente distribuido por el SNC durante el desarrollo embrionario y declinando con la edad (Sastry y Rao, 2000). La proteína de este gen también está implicada en la maduración embrionaria de neuronas sensitivas (Middleton y cols., 1998). El estradiol regula la expresión de este gen antiapoptótico *bcl-2* y esta afirmación puede llevarse a cabo al haberse observado una variación en la expresión de neuronas inmunorreactivas a este gen, dependiendo del momento del ciclo estral en el que se encontraban las ratas hembras adultas, sobre las que se realizó la investigación (García-Segura y cols., 1998b). Pero existen más evidencias de esta mediación. El 17 β

estradiol incrementa la actividad del gen *bcl-2* en el hipocampo y el *séptum*, no encontrándose este incremento en cultivos del córtex. Este efecto de incremento de actividad del *bcl-2*, además, pudo bloquearse usando antagonistas de estrógenos, conduciendo a los autores a afirmar que la acción se lleva a cabo a nivel genómico (McEwen y Alves, 1999b; Harms y cols., 2001). La función diferencial del estradiol en el hipocampo, el *séptum* y córtex se justifica, según los autores, en la mayor expresión del receptor ER α que existe en el hipocampo y el *séptum*, que no en la corteza, pudiendo prevenir el estradiol la muerte apoptótica, no la necrótica, al actuar sobre este receptor, dependiendo en su eficacia, de la densidad de ER α que exista en la zona en cuestión (Harms y cols., 2001).

Otro efecto que se le atribuye al estradiol es el antioxidante, a nivel no genómico. El estradiol tiene propiedades antioxidantes y supresoras del deterioro oxidativo que en las neuronas induce a la muerte. Esta capacidad puede llevarse a cabo tanto a través del ER α como del ER β (García-Segura y cols., 2001). El 17 β estradiol y su isómero 17 α estradiol pueden prevenir la acumulación oxidativa de peróxido intracelular que conduce degeneración en neuronas hipocampales (Behl y cols., 1997), pero es necesaria unas concentraciones suprafisiológicas de E₂ para que este efecto se pueda llevar a cabo (Behl y cols., 1997; García-Segura y cols., 2001). Este hecho, junto con lo cuestionado de su replicabilidad *in vivo*, reducen las posibilidades terapéuticas del estradiol para este propósito.

1.3.4.4. Receptores NMDA y GABA_A.

Por último, trataremos la actuación del estradiol sobre el receptor de canal iónico regulado por ligandos, el NMDA, así como la actuación de los neuroesteroides progestacionales sobre el receptor GABA_A.

El receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) es un subtipo de receptor de glutamato que está unido a un canal iónico controlado por ligando, de transmisión rápida excitatoria de calcio (Ca²⁺) (Stahl, 1998). Se ha sugerido que la actuación no genómica del estradiol pudiera llevarse a cabo a través de este receptor (Murphy y Segal, 1997).

Los moduladores alostéricos positivos que actuarían en presencia de glutamato, para los que existe un lugar específico en el receptor NMDA son la glicina, las poliamidas y el magnesio y como modulador alostérico inhibidor, la fenciclidina (Stahl, 1998). El estradiol actuaría sobre este receptor como modulador alostérico negativo (Rupprecht y Holsboer, 1999), regulando la entrada en exceso de Ca^{2+} en la célula por excesiva apertura del canal que pudiera ser neurotóxica y provocar excitotoxicidad, acabando así con las neuronas (Franklin y Jonson, 1992; Stahl, 1998; Bading, 2000 Lephart y cols., 2001; Behl, 2002). De hecho, existen evidencias de que el estradiol actúa a través del receptor NMDA, provocando un aumento del tamaño de los somas y las dendritas de las células piramidales del hipocampo (Gazzaley y cols., 1996; Murphy y Segal, 1997; Woolley y cols., 1997).

Por último comentaremos la actuación no genómica de los neuroesteroides sobre el receptor GABA_A y su posible incidencia en la diferenciación sexual.

El receptor ionotrópico GABA_A posee cinco regiones trans-membranarias y está asociado a un canal de cloro (Cl^-). Como se comentó previamente, para que pueda actuar como modulador alostérico positivo las benzodiazepinas sobre él, es necesario que posea las tres subunidades α , β y γ (McEwen, 1991a; Stahl, 1998; Rupprecht y Holsboer, 1999). En el NEST las subunidades que se detectan con más intensidad son la $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$ (Pirker y cols., 2000). Según lo expuesto previamente, la aplicación a ratas de benzodiazepinas (BDZ) y de picrotoxina (PTX) en determinados momentos del desarrollo, provocaba cambios en la dirección del dimorfismo sexual del LC y del BOA (Segovia y cols., 1991; Rodríguez-Zafra, 1993; Pérez-Laso y cols., 1994; Segovia y cols., 1996). La actuación de los agonistas que modulan positivamente el canal de Cl^- (BDZ) afectan al grupo sexual que poseen parámetros morfológicos mayores, produciendo un decremento en éstos, mientras que los antagonistas tienen el efecto contrario, incrementando los parámetros menores (Segovia y cols; 1991; Segovia y cols., 1996).

Otro ejemplo de este efecto sería el que se produce sobre el NSD-APM, en el que la administración a machos de muscimol, un agonista de GABA, provocaba una

reducción en el volumen de esta estructura hasta igualarlos a las hembras, sin afectar a las hembras tratadas con lo mismo (Bach y cols., 1992). Se ha podido comprobar que el muscimol en machos provoca un incremento de la proteína *pCREB* en las regiones cerebrales del hipotálamo y el hipocampo, mientras que el mismo agonista en las hembras lo que provoca es una reducción de esta proteína *pCREB* en las mismas regiones cerebrales (Auger y cols., 2001). La función que desempeña el receptor $GABA_A$ en el proceso de la diferenciación sexual cerebral se revela cada vez más importante y relevante (McCarthy y cols., 1997; Auger y cols., 2001; Perrot-Sinal y cols., 2001; McCarthy y cols., 2002; Perrot-Sinal y cols., 2003).

La manipulación de la permeabilidad de este receptor puede llevarse a cabo con esteroides derivados de la progesterona y de la deoxicorticosterona (Majewska y cols., 1986; Poletti y cols., 1998a; Poletti y cols., 1998b; Lephart y cols., 2001). Puesto que estos esteroides son sintetizados en el cerebro, se les conoce como neuroesteroides. Este término fue acuñado por Etienne Baulieu y Paul Rober en 1987, para hacer referencia a la pregnenolona, 20α -OH-pregnenolona y progesterona sintetizadas en el cerebro. Esta definición en la actualidad se ha ampliado a todos los esteroides que se producen en el sistema nervioso central y periférico (Mellon, 1994) concretamente en las células gliales, en los astrocitos y en varios tipos de neuronas (Schumacher y cols., 1996; Plassart-Shiess y Baulieu, 2001). Estos neuroesteroides actúan sobre el receptor $GABA_A$ como moduladores alostéricos positivos en un sitio cercano a donde lo hacen los barbitúricos y las BZD, incrementando la apertura del canal de Cl^- en presencia de GABA (McEwen, 1991a; Rupprecht, 1996; Baulieu, 1998) y probablemente provocando el mismo efecto que éstos en la diferenciación sexual.

Durante el proceso de diferenciación sexual se asume que la cantidad de neuronas, así como otros parámetros morfológicos, son en un principio similar en ambos sexos. Para que la diferencia se ponga de manifiesto, han de actuar una serie de mecanismos sobre las neuronas supernumerarias en principio, de manera que un sexo pueda conservar en mayor medida que el otro la abundante cantidad de neuronas originales (Segovia y Guillamón, 1993; Segovia y cols., 1999).

Como hemos podido comprobar, los mecanismos encargados de este propósito, lejos de ser sencillos o simples, son complejos y redundantes. La explicación integradora, que en la actualidad se adopta, es una actuación sinérgica de todos los mecanismos, genómicos y no genómicos, estableciéndose una conversación cruzada o *cross-talk*, cuyo lenguaje preciso o lógica estamos aún muy lejos de poder abordar en su totalidad (figura 1.6.). Existen ejemplos en la literatura en los que se pone de manifiesto que la actuación de membrana del estrógeno sirve de amplificador para la actuación genómica, al administrar en dos pulsos temporales consecutivos estradiol (Vasudevan y cols., 2001). Como apuntaba Torand-Allerand, la actuación indirecta del estradiol que afecta a los factores neurotróficos puede llevarse a cabo tanto a través de mecanismos genómicos como no genómicos de manera tan relacionadas, que aislar sus efectos sobre uno u otro es prácticamente imposible (Miranda y cols., 1993; Torand-Allerand, 1996a; Torand-Allerand, 1996b). Por otro lado, la proteína fosforilada *pCREB*, en principio relacionada con la actuación no genómica, está presente cuando lo manipulado es la apertura del canal de Cl^- del receptor GABA_A (Auger y cols., 2001) e igualmente interactúa sinérgicamente con el coactivador del receptor nuclear *SRC-1* (Smith y cols., 1996), no existiendo en ninguno de los dos casos la ruta convencional del AMPc que se pensaba era necesaria para esta proteína, a la que debe su nombre (*cAMP response element-binding protein*).

Por lo tanto, el mecanismo último que provoca la diferenciación sexual en las neuronas es una actuación sinérgica y en cooperación de todos estos eventos celulares comentados, genómicos y no genómicos en una conversación cruzada (Segovia y cols., 1999), de la que sólo conocemos algunas palabras sueltas, puesto que lo intrincado y redundante del proceso hace prácticamente irrealizable la posibilidad de esclarecer la conversación completa.

y precociales. Por un lado, en las especies altriciales como las ratas, conejos, ratones, hámsteres, cerdos, gatos y perros las crías son inmaduras, esto es, incapaces de autotermorregularse, ciegas, sordas y con un escaso control motor. Por ello los cuidados tempranos de la madre son cruciales para la supervivencia de la camada. Además, las madres de estas especies suelen ser mucho más agresivas contra los intrusos que intenten acercarse a sus crías, aunque no las reconocen individualmente, pues suelen tener una gran cantidad de crías, lo que asegura su supervivencia. Por otro lado, las especies precociales, que están principalmente representadas por los ungulados (ovejas, caballos, antílopes, etc.) se caracterizan por ser animales que viven en grandes manadas que están continuamente en movimiento, siendo por ello decisivo para la supervivencia de las crías que estén relativamente maduras al nacer para poder moverse por sí mismas. Las madres en este caso son esenciales para el rápido lamido y secado de sus recién nacidos evitando así su muerte por hipotermia. El número de individuos por camada en estas especies suele ser reducido, pudiendo reconocer las madres, en este caso, a sus propias crías e impedir que se pierdan o alejen (Nelson, 1996; Kendrick y cols., 1997; Del Cerro, 1998).

En las especies altriciales, entre las que se encuentra la rata, el despliegue maternal podría definirse como un conjunto de conductas estereotipadas ordenadas secuencialmente en el tiempo y tendentes a desaparecer una vez completado el desarrollo de las crías. Entre estas conductas está la construcción y mantenimiento del nido para alojar a las crías, el acicalamiento de las crías, la estimulación anogenital, el acarreo de las crías hasta el nido si están dispersas y el amamantamiento (Rosenblatt, 1967; Numan, 1994a). Estas conductas están presentes aproximadamente durante las tres primeras semanas de vida de las crías, disminuyendo en su intensidad y frecuencia paulatinamente.

Algunos autores han diferenciado estas conductas según dos ejes explicativos. Por un lado estarían las conductas de inicio del cuidado maternal, que se desencadenarían mediante las señales distantes de las crías (sonidos u olores), como son las conductas de contacto y acicalamiento de las crías así como el lamido anogenital (Denenberg, 1999; Stern y Lonstein, 2001). Posteriormente el contacto perioral de las crías al ser amamantadas, estimularía en la madre el mantenimiento de las conductas maternas ya iniciadas y a su vez la adquisición, por otro lado, de conductas más quiescentes como la postura de amamantamiento. A su vez, todas estas conductas

concatenadas y bidireccionales madre-crías se pueden dividir por un lado en conductas motoras que preceden al amamantamiento, como son el acicalamiento de las crías, el lamido anogenital, el traslado de las crías al nido y en general, aquellas que implican una conducta activa dirigida hacia las crías y por otro lado en conductas quiescentes, como el amamantamiento, que implican menos participación motora de la madre. Estos autores, atendiendo a esta clasificación disyuntiva, proponen la existencia de circuitos cerebrales necesariamente diferentes para cada una de estas conductas y consideran la conducta maternal como una categoría conductual motivada no unitaria, sino compuesta por varios elementos con diferentes funciones que se ven modificados por variables distintas (Stern y Lonstein, 2001).

La privación de las crías de este contacto maternal postnatal tiene como consecuencia una serie de alteraciones en su desarrollo que se pondrán de manifiesto en la etapa adulta. Por ejemplo, el alejamiento de las crías de la madre durante unas horas en los días postnatales llevará consigo en la etapa adulta de las crías un incremento en la ansiedad, agresión y miedo ante situaciones novedosas (Caldji y cols., 1998; Boccia y Pedersen, 2001), una alteración en la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Ladd y cols., 1996) y un deterioro de la ejecución maternal de las crías hembra adultas (Boccia y Pedersen, 2001; Lovic y cols., 2001).

De entre estas conductas, una de las más estudiadas ha sido la estimulación anogenital, que es llevada a cabo por la madre en respuesta a los olores feromónicos que emana la región anogenital de las crías, con el propósito de contribuir al desarrollo de las funciones de micción y defecación de las crías. Su ejecución además supone un ahorro de líquido así como una restauración de diferentes sustancias salinas en el plasma sanguíneo de la madre (Moore y Chadwick-Dias, 1986). Para manipular la frecuencia con la que esta conducta era llevada a cabo, se alteró el olfato de la madre mediante sulfato de zinc periférico y/o se le administró a la madre una dieta rica en sales, los cuales condujeron a una disminución de la frecuencia de lamido anogenital por parte de la madre (Moore y Power, 1992). Como resultado de esta privación en las crías, una vez adultas presentaron machos y hembras mayor ansiedad en test de campo abierto (Moore y Power, 1992), un 11% menos de motoneuronas en el núcleo espinal bulbocavernoso (NEB) de los machos (Moore y cols., 1992) y un deterioro en la conducta sexual masculina adulta (Moore, 1984; Kelly y cols., 1999).

Este despliegue secuenciado y ordenado temporalmente es iniciado y mantenido por la relación bidireccional que se establece entre la madre y las crías en la etapa postnatal (Denenberg, 1999; Stern y Lonstein, 2001). Sin embargo, durante años se ha estado investigando las posibles variables que causan en la madre esta manifestación de conducta maternal de manera tan precisa, exacta y determinada. Tres serían las aproximaciones explicativas que, aunque no excluyentes entre sí, si rechazan una cuarta posibilidad interpretativa, que es la del aprendizaje de esta conducta en estado adulto. Las explicaciones serían por un lado una determinación genética, que conduciría a la hembra a desplegar esta conducta de alguna manera impresa, por otro lado, una influencia hormonal diferencial en la hembra durante las etapas claves para el cuidado maternal de sus crías y finalmente y relacionado con la anterior, un entramado neuronal, sobre el que las hormonas pueden estar actuando, que opere activando o inhibiendo determinadas conductas encaminadas al cuidado de la camada.

La primera de estas explicaciones, la aproximación genética es, sin embargo, la más reciente. Existen trabajos en los que se ha intentado poner de manifiesto la función que determinados genes desempeñan en la conducta maternal. Reisert y su equipo recientemente pudieron comprobar que en ratones XX hembras, $X^{Sry}X$ machos (transgénicos al *Sry*) y XY machos, existía una relación ordenada en cuanto a la eficacia en el acarreo de las crías, estando los machos $X^{Sry}X$ en una posición intermedia entre los más eficaces en el acarreo, los XX hembras, y entre los menos eficaces en el acarreo, los XY machos (Reisert y cols., 2002). Los autores concluyen que la presencia del gen *Sry* borra parcialmente, pero no elimina, la motivación hacia la conducta maternal propia de las hembras de ratón (Reisert y cols., 2002).

Otros trabajos que relacionan la conducta maternal y la genética se enmarcan dentro de una explicación evolutiva más amplia, que es la de la impronta genética. Esta viene a decir que la máxima darwinista de la selección natural y la supervivencia del más fuerte puede aplicarse de igual manera a los alelos transmitidos por el padre y por la madre, estableciéndose un conflicto de intereses entre ellos. Esta teoría se sustenta en que el éxito evolutivo de los machos y las hembras depende de distintas variables, de manera que los alelos paternos tenderían a interesarse en que sus crías prolonguen al máximo los cuidados maternos y extraigan el máximo de recursos de la madre para la

supervivencia óptima de la camada, relacionándose por ejemplo con la activación de la conducta del amamantamiento, mientras que los alelos maternos se interesarían principalmente por iniciar la siguiente gestación y tratarían de silenciar a los alelos paternos, por ejemplo activando la saciedad (Goos y Silverman, 2001). Creando animales quimera, se pudo comprobar que las células androgenéticas (provenientes sólo de genes paternos) se localizaban en el cerebro en regiones tales como el hipotálamo, el cerebro mediobasal, el núcleo septal, el Núcleo de la Estria Terminal y el Área Preóptica Medial, estructuras relacionadas con la adquisición por parte de las crías de recursos vitales de su madre durante la gestación y lactancia, mientras que las células partenogénicas (provenientes sólo de genes maternos) se localizan en el córtex y en el estriado, no coincidiendo nunca con las células androgenéticas (Goos y Silverman, 2001; Keverne, 2001). La teoría de la impronta genética está siendo ampliamente investigada en la actualidad (Haig, 1997; Haig, 1999; Hurst y Randerson, 1999; Iwasa y Pomiankowski, 1999; Spencer y cols., 1998; Isles y Wilkinson, 2000; Alonso y Schuck-Paim, 2002).

A propósito de esta teoría, se estudió las repercusiones en conducta maternal de los genes *Mest* y *Peg3*, ambos alelos paternos. Respecto al primero de los genes, el *Mest*, cuando se anulaba experimentalmente su expresión en la madre se pudo observar un déficit en la conducta maternal hacia sus crías, al no atenderlas, fallar en el amamantamiento y no practicar la placentofagia. Puesto que la hembra con este gen anulado se cruzó con un macho portador de una mutación en el mismo gen, la camada poseía sólo el gen *Mest* de su padre, pero éste podía ser el alelo mutado o el intacto. Las crías portadoras del alelo paterno *Mest* mutado no provocaron los cuidados maternos en hembras vírgenes al ser expuestas a ellas y este déficit derivó en que tuvieran un peso menor que los animales que heredaron el alelo no mutado del padre, que sí provocaron el cuidado maternal en las hembras vírgenes (Keverne, 2001). Con el otro gen, el *Peg3*, siguiendo el mismo protocolo experimental que con el gen anterior, se pudo comprobar que la madre con el gen anulado tenía unas camadas muy escasas además de llevar a cabo de manera defectuosa las conductas de acarreo, construcción del nido y amamantamiento. A hembras vírgenes o múltiparas en diestro se les expuso las crías portadoras de esta mutación y efectuaron con ellas las conductas maternas de acarreo y de construcción del nido más lentamente y menos eficazmente. En la madre con el gen *Peg3* anulado se observó también que poseía significativamente menos neuronas

liberadoras de oxitocina, provocando por ello un déficit en el proceso de amamantamiento (Li y cols., 1999).

Las mutaciones en estos genes pueden estar alterando entre otras funciones, la liberación de las hormonas implicadas en la conducta maternal en la madre, como sucede con el *Peg3* y la oxitocina. Por ello pasaremos a comentar la siguiente aproximación explicativa al rápido desencadenamiento de la conducta maternal en la hembra, que es la hormonal.

El ciclo reproductivo de los mamíferos consta de diferentes fases que son la gestación, el parto y la lactancia, llevando cada uno de ellos asociado una serie de cambios endocrinos (Russell y cols., 2001). Durante la gestación las principales fuentes de secreción hormonal en la rata son la hipófisis anterior, los ovarios y la unidad fetoplacentaria (Moltz, 1974). Las hormonas que tradicionalmente se había considerado importantes en la conducta maternal son la progesterona, el estradiol y la prolactina. La primera de ellas, la progesterona, experimenta un ascenso durante el proceso de gestación, alcanzando su valor máximo (130ng/ml) entre los días 14 y 16 para posteriormente descender bruscamente en el día 19, manteniéndose baja hasta el día 23 del parto (Moltz, 1974; Numan, 1994a; Nelson, 1995; Wagner y cols., 1998; Russell y cols., 2001). Este descenso es el que anticipa y prepara al organismo de la rata para el parto, al ser un antecedente necesario de las contracciones uterinas asociadas al alumbramiento (Numan, 1994a). Por otro lado, el estrógeno suele mantenerse a niveles bajos durante los primeros 16 días de gestación (200ng/ml) para comenzar un ascenso a partir de este día hasta alcanzar su máximo nivel (630 ng/ml) el día del parto (Moltz, 1974; Numan, 1994a; Nelson, 1995; Russell y cols., 2001). Por último, la prolactina, se mantiene relativamente estable durante toda la gestación, disminuyendo durante la segunda mitad de la gestación (.10ng/ml) y aumentando ligeramente poco tiempo antes del parto (.65ng/ml) (Moltz, 1974; Numan, 1994a; Nelson, 1995; Russell y cols., 2001). Administrando prolactina a hembras nulíparas se pudo acelerar el inicio de la conducta maternal en éstas al exponerlas a crías (Bridges, 1990). Por otro lado, ha podido demostrarse que ratones hembra heterocigóticas para una mutación en el gen del receptor de prolactina exhibían una conducta maternal deficitaria, en cuanto a construcción del nido y al acarreo, no pudiéndose atribuir este déficit a un fallo en la olfacción (Lucas y cos., 1998).

Otra hormona, a la que apenas se le ha prestado atención en cuanto a su relevancia en la conducta maternal, es la testosterona, a pesar de haberse encontrado elevados niveles de ésta durante la gestación y la lactancia en conejos, ratones, jerbos y en primates (González-Mariscal y Poindron, 2002). En ratas la frecuencia de conducta paternal en machos alojados con crías correlacionaba positivamente con sus niveles de testosterona en plasma (Reburn y Wynne-Edwards, 1999; González-Mariscal y Poindron, 2002).

Otra de las sustancias endógenas que varían durante la gestación y el parto es el neuropéptido oxitocina. A este neuropéptido se le han atribuido básicamente dos funciones prioritarias en la madre preñada, que son las contracciones uterinas durante el parto y la liberación de leche durante la lactancia (Insel y cols., 2001). Sin embargo en recientes investigaciones no sólo se ha cuestionado su participación determinante en estas dos funciones (Nishimori y cols., 1996; Gimpl y Fahrenholz, 2001), sino que se le han atribuido otras relacionadas con vínculos afectivos entre madre y crías de establecimiento temprano, o de efecto amnésico de la experiencia aversiva del parto (Insel, 1992; Insel y cols., 2001).

Por último abordaremos el entramado neuronal de la conducta maternal. El tamaño de algunas estructuras del SVN en mamíferos correlaciona con la actividad parental. Por ejemplo, las ramificaciones dendríticas del núcleo supraóptico se incrementan en ratas hembra nulíparas después de la exposición a crías extrañas y de que efectúen cuidados maternales hacia ellas (Hatton y cols., 1992). Por otro lado, en la especie de ratón *Peromyscus californicus*, conocido como ratón de California, una especie de roedores monógamos biparentales, se observa un decremento de aproximadamente el 20 % en el número de neuronas del Área preóptica Medial (APM) de los machos tras experimentar la paternidad y hacerse cargo de su camada comparados con los machos no padres ni cuidadores (Alberts y Gubernick, 1990).

Existen muchos ejemplos en la literatura que ponen de manifiesto que la olfacción de feromonas a través del SVN está mediando el despliegue de la conducta maternal en las ratas (Fleming y cols., 1979; Wysocki, 1979; Fleming y cols., 1980; Saito, 1986; Halpern, 1987; Wysocki, 1987; Wysocki y Meredith, 1987; Menella y Moltz, 1988a;

Menella y Moltz, 1988b; Numan, 1988; Saito y cols., 1988; Meredith, 1991; Del Cerro, 1998). Por ello se sabe de la implicación de los núcleos de relevo del SVN en las proyecciones primarias (BOA) y secundarias (NEST, NTOA y amígdala) para que la conducta maternal se lleve a cabo (Segovia y Guillamón, 1993; Guillamón y Segovia, 1996; Del Cerro, 1998). Respecto a las proyecciones terciarias del SVN, algunos autores proponen que lo relevante para que la conducta maternal natural se efectúe es la conexión que se establece entre el APM y el área tegmental ventral, a través de las conexiones que el área preóptica lateral (APL) envía (Numan, 1994a).

La región analizada en el *Peromyscus californicus*, el APM, es una de las regiones más ampliamente estudiadas en relación a la conducta maternal de las ratas. Lesionando esta estructura hipotalámica en ratas se pudo comprobar que la conducta maternal se veía deteriorada (Numan y cols., 1977; Numan, 1988; Numan, 1994a; Numan, 1994b; Oxley y Fleming, 2000), mientras que si se administraba estradiol y prolactina en esta misma región, la conducta era activada (Numan y cols., 1977; Numan, 1988; Numan, 1994a; Numan, 1994b). Esta estructura, como se comentó brevemente, envía eferencias al área tegmental ventral (ATV), a través de las proyecciones laterales desde el APM hasta el Área Preóptica Lateral (APL) siendo esta ruta de vital importancia para la ejecución de la conducta maternal de las ratas (Numan, 1994a) (figura 1.4.).

Recientemente se ha puesto de manifiesto en repetidas investigaciones que el APM también envía eferencias al NEST parte ventral y que estas dos regiones son fundamentales en la regulación de la conducta maternal de la rata (Numan y Sheehan, 1997; Lonstein y De Vries, 2000; Stack y cols., 2002). Destruyendo los cuerpos celulares del APM y del NESTv con un aminoácido excitotóxico o cortando la conexión lateral entre el APM y el NESTv, la conducta maternal quedaba suprimida (Numan y Sheehan, 1997). Durante el despliegue de conducta maternal natural en las regiones del APM y del NESTv de las ratas se pudo detectar una amplia actividad de los genes *c-fos* y *Fos B* en las neuronas implicadas en la regulación de la conducta maternal (Lonstein y cols., 2000; Stack y cols., 2002) incrementándose la actividad de la proteína Fos en el APM y el NESTv incluso en hembras madres maternales que habían sufrido ablación del bulbo olfatorio y de los pezones, no pudiendo por ello ser atribuido este incremento a la estimulación olfatoria o táctil (Numan y Sheehan, 1997). En otro trabajo se analizó la

presencia de 2 DG y la actividad del gen *c-fos* en hembras madres en el NEST, entre otras regiones. Estos registros indican la actividad en las terminales neuronales, a través del 2-DG, y la actividad en los somas o cuerpo neuronales, a través del *c-fos*. En estas hembras madres se pudo detectar un incremento en la expresión de ambos registros en el NEST comparadas con hembras controles no madres, aunque en este trabajo no se especificó qué subdivisión del NEST era la que se estaba analizando (Komisaruk y cols., 2000).

Algunos autores han sugerido que esta participación del APM y del NESTv en la conducta maternal iría encaminada al control de conductas activas maternas, tales como el acarreo, el lamido y acicalamiento de las crías (Numan y Numan, 1996; Numan y Sheehan, 1997; Lonstein y De Vries, 2000), conductas que previamente fueron denominadas motoras, mientras que las conductas quiescentes, como la postura de amamantamiento, dependen de otra región cerebral, que es la sustancia gris periacueductal, parte ventrocaudal (SGPvc) (Lonstein y Stern, 1997; Lonstein y De Vries, 2000; Stern y Lonstein, 2001).

Capítulo 2

Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (SIA) o de feminización Testicular (*Tfm*).

2.1. APROXIMACIÓN HISTÓRICA Y SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS (SIA) EN HUMANOS.

Esta patología fue descrita por primera vez por John Morris, un experto en obstetricia de la Universidad de Yale, en 1953, después haber recopilado un total de 82 casos de individuos que presentaban un fenotipo femenino a pesar de poseer testículos (Quigley y cols., 1995; McPhaul y Griffin, 1999).

En un principio no se conocía la razón por la cual estas personas, aún poseyendo testículos, presentaban un fenotipo de mujeres. Se planteó la hipótesis de que los testículos de estas pacientes segregaban hormonas ováricas en vez de hormonas testiculares que podían feminizarlas y de ahí la denominación que se propuso de síndrome de feminización testicular (*Tfm*, del inglés, *testicular feminization*) (Valentine, 1968; Quigley y cols., 1995). Pero en los años 60 se pudo determinar que los individuos afectados poseían una normal biosíntesis de esteroides y una alteración del tejido diana de los andrógenos, con lo cual, el término *Tfm* se sustituyó por el de síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA), que es el adoptado por la mayoría de

los clínicos actualmente, conservándose el término *Tfm* para hacer referencia a la patología análoga que se da en los animales (Quigley y cols., 1995).

En posteriores investigaciones se ha podido comprobar que esta disfunción se produce por diferentes mutaciones en el gen receptor de andrógenos (*AR*), ocasionando según el lugar de la mutación, diferentes grados de insensibilidad del receptor. Hasta la fecha, han podido detectarse 245 mutaciones diferentes en el gen del *AR* humano, que está situado en el cromosoma X (Xq11.1-q12) (McPhaul y cols., 1993; Quigley y cols., 1995; Gottlieb y cols., 1998; Imperato-McGinley y Zhu, 2002). Todas estas mutaciones se relacionan con reversiones sexuales en la dirección hombre-mujer y algunas con otras patologías, como cáncer de próstata y atrofia muscular espinobulbar o síndrome de Kennedy, estando todas ellas asociadas a la infertilidad al no poseer ni los órganos masculinos ni femeninos desarrollados (Brinkmann y cols., 1995). Esta mutación es de carácter recesivo ligado al sexo, como las patologías de la hemofilia y la ceguera a los colores. Por ello sólo la manifiestan los hombres que la han heredado, mientras que las mujeres portadoras de la misma mutación, al poseer otro alelo del gen *AR* en el otro cromosoma X y al no serles tan necesarios los andrógenos para su desarrollo gonadal como a los hombres, no expresan anomalías fenotípicas detectables a simple vista. Es por este motivo por el que todos los estudios llevados a cabo en humanos sobre esta patología se han realizado en hombres-mujeres $X^{Tfm}Y$.

Las insensibilidades son graduales, habiendo tres tipos diagnosticados en humanos: síndrome de insensibilidad a los andrógenos completo (SIAC), síndrome de insensibilidad a los andrógenos parcial (SIAP) y síndrome de insensibilidad a los andrógenos mínimo (SIAM) (Quigley y cols., 1995; Brinkmann y cols., 1995; Bevan y cols., 1996; Bevan y cols., 1997; Gottlieb y cols., 1999; McPhaul, 1999; Boehmer y cols., 2001; Gottlieb y cols., 2001a; McPhaul, 2002). Otra forma de diagnóstico clínico en humanos sigue una escala ordinal del 1 al 7, siendo el SIA 1 el grado de insensibilidad más leve y el SIA 7 el grado mayor de insensibilidad, con genitales predominantemente masculinos y femeninos respectivamente (Quigley y cols., 1995). El vello axilar y púbico, puesto que depende de la actuación de la androstenediona, un derivado androgénico, también presenta variación en su presencia dependiendo del grado de insensibilidad y por ello permite determinar la clasificación de SIA grado 6 (posee vello) y grado 7 (no lo posee) (Brinkmann y cols., 1995; Pinel, 2001). Para un

correcto diagnóstico, tratamiento y asignación del sexo es necesario una investigación clínica que incluya un análisis hormonal, genético y molecular (Balducci y cols., 1996). A este respecto, existen en la literatura ejemplos de diagnósticos diferentes para esta patología en humanos XY afectados (Ris-Stalpers y cols., 1990; McPhaul y cols., 1993; Imasaki y cols., 1996; Lobaccaro y cols., 1996; Bevan y cols., 1997; Brinkmann y cols., 1995; Chen y cols., 1999; Hellwinkel y cols., 1999; McPhaul y Griffin, 1999; Weidemann y cols., 1999; Zhu y cols., 1999; Claessens y cols., 2001)

Se ha demostrado que los niveles hormonales de estos pacientes difieren respecto a grupos no mutados y a su vez, difieren entre sí mismos según el grado de insensibilidad y el momento vital. Por ejemplo, respecto a la hormona antimülleriana (AHM/MIS) se encontró que los pacientes que presentaban el SIA poseían niveles elevados de AMH/MIS comparados con un grupo control, debido a la imposibilidad de ser regulada por la testosterona a través de sus receptores (Rey y cols., 1994; Majdic y cols., 1995; Al-Attar y cols., 1997; Rey, R., 1998; Rajpert-De Meyts y cols., 1999). Pero a su vez, los grupos de SIAC y SIAP difieren entre sí, en relación a los niveles en plasma de LH y de testosterona. Concretamente durante los tres primeros meses de vida en los pacientes SIAP los niveles de testosterona y de LH en plasma están incrementados, mientras que en los SIAC se encuentran en un rango inferior del normal. Por otro lado en el período postpuberal y adulto, tanto los pacientes SIAC como SIAP poseen niveles en plasma de LH de normales a elevados, con la consecuente estimulación en las células de Leydig que conlleva a un aumento en la síntesis de testosterona y estradiol (Balducci y cols., 1996; Ahmed y Hughes, 1999; Brinkmann y cols., 2001; Bouvattier y cols., 2002).

Cuando la mutación ocurrida se localiza en el mismo lugar del gen *AR* en dos pacientes diferentes, lo habitual es que el fenotipo de estas personas sea similar, respecto a la masculinización de sus genitales. Sin embargo recientemente se han recogido hasta 25 de 200 casos en la literatura en los que diferentes pacientes con la mutación localizada en el mismo lugar presentaban fenotipos dispares (Holtherhus y cols., 1997; Hiort y cols., 1998; Holtherhus y cols., 1999a; Holtherhus y cols., 1999b; Gottlieb y cols., 2001a; Gottlieb y cols., 2001b). Los autores explican este fenómeno a través del mosaicismo, esto es, sostienen que el genoma puede variar a lo largo de la vida, de manera que un gen *AR* sin mutación puede expresarse en algún momento de la vida del

individuo $X^{Tfm}Y$, a pesar de poseer un gen único y mutado para este receptor, el proveniente del cromosoma X. Se ha podido demostrar que en estos individuos no existe una homogeneidad genética en todos sus órganos (Gottlieb y cols., 2001a; Gottlieb y cols., 2001b). Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la existencia de dos tipos diferentes de receptores *AR* en el tejido genital humano, las formas A y B o α y β del receptor *AR* (Wilson y McPhaul, 1994; Ikeuchi y cols., 1999).

En algunos casos es efectiva en estos pacientes la terapia hormonal, cuando la insensibilidad a los andrógenos no es muy acusada, para contribuir al desarrollo gonadal masculino (Ong y cols., 1999). Sin embargo en la mayoría de los casos en los que la insensibilidad del receptor impide este tratamiento y los genitales que predominan son los femeninos, debido a la toxicidad de un tratamiento hormonal androgénico prolongado, lo que se tiende a hacer es conservar el género femenino (Wilson, 1999). En estos casos los pacientes tienen absolutamente desarrollada su identidad de género hacia mujer de tal manera que algunos especialistas aconsejan ocultar la causa de la amenorrea a los pacientes con este síndrome que acuden al especialista en la pubertad y sugieren que, en los casos en que sea posible, la información que se le de al paciente sea que posee unos ovarios atrofiados y que será necesaria su extirpación, cuando lo que verdaderamente se le extirpen serán los testículos atrofiados que con frecuencia, en algún momento vital, se vuelven tumorosos (Valentine, 1968; Pinel, 2001; Green, 2002; Hines, 2002; Imperato-McGinley y Zhu, 2002; McGinnis y cols., 2002). El hecho de que en estos pacientes, a pesar de poseer en todas las células de su cuerpo la información genética proveniente de un hombre, prefieran y opten por ser mujeres, ha hecho de este síndrome otro objeto de estudio para abordar posibles explicaciones científicas de los determinantes de la identidad sexual como innata o aprendida (Ahlquist, 1994; Quigley y cols., 1995; Green, 2002; Hines, 2002; Imperato-McGinley y Zhu, 2002).

2.2. EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (*AR/Ar*).

Pasaremos a analizar las características propias de este receptor, que puesto que es similar estructural y funcionalmente en seres humanos, ratón y rata, su descripción podrá ser aplicable para todos los casos. Este receptor es un miembro típico de la

superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción siendo similar a otros receptores de hormonas esteroideas, así como a los receptores de hormonas tiroideas, de vitamina D y de ácido retinoico. En humanos, como se comentó previamente, está situado en el cromosoma X, en la región pericentromérica del brazo largo (Xq11.1-q12) (McPhaul y cols., 1993; McPhaul, 1999; Quigley y cols., 1995; Gottlieb y cols., 1998; Barrio y Ezquieta, 2001; Hughes, 2001; Imperato-McGinley y Zhu, 2002; McGinnis y cols., 2002). En ratón se sitúa igualmente en el cromosoma X a una distancia de 30 centimorgans (30 cM) y en rata está también localizado en el cromosoma X, en la región Xq22-q32.

La estructura proteica del receptor de andrógenos posee 8 exones y tiene tres dominios funcionales principales. Por un lado el dominio de transactivación aminoterminal, codificada por el exón 1 y crítico para la regulación de la transcripción de genes diana. Por otro lado el dominio central de unión al ADN, codificado por los exones 2 y 3, que interactúa con la secuencia de nucleótidos del ADN y responde a la hormona con una estimulación de la transcripción. Y finalmente el dominio carboxiterminal de unión a los andrógenos, codificado por los exones del 4 al 8, que interactúa tanto con la testosterona como con la dihidrotestosterona y en cuya región se unen las HSP (del inglés *heat-shock-proteins*) que impiden la activación intrínseca del receptor sin ligando (figura 2.1.) (Hiipakka y Liao, 1998; Barrio y Ezquieta, 2001). Sin embargo, la afinidad del receptor no es idéntica para la testosterona y la dihidrotestosterona, siendo para esta última hasta 10 veces más eficaz tanto en humanos como en rata, ya que la testosterona se disocia hasta tres veces más rápidamente del AR que la dihidrotestosterona y la degradación del AR es dos veces más rápida en presencia de testosterona que de dihidrotestosterona (Quigley y cols., 1995; Balducci y cols., 1996; Keller y cols., 1996; MacLean y cols., 1997; Ávila y cols., 2001; Barrio y Ezquieta, 2001; McGinnis y cols., 2002).

Cromosoma X y gen AR

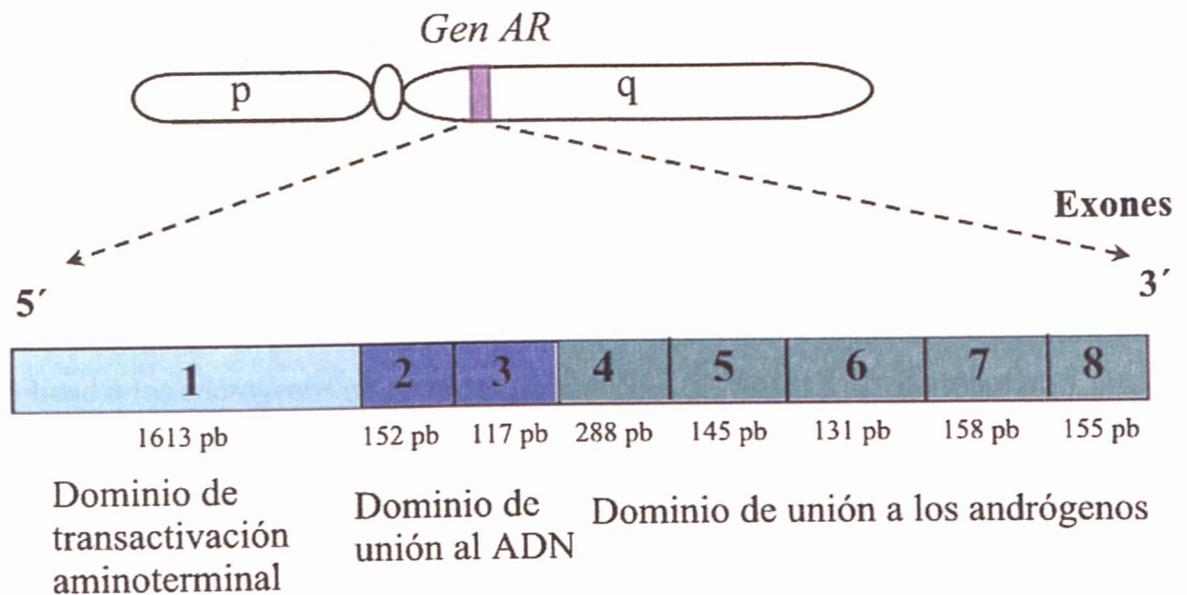


Figura 2. 1.: Cromosoma X y gen AR. En el cromosoma X se señala con color la localización del gen en humanos. Los diferentes dominios de actuación del gen se recogen en el dibujo inferior, en el que se especifica el tamaño en pares de bases (pb) de cada dominio. (Imagen creada a partir de Quigley y cols., 1995).

El AR se encuentra, antes de ser modificado por el ligando, en el citoplasma de las células como oligómero inactivo, unido a las proteínas HSP (Quigley y cols., 1995; Georget y cols., 1997; Hughes, 2001; Kawata y cols., 2001). Una vez unido al andrógeno, el receptor se transforma, mediante cambios conformacionales y el desprendimiento de las proteínas HSP, en una versión activa homodimérica del receptor, también llamada complejo hormona-receptor (Pinsky y cols., 1994; MacLean y cols., 1997). Este complejo atraviesa la membrana nuclear y una vez dentro del núcleo y sirviéndose de la alta afinidad que esta nueva versión del receptor posee por los elementos-de respuesta a los andrógenos (ERA), se une a ellos. Estos ERA son secuencias específicas de nucleótidos localizadas en el dominio de unión del ADN que pueden promover la iniciación de la transcripción si actúan como intensificadores o pueden suprimir la misma si actúan como silenciadores. Al unirse el complejo hormona-receptor a esta secuencia (ERA) se produce la dimerización y la consecuente activación o no de la transcripción, teniendo en cuenta la naturaleza del ERA (activadora o silenciadora), el tipo de sustancia ligada al receptor (androgénica o antiandrogénica) y

por último la actuación de las proteínas correguladoras o correpresoras que actúan conjuntamente con el complejo hormona-receptor, como el coactivador de receptor nuclear 1 (*SRC-1*), entre otros (Pinkey y cols., 1994; Quigley y cols., 1995; Hughes, 2001). Como resultado serán traducidas nuevas proteínas que podrán alterar la función celular (McGinnis y cols., 2002).

El *AR*, como se especificó con anterioridad, se localiza en los núcleos celulares de una amplia variedad de tejidos del organismo, como son los testículos, la próstata, el cerebro y la médula espinal (Tenbaum y Baniahmad, 1997). Pero también hay receptores de andrógeno en las glándulas sudoríparas, los folículos pilosos, el músculo cardíaco, en la musculatura lisa vascular y gastrointestinal, en los folículos tiroideos y por último en las células adrenales corticales (Quigley y cols., 1995), de manera que la disfuncionalidad de este receptor puede ocasionar anomalías en el desarrollo normal de estos tejidos.

Cuando se produce una mutación en este receptor, el mecanismo de actuación normal de los andrógenos previamente comentado se ve interferido. Se han descrito dos defectos principales en la función del receptor de andrógenos por mutación en éste, que son anomalías en la unión de los andrógenos o anomalías en la unión al ADN. Los fallos producidos por la unión anómala de los andrógenos a su receptor se producen por mutaciones en el gen del *AR* que se localizan en el dominio de unión a los andrógenos, codificado por los exones del 4 al 8. Estos fallos se traducen en una reducida afinidad de unión, una disminución del número de receptores con afinidad normal, una mayor termolabilidad de la unión hormona-receptor, un aumento en la disociación del ligando o una alteración en la especificidad de la unión. La ausencia absoluta de unión del andrógeno a su receptor es muy infrecuente (Brown, 1995; Barrio y Ezquieta, 2001). Cuando la mutación se produce en el dominio de unión del ADN, codificado por los exones 2 y 3, la hormona puede acoplarse normalmente a su receptor, pero no se puede llevar a cabo dimerización al no poder unirse el complejo hormona-receptor al ADN, con la consecuente imposibilidad de iniciar la transcripción (Barrio y Ezquieta, 2001).

2.3. SÍNDROME DE FEMINIZACIÓN TESTICULAR (*Tfm*).

2.3.1. Genética del *Ar* en ratón y rata.

Como se comentó previamente, este síndrome ha debido existir desde mucho tiempo atrás tanto en humanos como en animales. Dentro del reino animal, han podido detectarse individuos que padecieran esta mutación entre caballos, gatos, ganado, chimpancés, ratones y ratas (Olsen, 1979; Olsen, 1992; McGinnis y cols., 2002).

La mutación ocurrida en ratones se localiza en el exón 1 del gen *Ar*, en el dominio de transactivación aminoterminal y es debida a una delección de un solo nucleótido que introduce un aminoácido sin sentido y con él un codón de terminación en una posición prematura (Gaspar y cols., 1991). La mutación de estos animales sería equivalente al SIAC humano, al presentar un fenotipo predominantemente femenino (Olsen, 1992; McGinnis y cols., 2002). Se ha descrito otra mutación en el *Ar* de ratones que parece producirse en el dominio carboxiterminal de unión a los andrógenos, pero aún no ha sido estudiado en profundidad (Gaspar y cols., 1991; McGinnis y cols., 2002).

Por otro lado, la mutación ocurrida en ratas *Tfm* fue descrita por primera vez por Stanley y Gumbreck en 1973 (Stanley y cols., 1973; Gumbreck y cols., 1982). Esta mutación fue encontrada en ratas King-Holtzman, de manera que con frecuencia para hacer referencia a ellas, se les llama ratas Stanley/Gumbreck o bien *Tfm* King-Holtzman (Yarbrough y cols., 1990; Brown, 1995; McGinnis y cols., 2002). En el año 1990, Yarbrough y su equipo pudieron determinar qué tipo de mutación en el *Ar* presentaban estos animales. Concretamente se trataba de una mutación puntual de sustitución de una base por otra (guanina por adenina) en el exón 5, exactamente en el lugar correspondiente al 734 pb, que corresponde al dominio carboxiterminal de unión a los andrógenos. Con esta sustitución de transición (al ser ambas bases púricas) el aminoácido resultante era en vez de arginina (codón CGG), glutamina (codón CAG) ($\text{Arg}^{734} \rightarrow \text{Gln}$; R734Q) (Yarbrough y cols., 1990). Puesto que lo mutado es el dominio de unión a los andrógenos, el efecto de esta mutación, según la funcionalidad del receptor comentada previamente, podría ser una menor afinidad de unión de la hormona

al receptor, un aumento en la disociación del ligando o una alteración en la especificidad de la unión (Brown, 1995; Barrio y Ezquieta, 2001). De hecho algunos autores han afirmado que la anomalía funcional del receptor de andrógenos en estos animales se debe a un déficit en la retención de la testosterona y la dihidrotestosterona intranuclear, a pesar de ser normal el transporte a través del plasma y la reducción de testosterona a dihidrotestosterona (Bardin y cols., 1971; Ritzen y cols., 1972).

Como consecuencia de esta mutación las ratas $X^{Tfm}Y$ presentan un fenotipo que podría corresponderse al SIAP humano, al ser ligeramente menos insensibles a los andrógenos como lo pudiera ser el ratón *Tfm* (Olsen, 1985; Olsen, 1992; McGinnis y cols., 2002). Curiosamente esta mutación tiene su equivalente exacto en humanos. En éstos, se produce igualmente una sustitución de arginina por glutamina, pero en el lugar homólogo a humanos, en el pb 752 ($Arg^{752} \rightarrow Gln$; R752Q) (Brown, 1995; Langley y cols., 1998). En humanos esta misma mutación ocasiona una insensibilidad completa a los andrógenos y tanto en ratas como humanos, para activar los receptores de andrógenos con esta mutación, es necesaria una cantidad de dihidrotestosterona en plasma 10.000 veces superior a la que un receptor de andrógenos normal requeriría (Brown, 1995; Langley y cols., 1998).

En el tejido cerebral de las ratas macho *Tfm* (hipotálamo, área preóptica, hipófisis anterior y córtex) se ha demostrado que igualmente existe este déficit en la retención de la testosterona y la dihidrotestosterona intranuclear por parte del receptor de andrógenos, mostrándose una afinidad de tan sólo el 10-15 % comparados con hermanos de camada controles, siendo evidente este déficit en época neonatal (Naess y cols., 1976; Chung y cols., 1983; McGinnis y cols., 2002).

3.3.2. Perfil endocrino de las ratas *Tfm*.

Cabría esperar que la anomalía en el funcionamiento de los receptores de andrógenos en estos animales condujera a una alteración endocrina global por déficit en los sistemas de retroalimentación. De hecho, es esto lo que se ha demostrado que sucede. A pesar del fenotipo de las ratas macho *Tfm*, los testículos que poseen producen de

normales a elevados niveles de testosterona (Yarbrough y cols., 1990). Comparando machos rata *Tfm* con machos sin mutación hermanos de camada, se pudo comprobar que los primeros tenían niveles en plasma significativamente superiores de testosterona (7.5 ng/ml) que los hermanos (2.8 ng/ml), así como de DHT (0.8 ng/ml vs. 0.2 ng/ml) y de E₂ (18.8 ng/ml vs. 7.9 ng/ml) (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990). Este aumento de andrógenos en plasma podría deberse al también elevado nivel de LH con el que estas ratas *Tfm* cuentan comparados con machos y hembras sin mutación (Krieg y cols., 1990). De hecho, las ratas macho *Tfm* poseen niveles más elevados de LH en plasma que los machos intactos, pero menos que los machos gonadectomizados (Krieg y cols., 1990).

Sin embargo, administrando subcutáneamente testosterona y DHT en dosis muy altas (2 mg/100 g de peso corporal) o en pequeñas dosis (50 µg/ 100 g de peso corporal) a machos rata *Tfm* y hermanos de camada durante 12 días seguidos, se pudo comprobar que en los machos *Tfm* sólo con dosis suprafisiológica de ambos andrógenos se produjo una reducción de los niveles de LH y FSH en plasma, mientras que en los machos hermanos de camada, ambas dosis hicieron lo mismo (Naess y cols., 1976). Este resultado pone en evidencia que en machos *Tfm* existe cierta sensibilidad en los receptores de andrógenos, pero que su insensibilidad hace imposible la existencia de un mecanismo de retroalimentación funcional entre el hipotálamo y la hipófisis como el que se da en los machos hermanos de camada (Purvis y cols., 1978; McGinnis y cols., 2002).

Igualmente se pudo demostrar que en ratas castradas, se incrementaba de 2 a 10 veces el ARNm del *AR* en regiones tales como próstata ventral, epidídimo, vesícula seminal, riñón y cerebro, volviendo a sus niveles normales tras inyectarles testosterona, que no estradiol (Quarmby y cols., 1990), mientras que en los animales machos *Tfm* esta misma castración no tuvo ningún efecto regulador sobre el ARNm del receptor de andrógenos (Quarmby y cols., 1990).

Por otro lado, y de nuevo debido al déficit en un sistema de retroalimentación, los ratones macho *Tfm* presentan unos niveles elevados de la hormona antimülleriana (AMH/MIS), manteniéndolos elevados durante el desarrollo puberal para descender

ligeramente a partir del día 25 (Al-Attar y cols., 1997). Como comentamos anteriormente, esta hormona y sus niveles mantienen una relación inversamente proporcional a los niveles de testosterona en plasma (Sriraman y cols., 2001). Sin embargo, en estos animales, a pesar de poseer igualmente una concentración elevada de este andrógeno (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990), la AMH/MIS está incrementada, al no poder autorregularse de manera normal. Este incremento de ambas hormonas en los *Tfm* los autores lo asimilan al que se produce en animales normales durante las primeras etapas del desarrollo gonadal de la rata y el ratón macho, en la que tanto los niveles de AMH/MIS como los de testosterona son elevados, ya que la liberación de testosterona se inicia en ratas machos de manera muy temprana, en los días embrionarios E17–E19 (Negri-Cesi y cols., 2001) habiendo de nuevo una elevación en el día P1, entre las 0 y las 2 horas de nacer, para posteriormente volver a descender (Rhoda y cols., 1984). Los autores explican esta ausencia de contrabalanceo temprano entre la testosterona y la AMH/MIS porque los receptores para andrógenos no se expresan en las células de Sertoli hasta el día posnatal 3 en la rata (Majdic y cols., 1995) y hasta el día postnatal 4 en el ratón (Al-Attar y cols., 1997; Rey, 1998), no siendo funcional hasta entonces y no pudiendo ejercer la testosterona la inhibición comentada para la AMH/MIS (Rey, 1998).

Otro elemento importante a tratar en estos animales son los niveles de la enzima Aromatasa (Aro). Roselli y su equipo en 1987 analizaron la actividad de la enzima Aromatasa en diferentes regiones cerebrales de ratas macho *Tfm* y ratas macho hermanos de camada. Pudieron determinar que en estado adulto, la actividad de la enzima Aromatasa de los hermanos de camada macho era elevada en regiones tales como el NEST y la amígdala medial (Me), era intermedio en regiones como el área periventricular preóptica medial (PVAPM), el área preóptica medial (APM), núcleo cortical de la amígdala (AC), núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM), núcleo supraquiasmático (SQ) y núcleo periventricular anterior del hipotálamo (PVAH) y por último, era baja en el hipotálamo anterior (HA) y el núcleo arcuato/eminencia media (Arc/EM). Por otro lado, en los machos *Tfm* la actividad de la enzima Aromatasa, medida en las mismas regiones, resultó presentar niveles inferiores en todas ellas, excepto en la amígdala medial (Me) y en el núcleo cortical de la amígdala (AC) (Roselli y cols., 1987). Como cabría esperar, además, en ratas hermanas de camada tras la

castración se redujo significativamente la actividad de la Aromatasa en la amígdala y el hipocampo hasta casi asimilar los niveles de los machos *Tfm*, pudiendo restablecerse estos niveles tras la administración de testosterona. Por el contrario, la misma administración de testosterona a ratas *Tfm* castradas no pudo incrementar sus niveles de actividad de la Aro en las mismas regiones (Roselli y cols., 1987). Es importante destacar que esta inferioridad en las ratas *Tfm* en cuanto a la actividad de la enzima Aromatasa se produce a pesar de que los machos *Tfm* sin tratar poseen niveles en plasma significativamente mayores de andrógenos, comparados con los hermanos de camada sin mutación (Roselli y cols., 1987).

2.3.3. Desarrollo gonadal y peso corporal de ratas *Tfm*.

A pesar de que las ratas macho *Tfm* son genéticamente XY y poseen por tanto el cromosoma Y, que como vimos con anterioridad, actúa como inductor dominante del fenotipo masculino (Fraccaro y cols., 1960) y también expresan la mayoría de los genes implicados en la gonadogénesis masculina (e.g. *Sry*), estos machos *Tfm* presentan un fenotipo femenino, aunque incompleto y disfuncional. Poseen una vagina corta y ciega, unos testículos pequeños localizados inguinalmente, glándulas mamarias y no poseen epidídimo ni glándulas sexuales masculinas accesorias (Yarbrough y cols., 1990; McGinnis y cols., 2002) (figura 4.16.). Al haber segregado hormona antimülleriana (AMH/MIS) no poseen los conductos de Müller y por otro lado los conductos de Wolf no han podido desarrollarse al no haber podido actuar la testosterona, presentando por ello lo que algunos autores han llamado pseudohermafroditismo, ya que poseen indicios de las gónadas de ambos sexos, pero ninguna de ellas es funcional (McGinnis y cols., 2002).

En ratones *Tfm*, la esteroidogénesis de las células de Leydig embrionaria está incrementada, pero a partir del día postnatal 25 las células de Leydig necesitan de la actuación de los andrógenos para completar su desarrollo y para el descenso de los testículos, con lo cual, en los ratones *Tfm* la esteroidogénesis permanece en un estadio inmaduro y la localización de los testículos persiste en la zona abdominal (Murphy y cols., 1994; O'Shaughnessy y cols., 2002). Por otro lado, se registró el peso de los

testículos en ratones *Tfm* y en ratones hermanos de camada sin la mutación y se pudo determinar que a los 5 días postnatales de edad no había diferencia entre ambos grupos, pero a partir del día postnatal 20, estas diferencias comenzaron a ser evidentes, puesto que a esta edad en los ratones *Tfm* el peso de sus testículos era ligeramente superior al que presentaban a los 5 días de edad y prácticamente idéntico al que presentaron a las edades de 25, 30 y 40 días postnatales, mientras que en el grupo de los hermanos de camada, las diferencias respecto al grupo de machos *Tfm* empezaron a ser evidentes a partir del día postnatal 20, presentando en cada una de sus edades un notable incremento del peso respecto a la anterior y teniendo en todas las edades un mayor peso de los testículos que los ratones machos *Tfm* (Murphy y cols., 1994).

La insensibilidad a los andrógenos provoca una alteración en otro sistema de retroalimentación, como es el eje hipotálamo-hipófisis anterior-hormona de crecimiento (GH). El hipotálamo segrega GHRH (hormona liberadora de GH) y la adenohipófisis, estimulada por la GHRH, segrega GH, que a su vez estimula la actuación de las somatomedinas y de la IGF-1 (factor de crecimiento parecido a la insulina-1) para que actúen sobre cartílagos y estimulen la elongación de los huesos (Nelson, 1996; Müller y cols., 1999). Los esteroides gonadales también parecen desempeñar una importante función en este eje de liberación (Müller y cols., 1999; Pazos y cols., 2000). En humanos con SIA, que presentan una estatura media mayor que la media de mujeres de la población americana con la que fueron comparadas (174cm vs 162.3cm) se han detectado diversos problemas óseos (Marcus y cols., 2000).

Se ha podido demostrar que en ratas machos a las que se les administró el antiandrógeno flutamida, a partir del día postnatal 30, después de 4 semanas de la administración, además de presentar un incremento en los niveles en plasma de testosterona y estradiol, poseían un menor peso corporal, una menor cantidad de IGF-1 en plasma y un menor ARNm de la IGF-1 hepática, así como una disminución del ARNm de los receptores de GH, aunque no afectó a la cantidad de GH en plasma ni a las reservas de GH de la hipófisis (Pazos y cols., 2000). Los autores sostienen que el aumento de testosterona y estradiol en plasma reflejan un incremento en la síntesis de testosterona así como de la actividad de la enzima Aromatasa (Pazos y cols., 2000). Esta relación entre andrógenos y crecimiento óseo se mantiene incluso en animales de edad

más avanzada. A ratas de 13 meses de edad se les sometió a orquidectomía y tras 4 meses de esta manipulación, se pudo comprobar que en la tibia y la vértebra lumbar había disminuido el contenido de calcio, que el volumen óseo de la tibia proximal se había reducido en un 50 % y que el grosor femoral cortical había disminuido en un 12 %. Sin embargo, si tras la orquidectomía se les administraba testosterona o estradiol o dihidrotestosterona o nandrolona, la masa ósea no disminuía ni se volvía quebradiza (Vanderschueren y cols., 1992).

En ratas *Tfm* existe asimismo, una alteración en el metabolismo óseo. Comparando ratas macho *Tfm* con hermanos compañeros de camada machos y hembras a los 4 meses de edad, se pudo determinar que en machos *Tfm* la longitud del fémur, su diámetro y grosor cortical tenían valores intermedios entre los machos hermanos y las hembras hermanas (Vanderschueren y cols., 1993). Sin embargo, la masa total femoral y su área resultó ser menor en los machos *Tfm* y en las hembras compañeras de camada, comparados ambos con los machos compañeros de camada (Vanderschueren y cols., 1994).

Por otro lado, relacionado con el eje alterado comentado previamente, en ratas *Tfm* los niveles de IGF-1 en plasma están reducidos comparados con los machos hermanos de camada (-12%) y con las hembras hermanas de camada (-27%) (Vanderschueren y cols., 1993). La estimulación basal hipotalámica *in vitro* de secreción de GH fue mayor en machos controles que en hembras controles y en machos *Tfm*. Si la secreción de GH era estimulada mediante pulsos de GHRH, entonces la capacidad de respuesta era mayor en machos controles, seguida de machos *Tfm* y de hembras controles, estableciéndose un orden descendente respecto a la capacidad de secreción de GH por parte de la hipófisis y situándose los machos *Tfm* en un lugar intermedio entre los machos y hembras controles, que a su vez, se correspondía con los pesos corporales que los tres grupos presentaban (machos controles 372 ± 18 gr.; machos *Tfm* 318 ± 7 gr.; hembras controles 218 ± 7 gr.) (Batson y cols., 1989; Martha y cols., 1989; Vanderschueren y cols., 1994).

2.3.4. Estudios en el Sistema Nervioso Central de ratas *Tfm*: análisis de un núcleo cerebral (NSD-APM) y un núcleo medular (NEB).

La morfología cerebral de los animales *Tfm* no ha sido muy estudiada, en ninguna de las especies que han presentado esta mutación. El único ejemplo que existe en la literatura es el que fue realizado por Gorski y su equipo en 1981 sobre ratas *Tfm*. Éstos investigaron el volumen del NSD-APM comparando ratas *Tfm* con ratas macho hermanos de camada (Gorski y cols., 1981). Realizaron este estudio sobre dos grupos de animales *Tfm*, uno proveniente de la Universidad de Rockefeller (grupo A) y otro grupo (grupo B) proveniente de un lugar diferente, posiblemente de la UCLA (comunicación personal del Dr. Gorski a la autora). Los resultados de estos análisis demostraron que la posesión de la mutación en el gen del receptor de andrógenos no estaba incidiendo que en los machos *Tfm* poseyeran un volumen del NSD-APM perfectamente masculinizado, al no diferir del que presentaron los machos compañeros de camada sin mutación (Gorski y cols., 1981). Este resultado estaría apuntando la posibilidad de que en los machos *Tfm* la masculinización llevada a cabo por el estradiol, que actúa con normalidad en ellos (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982), es perfectamente posible (Segovia y Guillamón, 1993). Sin embargo no se han estudiado otras regiones cerebrales en estos animales portadores de la mutación.

Por otro lado y referente al análisis de una estructura medular, sí se han hecho estudios en ratas *Tfm*, concretamente sobre el núcleo espinal bulbo cavernoso (NEB). Tal y como se comentó en el apartado correspondiente, los andrógenos son muy relevantes para el desarrollo de esta estructura, así como de sus dianas musculares (Fishman y cols., 1990; Christensen y cols., 1999). En ratas macho adultas normales se pudo determinar, por inmunotinción, la presencia del *AR* en las motoneuronas del núcleo espinal bulbocavernoso (NEB), del núcleo dorsolateral (NDL) y del núcleo retrodorsolateral (NRDL). Sin embargo, en ratas macho *Tfm* ninguna de las motoneuronas de estas regiones presentaron tinción para los receptores de andrógenos (Freeman y cols., 1995). Esta ausencia de receptores funcionales tiene consecuencias morfológicas. Los machos *Tfm* presentan el mismo número de motoneuronas y el mismo tamaño de éstas en el NEB que las hembras normales, que son valores significativamente menores que los que presenta el macho normal (Breedlove y Arnold,

1981; Freeman y cols., 1996; Watson y cols., 2001). Pero esta diferencia se establece posnatalmente puesto que, al principio en el desarrollo embrionario, machos *Tfm* y hembras de la misma raza presentan el mismo número de motoneuronas hasta los días E18-E23, momento en el que ambos grupos presentan los valores máximos. A partir de entonces, el macho *Tfm* y la hembra empiezan a perder motoneuronas, hasta que en el día P10 ya tienen sus valores adultos. Sin embargo en los machos *Tfm*, hasta el día E20 el desarrollo del NEB fue similar al que se da en machos normales, permitiendo sugerir a los autores que los andrógenos no son necesarios para el incremento inicial de motoneuronas de esta estructura (Sengelaub y cols., 1989).

En estos primeros estudios llevados a cabo sobre el NEB los grupos experimentales eran machos *Tfm* y machos normales hermanos de camada. La selección de estos dos grupos se podía hacer observando la morfología externa gonadal de los animales, puesto que como se ha comentado con anterioridad, las ratas *Tfm* presentan un fenotipo gonadal marcadamente diferente al de las hembras y machos normales. Sin embargo, la detección de las hembras portadoras de la mutación no podía hacerse a simple vista. Las hembras portadoras del mutación ($X^{Tfm}X$) dada su condición heterocigótica para la mutación y debido a la inactivación aleatoria de un cromosoma X que se produce durante el desarrollo, presentan un mosaicismo para el gen de receptor de andrógenos, expresándose en algunas de sus células el gen sano y en otras el gen mutado, pudiendo aportar un paradigma de investigación nuevo y enriquecedor de la función del receptor de andrógenos. Para solventar el problema de la imposibilidad de detectar a las hembras portadoras de la mutación, en investigaciones más recientes llevadas a cabo sobre el NEB se ha aplicado el siguiente método. Tras detectar a las hembras portadoras de la mutación, según las camadas que hayan tenido previamente en las que hubiera evidencia de machos *Tfm* a éstas se le inyecta propionato de testosterona durante otra gestación, en los días embrionarios 16 al 20, para que después del parto pueda identificarse a las hembras de la camada portadoras de la mutación de las que no lo son. Con esta dosis de testosterona en ese momento, las hijas portadoras de la mutación ($X^{Tfm}X$) desarrollan las glándulas mamarias y sus pezones son visibles, debido a la insensibilidad del tejido mamario al andrógenos, mientras que las hijas no portadoras de la mutación (XX), carecerán de glándulas mamarias y de pezones, precisamente por ser sensibles al andrógeno (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001).

Aplicando esta metodología, se estudió la influencia de la administración embrionaria y perinatal de propionato de testosterona sobre la expresión de los receptores de andrógenos en las motoneuronas del NEB de hembras portadoras (mosaico), hembras hermanas de camada no portadoras y machos *Tfm*, todos en estado adulto. Se pudo determinar que, debido a las diferentes sensibilidades a los andrógenos entre los grupos, las hembras mosaico poseían un número intermedio de motoneuronas en el NEB, entre la hembra hermana no portadora (que poseía los valores mayores, al ser sensible a los andrógenos) y el macho *Tfm* (que poseía los valores menores al ser insensible a los andrógenos) e igual sucedía respecto al porcentaje de marcaje de receptores de andrógenos en las células del NEB (Freeman y cols., 1996).

En otro estudio se probó en la hembra mosaico que sólo las células del NEB que poseían el receptor no mutado, presentaban los somas de las motoneuronas incrementados tras un tratamiento crónico de testosterona mientras que, en el mismo animal, las células que poseían el gen mutado para el receptor de andrógenos (*Tfm*) presentaban un tamaño menor de estos somas. A su vez, en otro animal mosaico al que no se le administró testosterona, el tamaño de los somas de las células *Tfm* eran similares a los de las células control y a su vez, similares al que presentaron las células *Tfm* en una hembra mosaico tras la testosterona, ambos menores que los tamaños mostrados por las células no mutadas tras la administración de testosterona, dando a entender que la efectividad en el aumento del tamaño de los somas celulares depende en primer lugar, la sensibilidad de los receptores de andrógenos y en segundo lugar de la cantidad de testosterona que haya en plasma (Watson y cols., 2001).

2.3.5. Estudios conductuales en ratas *Tfm*.

La conducta que más ha sido estudiada en ratas *Tfm* es la conducta sexual, tanto en su manifestación femenina (lordosis) como masculina (monta, intromisión, eyaculación e intervalo posteyaculatorio). Beach y Buehler en 1977 afirmaron que los machos *Tfm* presentaban una conducta sexual masculina de cópula infrecuente e incompleta comparada con machos normales. Además esta conducta no se mejoraba a

1981; Freeman y cols., 1996; Watson y cols., 2001). Pero esta diferencia se establece posnatalmente puesto que, al principio en el desarrollo embrionario, machos *Tfm* y hembras de la misma raza presentan el mismo número de motoneuronas hasta los días E18-E23, momento en el que ambos grupos presentan los valores máximos. A partir de entonces, el macho *Tfm* y la hembra empiezan a perder motoneuronas, hasta que en el día P10 ya tienen sus valores adultos. Sin embargo en los machos *Tfm*, hasta el día E20 el desarrollo del NEB fue similar al que se da en machos normales, permitiendo sugerir a los autores que los andrógenos no son necesarios para el incremento inicial de motoneuronas de esta estructura (Sengelaub y cols., 1989).

En estos primeros estudios llevados a cabo sobre el NEB los grupos experimentales eran machos *Tfm* y machos normales hermanos de camada. La selección de estos dos grupos se podía hacer observando la morfología externa gonadal de los animales, puesto que como se ha comentado con anterioridad, las ratas *Tfm* presentan un fenotipo gonadal marcadamente diferente al de las hembras y machos normales. Sin embargo, la detección de las hembras portadoras de la mutación no podía hacerse a simple vista. Las hembras portadoras del mutación ($X^{Tfm}X$) dada su condición heterocigótica para la mutación y debido a la inactivación aleatoria de un cromosoma X que se produce durante el desarrollo, presentan un mosaicismo para el gen de receptor de andrógenos, expresándose en algunas de sus células el gen sano y en otras el gen mutado, pudiendo aportar un paradigma de investigación nuevo y enriquecedor de la función del receptor de andrógenos. Para solventar el problema de la imposibilidad de detectar a las hembras portadoras de la mutación, en investigaciones más recientes llevadas a cabo sobre el NEB se ha aplicado el siguiente método. Tras detectar a las hembras portadoras de la mutación, según las camadas que hayan tenido previamente en las que hubiera evidencia de machos *Tfm* a éstas se le inyecta propionato de testosterona durante otra gestación, en los días embrionarios 16 al 20, para que después del parto pueda identificarse a las hembras de la camada portadoras de la mutación de las que no lo son. Con esta dosis de testosterona en ese momento, las hijas portadoras de la mutación ($X^{Tfm}X$) desarrollan las glándulas mamarias y sus pezones son visibles, debido a la insensibilidad del tejido mamario al andrógenos, mientras que las hijas no portadoras de la mutación (XX), carecerán de glándulas mamarias y de pezones, precisamente por ser sensibles al andrógeno (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001).

Aplicando esta metodología, se estudió la influencia de la administración embrionaria y perinatal de propionato de testosterona sobre la expresión de los receptores de andrógenos en las motoneuronas del NEB de hembras portadoras (mosaico), hembras hermanas de camada no portadoras y machos *Tfm*, todos en estado adulto. Se pudo determinar que, debido a las diferentes sensibilidades a los andrógenos entre los grupos, las hembras mosaico poseían un número intermedio de motoneuronas en el NEB, entre la hembra hermana no portadora (que poseía los valores mayores, al ser sensible a los andrógenos) y el macho *Tfm* (que poseía los valores menores al ser insensible a los andrógenos) e igual sucedía respecto al porcentaje de marcaje de receptores de andrógenos en las células del NEB (Freeman y cols., 1996).

En otro estudio se probó en la hembra mosaico que sólo las células del NEB que poseían el receptor no mutado, presentaban los somas de las motoneuronas incrementados tras un tratamiento crónico de testosterona mientras que, en el mismo animal, las células que poseían el gen mutado para el receptor de andrógenos (*Tfm*) presentaban un tamaño menor de estos somas. A su vez, en otro animal mosaico al que no se le administró testosterona, el tamaño de los somas de las células *Tfm* eran similares a los de las células control y a su vez, similares al que presentaron las células *Tfm* en una hembra mosaico tras la testosterona, ambos menores que los tamaños mostrados por las células no mutadas tras la administración de testosterona, dando a entender que la efectividad en el aumento del tamaño de los somas celulares depende en primer lugar, la sensibilidad de los receptores de andrógenos y en segundo lugar de la cantidad de testosterona que haya en plasma (Watson y cols., 2001).

2.3.5. Estudios conductuales en ratas *Tfm*.

La conducta que más ha sido estudiada en ratas *Tfm* es la conducta sexual, tanto en su manifestación femenina (lordosis) como masculina (monta, intromisión, eyaculación e intervalo posteyaculatorio). Beach y Buehler en 1977 afirmaron que los machos *Tfm* presentaban una conducta sexual masculina de cópula infrecuente e incompleta comparada con machos normales. Además esta conducta no se mejoraba a

pesar de haberles administrado propionato de testosterona en etapa adulta. Si lo administrado era estradiol y progesterona, exhibían lordosis, pero en la misma frecuencia que lo hacían los machos normales con el mismo tratamiento (Beach y Buehler, 1977; Baum, 1979). La conducta de lordosis se produce en estas ratas macho *Tfm* en niveles elevados si son castrados neonatalmente, pero no en el P10, y en la etapa adulta se les administra estrógenos (Olsen, 1985). Unos años después, Shapiro y su equipo encontraron que administrando a machos *Tfm* y a machos normales, intactos gonadalmente, PT en dosis muy elevadas (10 mg/ día) durante 7 días consecutivos, además de un shock eléctrico, durante la conducta sexual que desplegaron ante hembras receptoras, sólo el 17 % de los machos *Tfm* pudieron eyacular, frente al 100 % de los machos normales (Shapiro y cols., 1980).

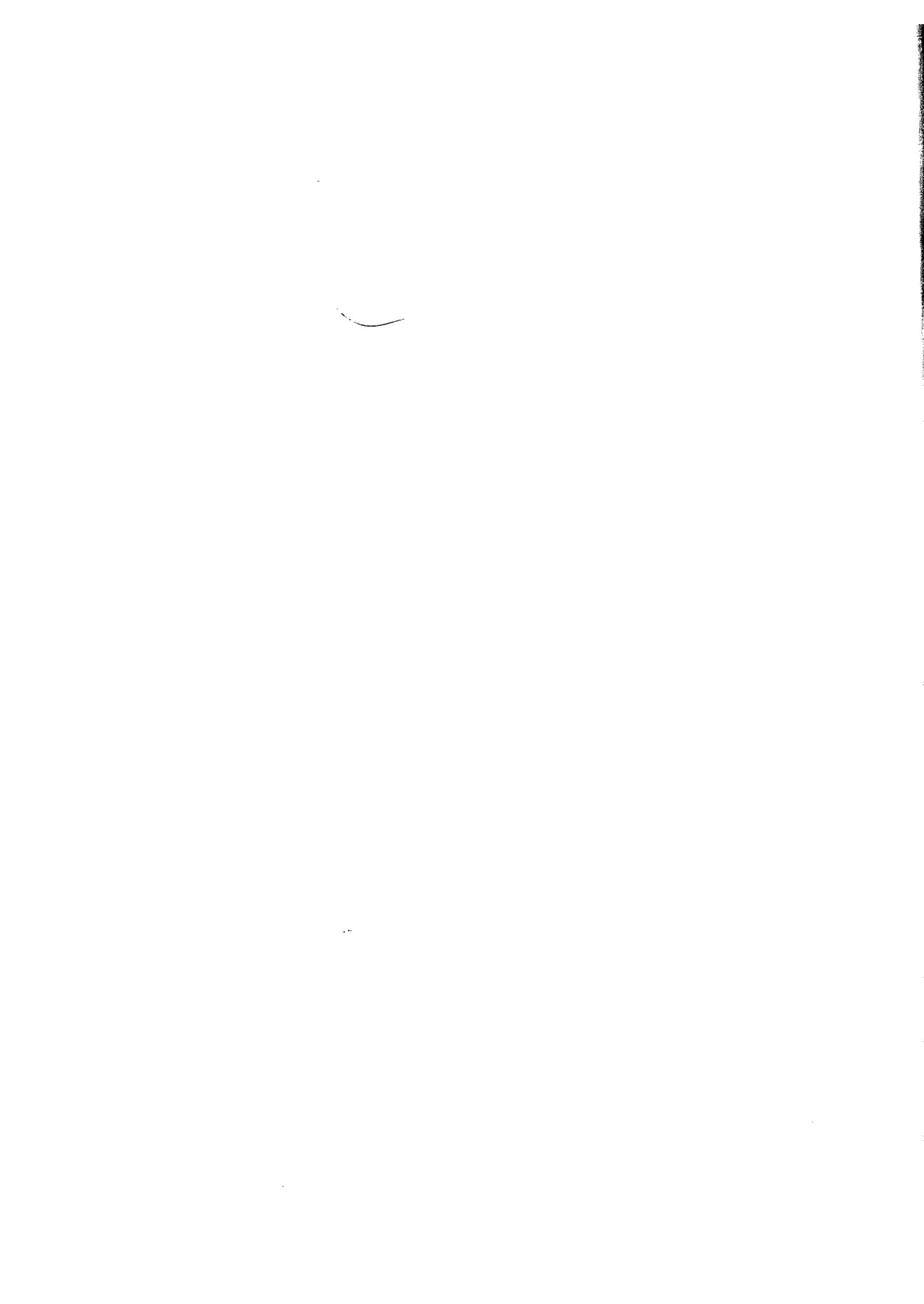
Parecía probado que estos animales machos *Tfm* no desplegaban la conducta sexual típicamente masculina. Sin embargo, Olsen algunos años después, encontró que castrando a machos *Tfm* y administrándoles propionato de testosterona (PT) o benzoato de estradiol (BE) o benzoato de estradiol combinado con dihidrotestosterona (BE + DHT) exhibían monta e intromisión con una hembra receptiva y sin embargo no sucedía esto si lo administrado era sólo DHT (Olsen, 1979). Aunque los machos *Tfm* presentaron conducta sexual masculina, los patrones de intromisión y de eyaculación fueron peores que los llevados a cabo por los machos compañeros de camada sometidos al mismo tratamiento (Olsen, 1979; McGinnis y cols., 2002).

Estos resultados diferentes en cuanto a la conducta sexual de los machos *Tfm* se justifican por la posible consecuencia de haber utilizado animales *Tfm* intactos gonadalmente o castrados neonatalmente (Olsen, 1979). Esta autora afirma que, puesto que en estos animales se da la conducta sexual masculina, el entramado neuronal que sea responsable de esta conducta ha de estar masculinizado (Olsen, 1979).

Las posibilidades explicativas que la autora aporta a esta masculinización del entramado neuronal son por un lado, la posición de los animales en el útero materno y por otro, la actividad residual de los receptores de andrógenos que poseen estos animales (Olsen, 1979; Olsen, 1985; Olsen, 1992). Respecto a la primera explicación, existen evidencias de que hay una relación entre la proximidad de las hembras a los machos *in utero* y la conducta adulta de éstas de monta masculina (Baum, 1979; Olsen, 1979). De

hecho, las hembras cercanas a un macho en el útero materno despliegan, con más frecuencia de la habitual, conducta sexual masculina mientras que las hembras situadas sólo entre hermanas en el útero no lo hacen, a pesar de haber recibido PT en la etapa adulta (Clemens y cols., 1978; Olsen, 1979). Por lo tanto, la autora propone que los machos *Tfm* podrían haber estado cerca de un macho normal en el útero, habiendo por ello incrementado su capacidad de exhibir conducta sexual masculina al masculinizar el entramado neuronal responsable de tal despliegue. Este efecto masculinizador es el que se comentó en el apartado correspondiente, referido al fenómeno de "freemartinismo" [Jost y cols., 1975; en (Capel, 2000)].

En cuanto a la explicación de la actuación residual de los receptores de andrógenos, la autora sostiene que, dado que el 10- 15% de los receptores que existen en los machos *Tfm* demuestran tener actividad normal (Naess y cols., 1976), los andrógenos administrados a estos machos *Tfm* podrían estar actuando sobre estos mínimos receptores funcionales, favoreciendo la exhibición de conducta sexual masculina (Olsen, 1979). Por este motivo, la autora sostiene que se ha de ser extremadamente cuidadoso al interpretar los datos provenientes de estas ratas macho *Tfm* (Olsen, 1985).



Capítulo 3

Planteamiento y objetivos de la investigación

El estudio del dimorfismo sexual ha puesto de manifiesto la existencia de dos patrones de diferenciación sexual en el cerebro de la rata. Uno de ellos, en el que los machos presentan valores superiores a las hembras en parámetros tales como el volumen de estructuras cerebrales o el número de neuronas que hay en éstas y el otro patrón en el que sucede lo contrario, esto es, las hembras poseen valores superiores a los machos en otras estructuras cerebrales en los mismos parámetros (Segovia y Guillamón, 1982; Segovia y Guillamón, 1986; Guillamón y Segovia, 1993; Segovia y Guillamón, 1993; Guillamón y Segovia, 1996; Segovia y Guillamón, 1996; Guillamón y Segovia, 1997; Segovia y cols., 1999). En el sistema vomeronasal de la rata, el patrón predominante es el de macho mayor que hembra. Además, parece que este patrón se establece debido a la acción del estradiol aromatizado de la testosterona en época perinatal, como sucede en el BOA (Pérez-Laso y cols., 1996), en el NTOA (Collado y cols., 1993), en el NSD-APM (Gosrki y cols., 1981; Döhler y cols., 1982; Döhler y cols., 1986), en la Me (Mizukami y cols., 1983) y en la PMCo (Vinader-Caerols y cols., 1998). Las estructuras que presentan el patrón opuesto, como el LC (Guillamón y cols., 1988a; De Blas y cols., 1990), las subdivisiones del Núcleo de la Estría Terminal NESTma y NESTla (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b) el PS (Del Abril y cols., 1990) y el AVPV (Arai y cols., 1994) los valores mayores de los parámetros morfológicos lo poseen las hembras.

Para el establecimiento de estos dos patrones sexualmente dimorfos parecen estar mediando diferentes procesos, siendo los andrógenos en su actuación indirecta o directa el responsable del establecimiento de ambos patrones. En el caso de las estructuras que han presentado el patrón de diferenciación sexual en el que los machos poseen los valores mayores, como en la mayoría de las estructuras del SVN (Segovia y Guillamón, 1982; Guillamón y Segovia, 1993; Segovia y Guillamón, 1993; Guillamón y Segovia, 1996; Segovia y Guillamón, 1996; Guillamón y Segovia, 1997; Segovia y cols., 1999), los andrógenos estarían actuando de manera inicial e indirecta, ya que se ha demostrado que es el estradiol aromatizado de la testosterona el responsable del establecimiento de este patrón en los núcleos cerebrales del BOA (Pérez-Laso y cols., 1996), del NTOA (Collado y cols., 1993), del NSD-APM (Gosrki y cols., 1981; Döhler y cols., 1982; Döhler y cols., 1986), de la Me (Mizukami y cols., 1983) y de la PMCo (Vinader-Caerols y cols., 1998).

Por otro lado, en su actuación directa, los andrógenos podrían estar influyendo en las estructuras donde las hembras poseen los valores morfológicos superiores, inhibiendo en los machos el desarrollo de éstas (Segovia y Guillamón, 1982; Guillamón y Segovia, 1993; Segovia y Guillamón, 1993; Guillamón y Segovia, 1996; Segovia y Guillamón, 1996; Guillamón y Segovia, 1997; Segovia y cols., 1999), como se ha propuesto que sucede en los caso de las subdivisiones NEST_{la}, NEST_{ma} y PS (Guillamón y cols., 1988b; Del Abril y cols., 1990). Otros ejemplos de esta posible actuación inhibitoria de los andrógenos, demostrada tras inyectar el andrógeno DHT a los machos, serían los casos del BOA (Valencia y cols., 1992), del NTOA (Collado y cols., 1992; Collado y cols., 1993) y de la Me (Malsbury, 1993). Por otro lado, el andrógeno también puede actuar de manera directa promoviendo el desarrollo de estructuras en las que el macho presente valores superiores, como se sugirió para las motoneuronas y otros parámetros del Núcleo Espinal Bulbocavernoso (Breedlove y cols., 1982; Breedlove y Arnold, 1983b; Nordeen y cols., 1985; Matsumoto y cols., 1988; Tobin y Payne, 1991; Fishman y Breedlove, 1992; Rand y Breedlove, 1992; Jordan y cols., 1995; Christensen y cols., 1999), para el número de neuronas del NEST_{pm} (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b), para el volumen del NEST_{pm} (Chung y cols., 2000) y, por último, para el NSD-APM (Davis y cols., 1996). También de manera directa, la androgenización de hembras en época perinatal

supuso un incremento en los parámetros morfológicos que éstas presentaban en el OVN (Segovia y Guillamón, 1982) en el BOA (Segovia y cols., 1984a; Valencia y cols., 1986; Caminero y cols., 1991; Pérez-Laso y cols., 1996; Collado y cols., 1990; Collado y cols., 1993), en el NTOA (Collado y cols., 1993) en el NESTpm (Del Abril y cols., 1987; Guillamón y cols., 1988b), en la Me (Nishizuka y Arai, 1981) y en el NSD-APM (Gorski y cols., 1980; Gorski y cols., 1981; Jacobson y cols., 1981).

Por lo tanto, en las estructuras donde el patrón sexodimorfo es el de macho mayor que hembra, lo determinante parece ser inicialmente el andrógeno y el estradiol aromatizado de la testosterona (Döhler y cols., 1982; Mizukami y cols., 1983; Döhler y cols., 1986; Collado y cols., 1993; Pérez-Laso y cols., 1996; Vinader-Caerols y cols., 1998), mientras que en el patrón sexodimorfo opuesto, esto es, en las estructuras cerebrales en las que las hembras superan a los machos en valores morfométricos, lo que está actuando podría ser un efecto inhibitor de los andrógenos en los machos (Guillamón y cols., 1988b; Collado y cols., 1992; Valencia y cols., 1992; Collado y cols., 1993; Malsbury, 1993) además de un efecto ovario dependiente de promoción del desarrollo en esas estructuras por parte de los estrógenos en las hembras (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988a; Guillamón y cols., 1988b; De Blas y cols., 1990; Segovia y Guillamón, 1993).

En esta investigación los animales empleados para el estudio del NEST son ratas portadoras de una mutación genética que las hace insensibles a los andrógenos. Esta característica de los animales *Tfm* permite analizar qué efecto ha tenido la ausencia de andrógenos, tan relevantes para el establecimiento de los patrones sexodimorfos, durante la diferenciación sexual, tanto en machos, como en las hembras. Además de esta importante ventaja clarificadora del efecto de los andrógenos en ambos sexos, el empleo de los animales *Tfm* aporta otras ventajas y novedades frente a otros paradigmas experimentales empleados hasta ahora en el estudio del dimorfismo sexual. Frente al uso de técnicas de manipulación hormonal, los animales *Tfm* aportan dos ventajas, una de carácter espacial y otra de carácter temporal. Respecto a la primera de ellas, la especificidad espacial, supone la posibilidad de vislumbrar el efecto que la ausencia de andrógenos, y sólo de ellos, ha podido tener en el proceso de diferenciación sexual. En los casos en los que se administraba testosterona para comprobar el efecto que esta administración había provocado, no se podía controlar la posible transformación

metabólica de la testosterona en otros metabolitos activos, como el estradiol, no siendo posible por ello acotar los resultados obtenidos a la actuación clara de la testosterona. Las ratas con el síndrome de insensibilidad a los andrógenos sí son sensibles al estradiol (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982), por lo tanto en ellas los andrógenos podrían actuar de manera indirecta, a través de la aromatización de la testosterona a estradiol, pero no de manera directa. Esta especificidad espacial permite delimitar el efecto de la ausencia de andrógenos en su actuación directa.

Siguiendo con la ventaja de la especificidad espacial, existen trabajos en la literatura en los que se ha intentado delimitar el lugar o espacio de actuación de los esteroides gonadales androgénicos durante la diferenciación sexual, administrando antiandrógenos o bloqueadores del receptor de andrógenos como flutamida, acetato de ciproterona o hidroxiflutamida. Estas sustancias, aunque específicas en su lugar de actuación, han presentado problemas al atravesar la barrera hematoencefálica, pudiendo por ello no ser completamente eficaces en su bloqueo de los receptores de andrógenos en el SNC, además de poder conllevar efectos secundarios derivados de la administración de sustancias ajenas al organismo que enturbien y afecten a las posibles conclusiones (McGinnis y cols., 2002).

Por otro lado, y en relación a la segunda ventaja que presenta la metodología experimental del uso de animales *Tfm*, la ventaja de carácter temporal, la administración de sustancias hormonales o de antiandrógenos se limitan a un período vital determinado del animal, concretamente el momento de la aplicación de la sustancia. Los animales *Tfm* poseen la ventaja de carecer de la actuación de los andrógenos durante todo el período vital del individuo, asegurando su ausencia en todos los posibles períodos críticos de diferenciación sexual o de desarrollo. Algunos autores han añadido que esta ventaja temporal del empleo de animales portadores de la mutación de andrógenos supone la garantía de poder analizar los efectos organizacionales de la ausencia de andrógenos en el proceso de diferenciación sexual, mientras que las técnicas de manipulación hormonal con esteroides gonadales o con antiandrógenos sólo reflejan el efecto activacional de esa alteración hormonal en un período vital determinado, el momento de la administración (McGinnis y cols., 2002).

Los animales portadores de la mutación en el *AR* presentan asimismo ventajas frente a los animales *knock out*. El ADN de los *knock out* ha sido manipulado

artificialmente, garantizando igualmente la ausencia de actuación de los esteroides, por ejemplo el estradiol (AERKO y BERKO). Sin embargo, los animales *Tfm* son una mutación natural y puesto que la mutación en el receptor de andrógenos no es incompatible con la vida, proporciona la posibilidad de contar con animales experimentales viables en todos los períodos de su desarrollo. Muchas de las mutaciones provocadas en animales *knock out* no son viables y los animales mueren antes de nacer o al poco tiempo de hacerlo y si no lo hacen, a veces presentan anomalías muy severas que impiden interpretar los resultados conductuales o morfológicos derivados de éstos de manera fiable (Nelson, 1997).

Por otro lado, y haciendo ahora referencia a la estructura cerebral analizada en esta investigación, el Núcleo de la Estría Terminal, NEST, presenta la particularidad de poseer, en su configuración, la presencia de todos los patrones posibles de dimorfismo sexual. En las subdivisiones medial anterior y lateral anterior (NESTma y NESTla) la hembra Wistar posee valores mayor en volumen y en número de neuronas que el macho (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b), mientras que en el NESTpm el macho Wistar presenta un mayor volumen y número de neuronas que las hembras, (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Por otro lado, las subdivisiones NESTim, NESTlp y NESTlv, no han presentado diferencias morfológicas entre los sexos, siendo por ello estructuras sexualmente isomorfas (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Además, las subdivisiones sexualmente dimorfas, NESTma, NESTla y NESTpm, responden de manera diferente a las manipulaciones hormonales practicadas con el fin de invertir los parámetros. La subdivisión NESTpm de la hembra Wistar, tras inyectarles una dosis de propionato de testosterona el día P1, aumenta su volumen y número de neuronas hasta asimilarse al del macho, mientras que la castración del macho reducía estos parámetros del NESTpm hasta asimilarlos a los de la hembra intacta (Del Abril y cols., 1987; Guillamón y cols., 1988b). Por otro lado, en la subdivisión NESTma, mayor en la hembra, los machos tras ser gonadectomizados el día P1 incrementaron su volumen y número de neuronas hasta asimilarse a las hembras, pero las hembras no redujeron estos parámetros tras ser inyectadas con una dosis de PT el P1 (Del Abril y cols., 1987). Sin embargo, en la subdivisión NESTla, también mayor en las hembras en número de neuronas, la gonadectomía en el P1 de los machos hizo incrementar sus valores hasta asimilarlos a los de las hembras y la administración de PT

el P1 a las hembras redujo el número de neuronas en éstas hasta asimilarlos a los valores de los machos (Guillamón y cols., 1988b).

Estas diferencias, en cuanto a la capacidad de inversión de los parámetros esperables en las subdivisiones del NEST mediante manipulaciones hormonales de la rata Wistar, sugieren que el proceso de diferenciación sexual de las subdivisiones NESTma, NESTla y NESTpm no es idéntico, a pesar de ser todas ellas parte de una misma estructura cerebral, el NEST. Por ello, analizar los parámetros morfológicos de volumen y número de neuronas en el NEST, único núcleo conocido perteneciente al sistema vomeronasal de la rata que posee ambos patrones de diferenciación sexual conjuntamente, con distintos procesos de diferenciación cada uno, permitirá abordar de una manera representativa lo que sucede durante la diferenciación sexual del sistema nervioso central de los animales que poseen una mutación en el receptor de andrógenos y por lo tanto carecen de éstos durante todo su desarrollo.

El estudio de los animales *Tfm* de diferentes especies con fines investigadores ha sido muy abundante. Sin embargo sólo existe un trabajo en el que se haya estudiado una estructura cerebral en ratas *Tfm* y fue el realizado por Gorski y su equipo en 1981. Éstos analizaron el volumen del Núcleo Sexodimorfo del Área Preóptica Medial (NSD-APM) (Gorski y cols., 1981). Para llevar a cabo este trabajo analizaron el volumen de esta estructura en dos grupos diferentes de machos *Tfm*, provenientes de Universidades diferentes, con sus respectivos grupos control de hermanos de camada. Los resultados que obtuvieron ponían en evidencia que todos los grupos de machos analizados, tuviesen o no la mutación en el receptor de andrógenos, poseían un volumen del NSD-APM similar (Gorski y cols., 1981). Este dato apuntaba al posible efecto del estradiol en la diferenciación de esta estructura cerebral (Segovia y Guillamón, 1993), puesto que este esteroide puede actuar con normalidad en los machos *Tfm* (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982). Además de este trabajo, no existen otros que hayan analizado las repercusiones morfológicas cerebrales de la mutación en el receptor de andrógenos.

Este trabajo además fue realizado sobre ratas macho, fueran *Tfm* o hermanos de camada, ya que la identificación de hembras portadoras de la mutación no era posible hacerla. En investigaciones posteriores referidas al núcleo espinal bulbocavernoso

(NEB), ha sido posible incluir el grupo de ratas hembras portadoras o mosaicos en los grupos experimentales (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001). La metodología empleada en estos trabajos para identificar a las hembras portadoras consiste en administrar PT durante los días de gestación 16 al 20 a hembras que habían tenido previamente camadas *Tfm* para, posterior al parto, poder identificar a las hembras de la camada que son portadoras de la mutación de las que no lo son, dependiendo del desarrollo que presenten de las glándulas mamarias y los pezones, ya que las hembras portadoras de la mutación o mosaico tendrán los pezones parcialmente desarrollados y las hembras no portadoras carecerán por completo de pezones y glándulas mamarias. Esta administración hormonal durante la gestación, además de tener esta utilidad identificativa, es parte del diseño experimental que los investigadores aplican, puesto que analizan el efecto que esta manipulación prenatal hormonal y normalmente otra manipulación postnatal hormonal, tienen sobre el desarrollo y otras características del Núcleo Espinal Bulbocavernoso (NEB) (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001). Sin embargo, para nuestro propósito de investigación, esta manipulación hormonal prenatal tendría con toda probabilidad unas repercusiones decisivas en cuanto al desarrollo de las estructuras cerebrales, alterando los patrones sexualmente dimorfos esperables.

En nuestra investigación para identificar a los *Tfm*, tanto machos como hembras portadoras, hemos empleado la técnica del análisis del ADN mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Esta técnica, que será descrita en detalle en el Capítulo 4, aporta importantes y considerables ventajas frente a las técnicas empleadas hasta ahora. En las investigaciones previas donde se empleaban animales *Tfm*, para establecer la condición de animal *Tfm*, tanto macho como hembra, había sido necesario, en ambos casos, realizar una inferencia causal. Esto es, tanto para seleccionar a los machos *Tfm* como a las hembras portadoras, se habían servido de las consecuencias fenotípicas que la mutación les había provocado, en los machos, según el desarrollo de su aparato genital (Beach y Buehler, 1977; Olsen, 1979; Shapiro y cols., 1980; Gorski y cols., 1981; Olsen, 1985) y en las hembras, analizando el efecto causal que la administración prenatal de andrógenos provocaba sobre el desarrollo de sus pezones (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001). En ambos casos, por lo tanto, establecían una inferencia causal entre la observación de las consecuencias fenotípicas de la mutación y la supuesta presencia de la mutación en los

receptores de andrógenos. En nuestro caso, esta inferencia causal no existe, ya que analizamos y determinamos directamente la causa originaria de las anomalías fenotípicas, estableciendo la presencia o ausencia de la mutación en el receptor de andrógenos tras analizar en cada animal su gen del receptor de andrógenos mediante el análisis de PCR. Por ello, aunque la mutación provoca una alteración fenotípica, no nos servimos de ella para determinar la condición genética del individuo, sino que buscamos la causa de esa alteración fenotípica.

El empleo del análisis del ADN mediante la PCR ofrece, además de la comentada, otras aportaciones y ventajas. Permite determinar la condición genética de los sujetos experimentales, tanto machos como hembras, mediante un criterio objetivo y fiable, sin riesgo de sesgo subjetivo en la interpretación. También permite estudiar a estos animales en condiciones naturales, esto es, sin realizarles ninguna manipulación hormonal que pueda alterar su morfología cerebral que, en nuestro caso, tendría unas consecuencias decisivas en cuanto a la diferenciación sexual. También, como importante novedad, permite incluir el grupo de hembras portadoras de la mutación o mosaicos ($X^{Tfm}X$) en el análisis de la morfología cerebral, en condiciones de desarrollo idénticas al resto de los grupos, esto es, con la misma edad y no habiendo tenido camadas previas que pudiera ayudar a identificarlas como madres portadoras o no portadoras. Esta última ventaja supone poder obtener datos de la morfología cerebral de estas hembras portadoras, de las que no existe ningún dato previo en la literatura, ni en humanos, ya que todos los trabajos han sido realizados sobre mujeres $X^{Tfm}Y$, es decir, hombres con el síndrome de insensibilidad a los andrógenos, ni en animales, incluidas las ratas, puesto que en el trabajo de Gorski y su grupo en 1981, el único que ha estudiado la morfología cerebral en ratas *Tfm*, sólo se analizaron machos, *Tfm* y compañeros de camada.

El análisis del volumen y del número de neuronas del Núcleo de la Estría Terminal en sus subdivisiones NESTma, NESTla y NESTpm, único núcleo del sistema vomeronasal de la rata que presenta los dos patrones de diferenciación sexual existentes con procesos de desarrollo diferentes en cada subdivisión (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis, Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b) analizado en ratas *Tfm* se expone en el **Capítulo 4, Estudio volumétrico y de población neuronal del Núcleo de la Estría Terminal en ratas *Tfm***. Las ratas *Tfm* permiten determinar el efecto de la ausencia de andrógenos en su actuación directa, promoviendo o inhibiendo el desarrollo

de estructuras cerebrales (Guillamón y cols., 1988b; Collado y cols., 1992; Valencia y cols., 1992; Collado y cols., 1993; Malsbury, 1993), pero no en su actuación indirecta, tras ser aromatizada a estradiol (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982). La selección de los animales experimentales se llevó a cabo tras la detección de la causa de la anormalidad fenotípica, detección de la presencia o ausencia de la mutación en el receptor de andrógenos realizada a través de PCR y no por inferencia causal.

Respecto a los trabajos conductuales llevados a cabo sobre los animales *Tfm*, éstos se han limitado al estudio de la conducta sexual en machos *Tfm* (Beach y Buehler, 1977; Olsen, 1979; Shapiro y cols., 1980; Olsen 1985; Olsen, 1992; McGinnis y cols., 2002). Estas observaciones conductuales excluyeron al grupo de hembras portadoras de la mutación ($X^{Tfm}X$) posiblemente por la imposibilidad de su identificación a simple vista. Para llevar a cabo estas observaciones y registros de la conducta sexual, se realizaban diferentes manipulaciones hormonales en los machos *Tfm*, normalmente aplicándoles andrógenos solos o combinados con otros esteroides tras ser gonadectomizados (Beach y Buehler, 1977; Olsen, 1979; Shapiro y cols., 1980; Olsen 1985). La conducta maternal en hembras *Tfm* no había sido registrada previamente. En este trabajo, por ello se analizará la conducta maternal natural de las ratas hembras portadoras de la mutación o mosaico y se comparará ésta con la que realicen las hembras hermanas de camada y las hembras controles de la misma raza. Este experimento será expuesto en el **Capítulo 5, Conducta maternal natural en ratas hembras portadoras de la mutación *Tfm***. La observación de esta conducta, proporcionará por un lado, la obtención de datos conductuales referidos a estas hembras portadoras, de las que no existe ningún ejemplo en la literatura y por otro lado, la obtención de éstos se realizará sin practicar ninguna manipulación hormonal exógena o parenteral, puesto que estas hembras llevarán a cabo la conducta maternal natural bajo los efectos endocrinos que su propio estado natural de gestación, preñez y parto le proporcionen, afectadas o no por la presencia de la mutación en el receptor de andrógenos.

Los trabajos referidos al dimorfismo sexual del NEST fueron llevados a cabo en ratas Wistar o albinas (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Sin embargo, los animales portadores de la mutación

empleados para el primer experimento, que nos fueron cedidos amablemente por la investigadora Cinthia L. Jordan de la Universidad de Berkeley, California, pertenecían a otra raza, la King-Holtzman (Stanley y cols., 1973) y además, habían sido cruzadas repetidas veces con machos de la raza Long Evans, de manera que sus características fenotípicas se asimilaban mucho a esta raza (comunicación personal de la Dra. Jordan a la autora) y, por nuestra parte, fueron cruzados con animales machos Wistar. Los resultados obtenidos en el experimento anterior ponen de manifiesto que los patrones sexualmente dimorfos esperables en el NEST de los animales estudiados no se corresponden enteramente a los hallados en las ratas Wistar. Para comprobar un posible efecto de la raza de los animales en estas diferencias en cuanto al dimorfismo sexual en los parámetros morfológicos de volumen y número de neuronas, se planteó el experimento que se expone en el **Capítulo 6, Volumen y población neuronal en el Núcleo de la Estría Terminal en ratas de raza Wistar y Long Evans**, en el que se analizarán las mismas subdivisiones del NEST estudiadas en el experimento anterior, esto es, las subdivisiones NESTma, NESTla y NESTpm, en machos y hembras Wistar y Long Evans.

Capítulo 4

Experimento 1: Estudio volumétrico y de población neuronal del Núcleo de la Estría Terminal en ratas *Tfm*

El Núcleo de la Estría Terminal, tal y como fue expuesto en el Capítulo 1, presenta múltiples subdivisiones citoarquitectónicas. Por un lado, la parte medial se subdivide en seis partes (parte medial anterior, medial ventral, posterior medial, posterior intermedia, subventricular e intermedial). Por otro lado, la parte lateral se divide en otras seis subdivisiones (lateral anterior, lateral dorsal, lateral ventral, lateral posterior, supracapsular y juxtacapsular). Y finalmente, la parte ventral se subdivide en los subnúcleos preópticos y parastrial (De Olmos y cols., 1985; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Moga y Saper, 1989; Paxinos y Watson, 1998; Stefanova y cols., 1998; Stefanova y Ovscharoff, 2000).

De todas estas subdivisiones se ha determinado que en ratas Wistar existen distintos patrones de diferenciación sexual, dos patrones sexualmente dimorfos y un patrón sexualmente isomorfo. Respecto a los patrones sexualmente dimorfos, existen dos formas. En primer lugar, las subdivisiones NESTma y NESTla son sexualmente dimorfas al ser las hembras las que poseen parámetros morfológicos superiores a los machos (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). En segundo lugar, la subdivisión NESTpm es sexualmente dimorfa, siendo en

este caso los machos los que superan en parámetros morfológicos a las hembras (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Finalmente, en otras regiones del NEST, como las subdivisiones NESTim, NESTlp y NESTv, no se detectaron diferencias morfológicas entre los sexos, siendo por ello estructuras sexualmente isomorfas (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b).

Las subdivisiones sexualmente dimorfas han respondido de manera diferente a los distintos tratamientos hormonales llevados a cabo con el fin de invertir los parámetros morfológicos. En el NESTma el volumen y el número de neuronas es superior en las hembras y si se les administra a éstas propionato de testosterona (PT) el P1 no se alteran estos parámetros, mientras que si lo que se hace es gonadectomizar a los machos el P1 y eliminar su fuente de andrógenos principal, se produce un aumento del volumen y número de neuronas en el NESTma hasta asimilarse a los valores de las hembras. El menor volumen y número de neuronas del NESTma de los machos podría deberse a un efecto inhibitorio de los andrógenos en esta región, sin embargo, el efecto nulo que la administración de PT tenía en el NESTma de las hembras sugiere que el efecto inhibitorio del andrógeno en esta región podría darse sólo en los machos (Del Abril y cols., 1987). Por otro lado, la subdivisión NESTla, que presenta dimorfismo sexual al superar las hembras en el número de neuronas a los machos, esta diferencia era susceptible de inversión tras gonadectomizar a los machos, pues así aumentaba el número de neuronas de éstos. Por otro lado, si se androgenizan a las hembras en época perinatal, en ellas disminuían el número de neuronas del NESTla. Esta modificación en el número de neuronas del NESTla tras la manipulación hormonal pone de manifiesto el posible efecto inhibitorio de los andrógenos en ambos sexos, al aumentar el número de neuronas del NESTla del macho tras eliminar su fuente de andrógenos (castración) y al disminuir el número de neuronas en la hembra tras administrarles propionato de testosterona (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b).

Respecto a la subdivisión del NEST que presenta dimorfismo sexual en la dirección opuesta al superar los machos a las hembras en parámetros morfológicos, el NESTpm, se pudo determinar que el volumen y la población neuronal del NESTpm se podían invertir tras gonadectomizar a los machos (reducían sus valores) y tras androgenizar el día postnatal 1 (P1) a las hembras (aumentaban sus valores). Estos

resultados estarían poniendo de manifiesto el efecto de los andrógenos o de un metabolito de éste (estradiol) en el establecimiento definitivo sexualmente dimorfo del NESTpm (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b).

Con estas manipulaciones hormonales comentadas, podría deducirse que los esteroides gonadales determinantes en ambos sexos en el proceso de diferenciación sexual del NEST, tanto promoviendo como inhibiendo el desarrollo de las estructuras, son los andrógenos. En las hembras el andrógeno promovería el desarrollo del NESTpm, ya que tras administrarles propionato de testosterona, se provoca un aumento del número de neuronas y del volumen de esta subdivisión (Del Abril y cols., 1987; Guillamón y cols., 1988b). Por otro lado, en las hembras, el andrógeno también podría estar actuando inhibiendo, ya que tras administrarles PT a hembras se impide el desarrollo del NESTla hasta sus valores normales (Guillamón y cols., 1988b). Por su parte, en los machos los andrógenos también tendrían una relevante función. Estarían promoviendo el crecimiento del volumen y del número de neuronas del NESTpm ya que tras ser castrados, eliminando así su principal fuente de andrógenos, los parámetros morfológicos en esta subdivisión disminuyen (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). De hecho, en ratas de otra raza, Sprague-Dawley, se pudo comprobar que el dimorfismo sexual en el volumen del NESTpm se producía por un mayor número de células apoptóticas en la hembra que en el macho y este número elevado de células apoptóticas se reducía en machos castrado y hembras si se les inyectaba propionato de testosterona los días postnatales 2, 4, 6, 8, 10 y 12 (Chung y cols., 2000). También, por otro lado, en los machos, los andrógenos podrían estar inhibiendo el crecimiento de las estructuras neuronales, ya que tras ser castrados, las subdivisiones NESTma y NESTla incrementaban el volumen y número de neuronas.

Como hemos expuesto previamente, los andrógenos pueden actuar de manera indirecta y directa, sin embargo, en las ratas *Tfm* los andrógenos no pueden actuar de manera directa. Por ello, si lo que está determinando el dimorfismo sexual en el NEST fuese la testosterona para todas las subdivisiones, los machos *Tfm* poseerían valores feminizados o menores para el número de neuronas y volumen del NESTpm e igualmente feminizados pero mayores para el volumen y número de neuronas del NESTma y el número de neuronas del NESTla, que son los efectos que provoca la

castración. Pero, sin embargo, si la actuación de los andrógenos es de manera indirecta, a través de la aromatización de la testosterona a estradiol, los machos *Tfm* poseerían los mismos valores para todas las subdivisiones que los machos sin mutación, ya que el estradiol en los machos *Tfm* puede actuar con normalidad (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982). A este respecto podríamos apuntar que, en los trabajos referidos a la conducta sexual de los machos *Tfm*, algunos autores sugieren que el entramado neuronal responsable de la ejecución de esta conducta ha de estar masculinizado, ya que la conducta sexual se daba en los machos *Tfm*, sin que la mutación en el receptor de andrógenos estuviera afectando (Olsen, 1979).

Por su parte, para las hembras *Tfm* o mosaicos, puesto que no se ha realizado ninguna investigación en la que se manipule la ausencia de actuación de andrógenos en ellas, no existiría ninguna predicción. Los datos que de este grupo experimental obtengamos, podrán clarificar el efecto de los andrógenos y de su ausencia en la determinación de los patrones de diferenciación sexual en los que las hembras presenten valores superiores (NEST_{ma} y NEST_{la}) e inferiores (NEST_{pm}).

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. Sujetos

Desde el laboratorio de la Universidad de Berkeley, California, por cortesía de la Dra. Cinthia L. Jordan, se obtuvieron un total de 12 hembras provenientes de camadas anteriores de animales portadores de la mutación en el gen de andrógenos descrita por Yarbrough y su equipo en 1990. Estas hembras fueron cruzadas con 12 machos Wistar (Charles River, Criffa; Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France) y alojadas en el estabulario del Departamento de Psicobiología de la Universidad Nacional de Educación a Distancia, en jaulas individualizadas con serrín y viruta suficiente para construir el nido, disponiendo de agua y comida *ad libitum*. Las condiciones de temperatura y humedad permanecieron constantes ($22 \pm 1^\circ \text{C}$ y una humedad del 60 %), al igual que el ciclo luz-oscuridad (luz de 8:00 a.m - 20:00 pm) que se controló mediante un reloj automático.

Las crías obtenidas de estas hembras fueron las empleadas para llevar a cabo este experimento. Todas las camadas permanecieron con sus madres hasta la edad de 21 días, en la que fueron destetadas y alojadas en jaulas que contenían un máximo de cuatro individuos del mismo sexo, en las mismas condiciones constantes en las que estuvieron sus madres. A la edad de 90 días, estos animales, tras ser anestesiados con tribromoetanol (250 mg/g) fueron sacrificados mediante perfusión transcardíaca. Antes de la perfusión pero una vez anestesiados, a cada animal se le extrajo por punción directa del corazón, de 1 a 2 ml de sangre, que se almacenó en tubos preparados con anticoagulante (Edta K). Con esta sangre se llevó a cabo el análisis del ADN de cada animal para determinar su condición genética y para seleccionarlos posteriormente como formantes de un grupo experimental u otro.

4.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerasa Chain Reaction*, PCR)

4.1.2.1. Extracción del ADN.

La sangre extraída a los animales antes de la perfusión transcardíaca se distribuyó en alícuotas de 200 μ l. A este volumen de sangre se añadió 300 μ l de tampón de lisis (5mM MgCl₂, 10mM Tris, 0.5M Sucrose, 1% Triton X-100) (4° C) y 200 μ l de NaI 6M. Estas dos sustancias rompen las membranas celulares. Se agitó manualmente y se dejó reposar 5 minutos, agitando de nuevo antes de que concluyeran los 5 minutos. La extracción y purificación del ADN se llevó a cabo mediante centrifugación a 15,000 rpm durante 1 min, a 4° C para cada uno de los siguientes lavados. Se colocó la muestra en columnas de fibra de vidrio, y se lavó una vez con el tampón de lavado (100mM NaCl, 10mM Tris, etanol 70%) y dos lavados con agua destilada estéril. El resultado es ADN genómico resuspendido en 80 μ l de agua bidestilada estéril. Una vez extraído el ADN genómico, se procedió al análisis de éste por PCR.

4.1.2.2. Amplificación de los genes *Ar* y *Sry* por PCR.

Sobre el ADN extraído se procedió al estudio molecular simultáneo de los genes *Ar* (Receptor de Andrógenos, *Rattus Norvegicus*; Acceso al Gene bank J05454) y *Sry* (Gen determinante de sexo, *Rattus Norvegicus*; Acceso al Gene bank AJ222688 y AF274872) mediante la técnica de PCR. Para ello fueron diseñados dos cebadores a ambos lados de los genes que se querían estudiar (AR1, ARrev, Sry y Sry Rev) (Fernández y cols., 2003).

Los cebadores AR1 (5'-GCAACTTGCATGTGGATGA-3') y ARrev (5'-TGAAAACCAGGTCAGGTGC-3') flanquean un fragmento de 135 pb del gen *Ar* del *Rattus Norvegicus* que contiene el nucleótido mutado descrito por Yarbrough (Yarbrough y cols., 1990). Los cebadores Sry (5'-GGGAGGAGGGATGAATAT-3') y SryRev (5'-CATTGCAGCAGGTTGTACA GT-3') flanquean un fragmento de 626 pb del gen *Sry* del *Rattus Norvegicus*, que contiene la caja HMG del gen (parte del gen altamente conservada).

***Ar* (Gen Receptor de Andrógenos, *Rattus Norvegicus*; Acceso al Gene bank J05454)**

El gen *Ar* de *Rattus Norvegicus* tiene 2701 pares de bases. A continuación se señala la localización de los cebadores *AR* y *ARrev* en negrita y subrayado. La diana de restricción de la enzima *Sau 96I* se señala dentro del recuadro, y el lugar de corte se localiza entre las dos guaninas.

```
2101 GCCAAGGCCT TGCCTGGCTT CCGCAACTTG CATGTGGATG ACCAGATGGC AGTCATTCAG  
2161 TATTCCTGGA TGGGACTGAT GGTATTTGCC ATGGGTTGGC G/GTCCT CAC TAATGTCAAC  
2221 TCTAGGATGC TCTACTTTGC ACCTGACCTG GTTTCAATG AGTATCGCAT GCACAAGTCT
```

Sry (Gen determinante de sexo, *Rattus Norvegicus*; Acceso al Gene bank AJ222688 y AF274872)

A continuación se señala el fragmento del gen *Sry* de *Rattus Norvegicus*, la localización de los cebadores Sry y SryRev (en negrita y subrayado) y la diana de restricción de la enzima *Sau 96I* se señala dentro del recuadro y el lugar de corte se localiza entre las dos guaninas. La digestión del gen *Sry* se utiliza como control interno de la digestión.

```

61 GTGTGGTGGC TTCAAAGTAG ATTAGTTGGG CTGGACGTGG GAGGTCCTGA GGCAGGAGGG
121 ATGAATATTT TCTTACACAC TTTAAATACT AAAATCTTTC TTACAAACAC AGTTCGGATA
181 CTAGCTTTTA CCCCTTACAC TTTATATCTT GACTTCTGTC TCTGTCTGTC TCTGTCTCTC
241 TGTTCCTGTC TCTATCTCTG TCTCTCTCAT CCCATCTCTG ACTTCCTGGT TGCAATCCTA
301 ATTCTTCCAC TACATTCAGC ATTTTCAGATC TTCACTTTCA GCGTTCAGCC TTCCTTACAG
361 CCAGAGGACA TATTAATCCC TGGAGAAGGG AGAGCTTTGG GAGCAGTGAC AGTTG
 1 TCTAGATAGC ATGGAG/GGCC ATGTCAAGCG CCCCATGAAT GCATTTATGG TGAG/GTCCCG
61 TGGAGAGAGG CGCAAGTTGG CTCACAGAA TCCCAGCATG CAGAATTCAG AGATCAGCAA
121 GCATCTGGGA TATCAGTGGG AAAGCCTTAC AGAAGCCGAA AAAAG/GCCCT TTTTCCAGGA
181 GGCGCAGAGA CTGAAGACCC TACACAGAGA GAAATATCCA AACTATAAAT ATCAGCCTCA
241 TCGAAGGGTT AAAGTGCCAC AGAGGAGTTA TACTTTGCAG CGTGAAGTTG CCTCAACAAA
301 ACTGTACAAC CTGCTGCAAT G
    
```

Para la amplificación simultánea por PCR de los genes *Ar* y *Sry* se realizaron 40 ciclos de la siguiente manera: Desnaturalización 95°C, 50 segundos; Anillado 57°C, 50 segundos; Extensión 72°C, 50 segundos.

Para un volumen final de 30µl, se preparó la siguiente mezcla:

- a) 2,4 µl de H₂O_d
- b) 3 µl de tampón de PCR 10x (concentración final 50mM KCl; 10mM Tris-HCl; 1,5mM MgCl₂)
- c) 2,4 µl de una mezcla de dNTPs, para obtener una concentración final de 200 µM cada uno.
- d) 1,5 µl de cada cebador (AR1, ARrev, Sry y SryRev) 0,4µM
- e) 1-2 Unidades de la enzima ADN Taq polimerasa (1,2µl de Taq poli 1U/µl)
- f) 15 µl de ADN (aprox. 150ng)

Para comprobar la amplificación de los genes, se corrió 4 µl del producto de la PCR en un gel de agarosa al 2%, en una cubeta de electroforesis. Una vez comprobada la

reacción de amplificación, 15 μ l del producto de PCR se digirió con la enzima *Sau 96I*, toda la noche a 37 °C [Digestión enzimática V_{final} : 20 μ l (15 μ l de PCR; 2 μ l de tampón K; 2,5 μ l de H_2O_d ; 0,5 μ l de enzima *Sau 96I*)].

Esta enzima reconoce como diana de restricción la secuencia GGNCC, cortando entre las dos GG, que es el fragmento mutado en los animales *Tfm*. En el caso de no poseer la mutación, se originan dos fragmentos de tamaño 79 y 56 pb. Si por el contrario, el animal posee la mutación, se produce un cambio guanina por adenina (G→A) eliminándose así la única diana de restricción que posee el fragmento del gen *Ar* amplificado.

En el caso de hembras o machos sin mutación (XX, XY), la digestión con la enzima *Sau 96I* produce dos fragmentos de 79 y 56 pb, como consecuencia de cortar el fragmento de 135 pb del gen *Ar*. En el caso de los machos, la amplificación del gen *Sry* origina un fragmento de 626 pb, que no aparece en las hembras.

En el caso de una hembra portadora heterocigótica ($X^{Tfm}X$), se obtienen tres fragmentos: uno de 135 pb, otro de 79 y el más pequeño de 56 pb. El primero corresponde al producto de PCR sin digerir (135 pb), ya que posee la mutación y la enzima no lo ha cortado. Los otros dos fragmentos más cortos corresponden a la otra copia del gen, del otro cromosoma X, en este caso intacto y cortado por la enzima..

Cuando se trataba de machos portadores ($X^{Tfm}Y$), se obtenía dos bandas de diferentes tamaños: una de 135 pb (no ha cortado la enzima, al estar mutado) y la otra de 626 pb, correspondientes al gen SRY (Fernández y cols., 2003)(figura 4.1.).

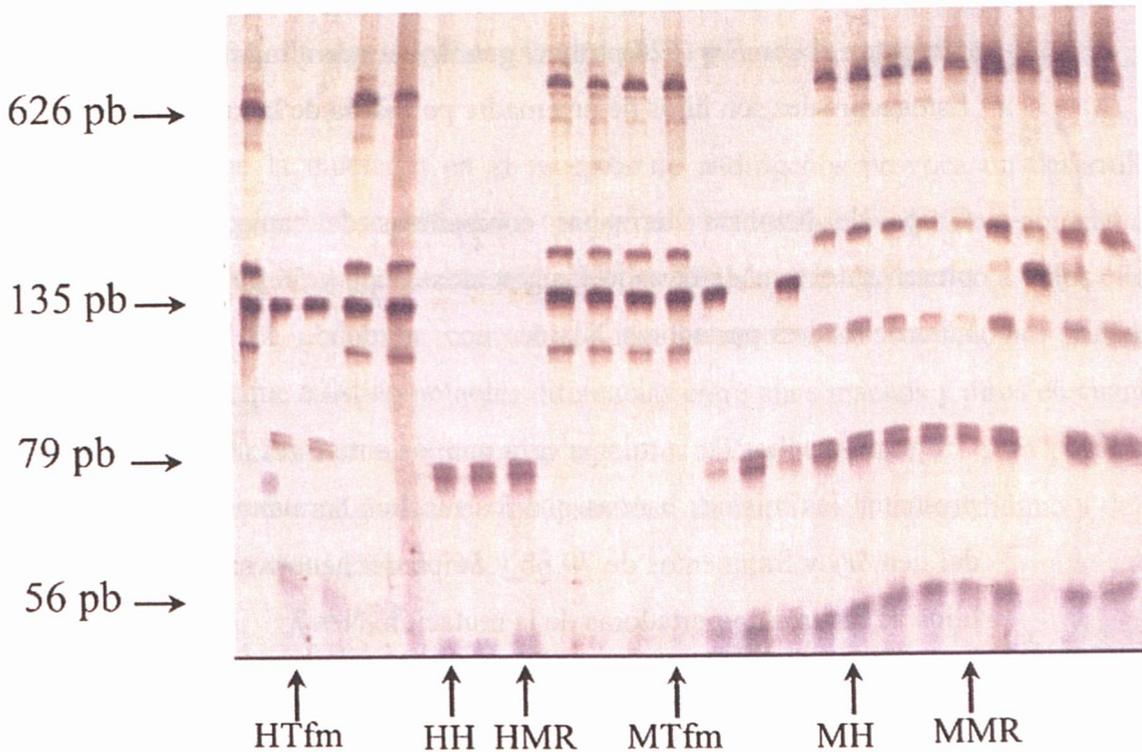


Figura 4.1.: Gel de poliacrilamida. En este gel se especifican los resultados obtenidos a través de la PCR para la designación de los animales a los diferentes grupos experimentales. **HTfm** (hembras *Tfm*): dos fragmentos del gen *Ar* cortados (gen sano) de 56 pb y 79 pb y un fragmento no cortado (135 pb) del gen mutado. **HH** (hembras hermanas): dos fragmentos del gen *Ar* sano cortado (56 pb y 79 pb). **HMR** (hembras de la misma raza): dos fragmentos del gen *Ar* sano cortado (56 pb y 79 pb). **MTfm** (machos *Tfm*): una banda para el *Ar* de 135 pb (gen mutado no cortado) y banda para el gen *Sry* (626 pb). **MH** (machos hermanos): dos bandas para el *Ar* sano (56 y 79 pb) y banda para gen *Sry* (626 pb). **MMR** (machos de la misma raza): dos bandas para el *Ar* sano (56 y 79 pb) y banda para gen *Sry* (626 pb). Para los grupos hermanos y control de la misma raza, además de los resultados obtenidos en el análisis del ADN, para su clasificación se tenía en cuenta la condición genética de sus madres.

De esta manera, los grupos experimentales que se seleccionaron fueron los siguientes:

- Grupo de machos *Tfm* (**MTfm**): en el gel de poliacrilamida estos animales presentan una banda de 135 pb (no ha cortado la enzima al estar presente la mutación) y otra de 626 pb, que corresponde al gen *Sry*. N = 7.
- Grupo de hembras portadoras (**HTfm**): en el gel de poliacrilamida presentan tres bandas, una de 135 pb (la enzima no ha cortado) y dos de 79 pb y de 56 pb (corresponden a la copia del gen *Ar* del X sano). N = 7.

- Grupo de machos hermanos compañeros de camada (**MH**): en el gel presentan el gen *Sry* (626 pb) y el gen *Ar* cortado (fragmentos 79 pb y 56 pb). Estos animales son hijos de una madre portadora de la mutación. N = 5.
- Grupo de hembras hermanas compañeras de camada (**HH**): en el gel presentan el gen *Ar* cortado (fragmentos 79 pb y 56 pb). Estos animales son hijas de madres portadoras. N = 6.
- Grupo de machos de la misma raza que los anteriores (**MMR**): estos machos presentan las mismas bandas que los machos hermanos de camada (626 pb del gen *Sry* y fragmentos de 79 pb y 56 pb del gen *Ar* sano cortado) pero son hijos de madres no portadoras de la mutación. N = 7.
- Grupo de hembras de la misma raza (**HMR**): estas hembras presentan las mismas bandas que las hembras hermanas de camada (fragmentos 79 pb y 56 pb de los genes sanos *Ar*), pero son hijos de madres no portadoras de la mutación. N = 7.

4.1.3. Técnicas histológicas

El proceso de perfusión se practicó a los animales tras haber sido anestesiados con tribromoetanol 99% (250 ml/gr). Para administrarles la dosis correcta de anestésico, cada animal fue previamente pesado. Una vez anestesiado completamente el animal, se procedió a practicarle una incisión a lo largo de la línea intercostal al final del esternón. Posteriormente se seccionaron las costillas y el diafragma, para dejar el corazón al descubierto. A continuación se pinzó la aorta descendente y se introdujo un catéter a través del ventrículo izquierdo, efectuando una pequeña incisión en la aurícula derecha para drenar la sangre venosa. A través del catéter se introdujeron dos soluciones: 100 ml de suero fisiológico salino al 0, 9% y 100 ml de formaldehído al 10 %. Estas dos soluciones proporcionan la fijación y el endurecimiento del tejido nervioso. Una vez finalizado el proceso, se extrajo el cerebro del cráneo y se depositó en paraformaldehído

al 4 % durante 2 días, para posteriormente depositarlo en sucrosa al 30 % diluida en PBS al 0,1 M a 4° C durante tres días y finalmente se procedió a su fijación.

Debido que la mutación en el receptor de andrógenos provoca un desarrollo defectuoso de las gónadas, se procedió a realizar una comprobación del sexo gonadal de los animales. Posterior a la perfusión y una vez sacrificados, se les practicó a todos ellos una incisión en el abdomen con objeto de comprobar la morfología gonadal predominante. Ya que existían notables diferencias entre unos machos y otros en cuanto al desarrollo del aparato sexual masculino, se procedió a la extracción, para posterior cuantificación del peso en gramos de los testículos, de la próstata, del epidídimo y de la vesícula seminal en todos los machos.

Una vez fijado el tejido cerebral, los encéfalos fueron seccionados coronalmente mediante criostato (Frigocut N 2800 Reichert-Jung) a un grosor de 50 μ m y a -17° C de temperatura. Los cortes se fijaron en portas gelatinados para su posterior estudio.

Estas secciones fueron posteriormente teñidas mediante la técnica de Nissl con violeta de cresilo al 1 % (Merck), siguiendo la cadena de deshidratación de alcoholes que se expone:

1. Agua destilada (240 ml) con ácido acético (16 gotas): 90 minutos.
2. Violeta de cresilo (Merck) al 0,1% en frío: 4 minutos y medio.
3. Lavado en agua destilada (240 ml) con ácido acético (16 gotas): 7 segundos.
4. Deshidratación mediante paso por alcohol de 70 ° y 80 ° : 30 segundos cada uno.
5. Diferenciación mediante alcohol de 96 ° (240 ml) con ácido acético (16 gotas): 10 segundos.
6. Dos pasos rápidos por alcohol absoluto de 100 °.
7. Hidratación con Xilol.

En la fase de montaje se protegió cada preparación con un cubreobjetos de cristal que se fijó al portaobjetos mediante un pegamento transparente (DPX). Las secciones correspondientes al NEST se seleccionaron siguiendo el criterio del Atlas Paxinos (1998).

4.1.4. Esterología

El empleo de métodos estereológicos para el recuento de patrones morfológicos en Neurociencias ha aportado muchas ventajas. Una de ellas ha sido el poder unificar el criterio cuantificador en los trabajos de investigación neurocientíficos, con lo cual es posible la comparación entre distintos trabajos. Otra ventaja ha sido la de evitar los posibles sesgos que se conocían que existían en el recuento clásico, pero que, por imposibilidad de aplicar métodos correctores, no podían evitarse. La Estereología trata de solventar al máximo estas posibles desviaciones del valor verdadero. Por estos motivos, entre otros, algunas revistas científicas, como *The Journal of Comparative Neurology* o *Neurobiology of Aging* exigen el uso de técnicas estereológicas para la cuantificación de los datos neuroanatómicos, o en su defecto, la explicación pertinente del autor de por qué, para la obtención de los datos de su experimento, no se ha requerido un análisis estereológico (Saper, 1996; Kordower, 2000).

La palabra *stereo*, significa corporal o espacialmente en tres dimensiones, esto es, sólido, por lo tanto, la Estereología, como perteneciente a una rama de las matemáticas aplicadas (Royet, 1991), será la ciencia destinada a cuantificar y medir fiablemente elementos tridimensionales. El inicio histórico de la Estereología se sitúa en 1961, cuando la sociedad internacional de Estereología (*ISS* del inglés, *International Society of Stereology*) fue fundada. El término Estereología fue acuñado por los fundadores de la mencionada sociedad, Elias y Haug entre otros y la definición que entonces se aplicó a la Estereología fue la de un cuerpo de métodos matemáticos relacionados con parámetros tridimensionales, que se definen a través de la medición de estructuras bidimensionales obtenidas a partir de secciones de estructuras (Royet, 1991).

A un nivel práctico de definición, los métodos de Estereología son un conjunto de técnicas precisas para obtener información cuantitativa, en un sentido estadístico, sobre una estructura tridimensional, a partir de una muestra microscópica bidimensional (Gundersen y cols., 1988a). En los análisis cuantitativos de morfología biológica en los que se emplea el microscopio, es prácticamente imposible tomar la totalidad del objeto de interés para analizarlo y en vez de esto, se toman muestras de dicho objeto (Howard y Reed, 1998). La obtención de de la materia viva a analizar ha de seguir un criterio

jerarquizado, es decir, la población a estudiar (en nuestro caso ratas machos y hembras con o sin la mutación en el receptor de andrógenos) se segmentará en bloques de estudio (sus cerebros) de los que se analizarán secciones (en nuestro caso, las secciones cortadas que incluyan el NEST) tomando en consideración sólo algunas regiones de éstas secciones (campos que se estudiarán). Todos estos niveles en la jerarquía poseen variabilidad que podría estar sesgando el resultado representativo del análisis. Para evitarlo, ha de aplicarse la aleatorización uniforme y sistemática en todos y cada uno de sus niveles, esto es, todas las muestras individuales de cada nivel han de tener la misma probabilidad de ser elegidas (Gundersen y cols., 1988a; Howard y Reed, 1998). Esta aleatorización es responsable de aplicarla el investigador en los dos primeros niveles y a partir del tercer nivel, se hace cargo la Estereología (Royet, 1991; Howard y Reed, 1998). Asumiendo por un lado la imposibilidad (y no necesidad) de analizar el objeto en su totalidad y por otro lado, la selección aleatoria de los componentes de cada nivel de jerarquización, la Estereología aporta métodos con los que se pueden obtener valores estimados de los parámetros que se estudien de manera fiable, no sesgada y eficaz.

Por lo tanto, las máximas que persigue las técnicas estereológicas son el empleo de métodos no sesgados, es decir, sin desviación sistemática del valor verdadero y por otro lado el empleo de métodos eficientes, en el sentido de que no se requiera una inversión de esfuerzo innecesario para la cuantificación de los parámetros deseados, ya que con una muestra pequeña de sujetos y pocas secciones, se obtienen coeficientes de error y de variación aceptablemente bajos después de emplear una cantidad moderada de tiempo (Gundersen y cols., 1988a; West, 1993; Begega y cols., 1998; Howard y Reed, 1998).

Sin embargo, a pesar de sus evidentes ventajas, esta ciencia cuenta tanto con defensores como con detractores, entre los que se viene estableciendo un debate apasionante desde hace años. Los argumentos que sostiene los detractores vienen a ser, en síntesis, que dado que la aleatorización en todos los niveles a veces no es factible, por las características del objeto de estudio o su segmentación, los métodos estereológicos no son infalibles en todos los casos y no deberían descartarse los que se empleaban previamente, como el método de corrección matemática de Abercrombie que se realizaba a partir de secciones bidimensionales, sin asunciones de tridimensionalidad (Guillery y Herrup, 1997; Benes y Lange, 2001a). Igualmente los detractores acusan de

dogmáticos a los que no quieren asumir las críticas del método estereológico y afirman que en la ciencia empírica el dogma no tiene lugar (Benes y Lange, 2001b). Por su parte y también en síntesis, los defensores sostienen que la eficacia, la fiabilidad y la ausencia de sesgo del método estereológico no tienen precedentes y que la aleatorización sistemática de las muestras sólo es posible garantizarla con el método estereológico (Coggeshall y Lekan, 1996; West, 2001).

En los últimos años ha habido un avance considerable de los métodos de cuantificación estereológicos, con los que se pueden estimar parámetros morfológicos tales como el volumen de un núcleo cerebral, el volumen de las células nerviosas, la longitud de las prolongaciones neuronales, la superficie de área, el número de células nerviosas, etc., todas ellas con una gran precisión y fiabilidad (Begega y cols., 1998). Estos avances, además, están sujetos al desarrollo tecnológico informático, que aporta continuamente innovaciones en los sistemas de software y hardware sobre los que la Estereología se sustenta (Peterson, 1999). Como ejemplo, una de las novedades que recientemente se está poniendo en práctica es el sistema de retícula tridimensional estilo "fakir", que atraviesa el objeto microscópico a analizar y permiten estimar el volumen y la superficie del área con gran precisión y fiabilidad (Kubinova y Janacek, 2001).

El equipo estereológico que se ha empleado en esta investigación, que puede apreciarse en la figura 4.2, consta de los siguientes componentes. En primer lugar un microscopio Diaplan Leitz conectado a una cámara que proyecta la imagen de la muestra histológica a la pantalla de ordenador (Multiscan 17sf, Sony Triniton). Unido a la platina del microscopio hay un motor que controla su desplazamiento, generando campos diferentes de análisis de las secciones histológicas de manera aleatoria mediante el desplazamiento sobre los ejes X e Y. Este mecanismo está controlado por un sistema de software, MultiControl 2000 (de Mörzhäuser Wetzlar, Alemania) desde la unidad central de procesamiento pero también es posible mover la platina manualmente mediante un joystick. El software de Estereología (Grid, Interactivision, Dinamarca) permite la generación de las diferentes retículas o grids empleadas para las estimaciones estereológicas que se realizan. Por último, para medir el grosor de las secciones, el eje Z, hay un microrcator electrónico (Heindenhain, alemania) acoplado a la platina del microscopio con una resolución de 0,5 μm .

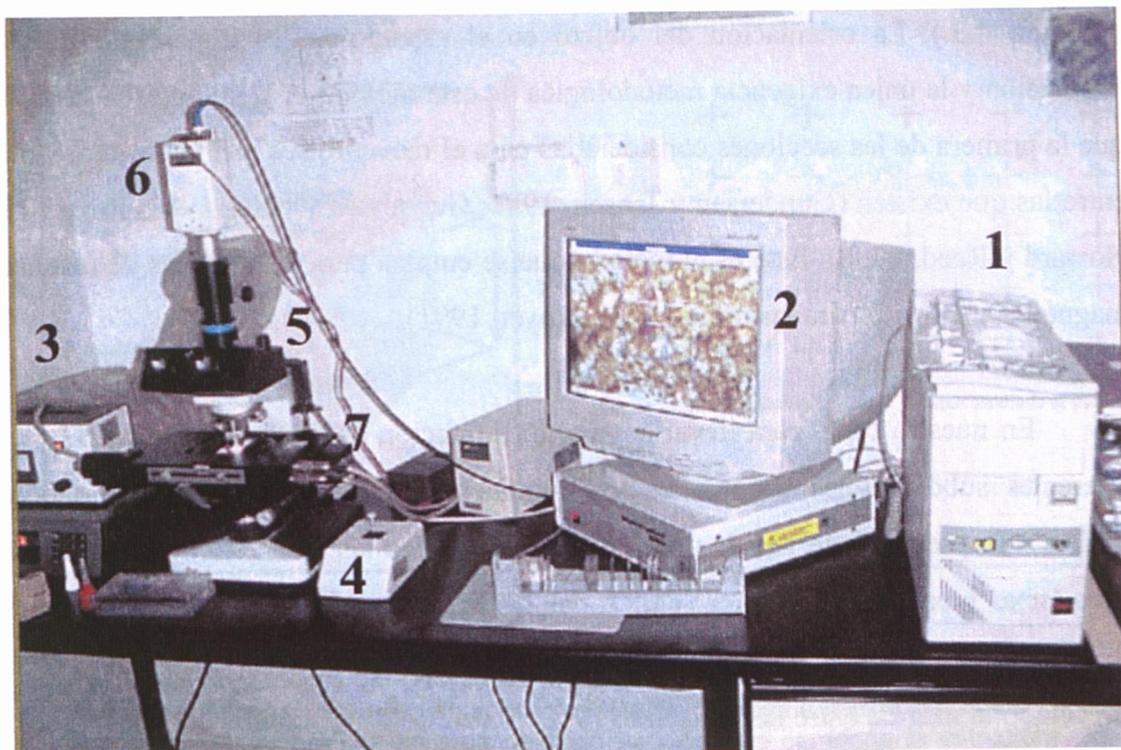


Figura 4.2.: Equipo empleado para el análisis estereológico. Los componentes del equipo son **1:** Equipo informático que contiene el software de Estereología (GRID Interactivision, Dinamarca). **2:** Pantalla de ordenador (Multiscan 17sf, Triniton). **3:** Microcator electrónico (Heindenhain, Al.). **4:** Joystick. **5:** Microscopio Diaplan Leitz. **6:** Cámara conectada al microscopio. **7:** Platina conectada al motor.

4.1.4.1. Volumetría.

La estimación del volumen de una estructura irregular puede calcularse mediante el principio de Arquímedes del desplazamiento de fluidos (Howard y Reed, 1998). Sin embargo, para los objetos que tienen cavidades internas, como sucede con el cerebro o los pulmones o para los objetos que son difícilmente extraíbles, como el caso de regiones específicas cerebrales, este método no es factible (Royet, 1991; Howard y Reed, 1998). En vez de esto, se aplica el método de Bonaventura Cavalieri, matemático italiano que vivió de 1598 a 1647. Éste método fue publicado en su tratado de 1635 y reeditado en 1966 (Gundersen y cols., 1988a; Royet, 1991) y en él, Cavalieri demostró que el volumen de cualquier objeto irregular podía ser estimado a partir de secciones paralelas del objeto separadas por una distancia conocida t , mediante la suma de las

áreas de todas estas secciones y multiplicando estas áreas por la distancia entre secciones t (figura 4.3.). La orientación del objeto en el espacio no es importante para esta estimación y la única exigencia metodológica de este método para que no sea sesgado es que la primera de las secciones consideradas para el recuento sea elegida aleatoriamente entre las que existen (Gundersen y Jensen, 1987; Gundersen y cols., 1988; Royet, 1991; Howard y Reed, 1998). Este es el método que se emplea para las técnicas de resonancia magnética nuclear o para las tomografías (Royet, 1991).

En nuestro caso, para llevar a cabo la estimación del volumen del NEST en sus diferentes subdivisiones y en todos los animales experimentales, cuyos portaobjetos habían sido previamente tapados para desconocer todas las características de cada uno ellos (sexo y condición genética) para todas las mediciones estereológicas, se procedió de la siguiente manera. La primera de las secciones a contabilizar en cada animal se seleccionó al azar de entre las existentes (0-T). Para ello sirviéndonos del lanzamiento de un dado, la primera sección a analizar la determinaba la naturaleza del número obtenido por el dado, según fuera o no múltiplo de 2. Por ejemplo, si lo obtenido era un cuatro, y puesto que este número es par, se empezaba a contar a partir de la sección número 2 que contuviese el núcleo, mientras que si lo obtenido era, por ejemplo, un cinco, por ser número impar, se iniciaba el recuento por la sección número 1 que contuviese el núcleo. Después de ser seleccionada, se tomó esta sección para el recuento y las consecutivas a ésta, dejando una sección sin contabilizar entre una y otra, hasta la última que contuviese el núcleo de interés. De esta manera, y puesto que las secciones habían sido cortadas a $50 \mu\text{m}$, como previamente se especificó, la distancia entre secciones (t) fue de $100 \mu\text{m}$ ($t = 100 \mu\text{m}$).

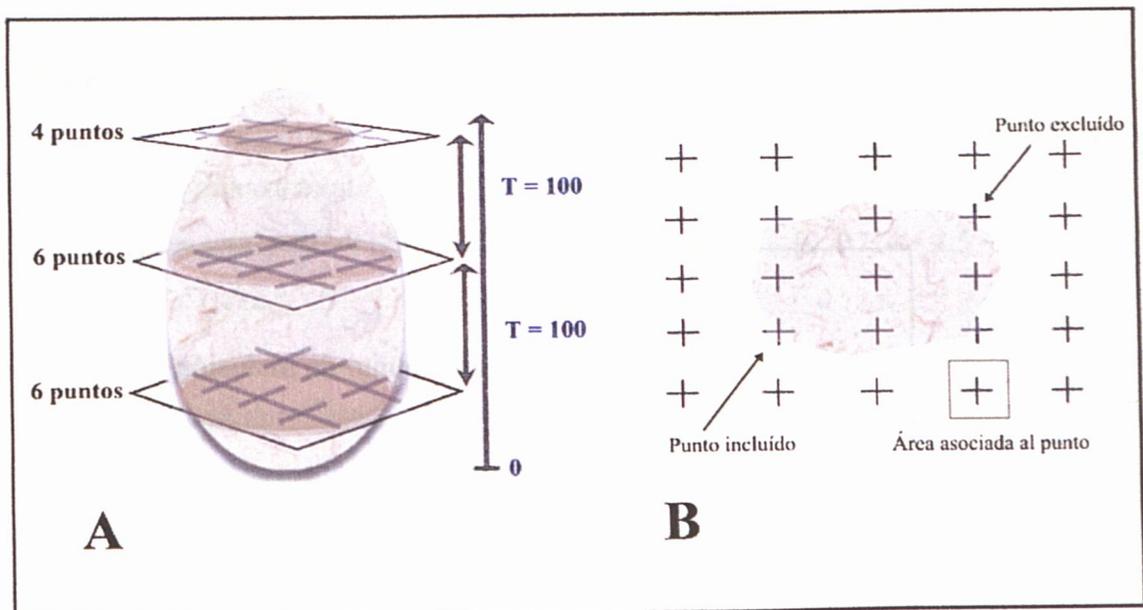


Figura 4.3.: Aplicación del principio de Cavalieri para la estimación del volumen de un cuerpo irregular. **A:** En este dibujo se representa la fragmentación del cuerpo a medir para posibilitar el cálculo del área de cada sección que contenga la estructura. **B:** Se expone un ejemplo de retícula que facilita el cálculo del área de cada sección, mediante el recuento de los puntos que incluyen la estructura, conociendo el área asociada al punto.

Sobre las retículas específicas que el programa de Estereología genera para la estimación del volumen de 120 puntos (10 verticales y 12 horizontales) se superpusieron aleatoriamente las secciones que contenían el núcleo de interés, visualizadas en el microscopio a un aumento de 4X, magnificación de 164X. Lo necesario para la estimación del volumen son puntos sobre un plano, entre los cuales hay un área conocida, que en nuestro caso era de $18468 \mu\text{m}^2$ [$a(p) = 18468 \mu\text{m}^2$]. Sin embargo la retícula empleada para este fin consta de cruces, que vienen a ser puntos formados por dos pequeñas rectas secantes. Por ello, el recuento de los puntos que se encontraban dentro del núcleo cuyo volumen quería estimarse sigue un criterio de inclusión y exclusión, según las características en el espacio de las cruces. Esto es, se consideraban y por tanto se contaban aquellas cruces cuyo punto central estaba incluido dentro del núcleo de interés y en los casos en los que ésta inclusión no quedase bien establecida, se contaban las cruces cuyos segmentos superior y/o lateral derecho estuviesen en el interior del área núcleo. Se excluían de recuento todas aquellas cruces que no cumpliesen estos requisitos (figura 4.4.) (Howard y Reed, 1998). De esta manera se

obtenía el total de puntos contabilizados por animal (ΣP_i), con los que se podía calcular el área individual de cada sección del núcleo analizada, al multiplicar ΣP_i por el área asociada al punto [a(p)].

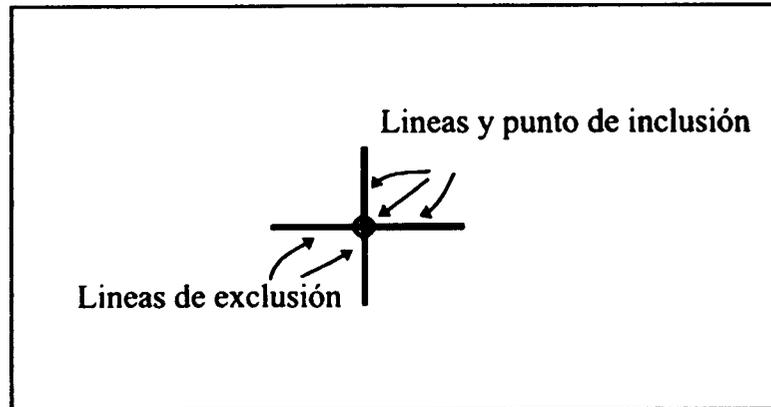


Figura 4.4.: Criterio de inclusión y exclusión para la estimación del volumen en el recuento de los puntos. Las líneas azules y el punto central serán contados si están en contacto con la estructura de interés, mientras que si son las líneas negras las que están en contacto, y no las azules, ese punto no será tomado en consideración.

Para estimar el volumen, lo que resta por hacer es considerar la distancia entre las secciones (t). De esta manera, la estimación del volumen del núcleo en cuestión para cada animal se calculó atendiendo a la siguiente fórmula:

$$V_t = [t \cdot a(p) \cdot \Sigma P_i]$$

$$V_t = \text{_____} = \text{_____} \text{ mm}^3$$

Para una estimación óptima del volumen de una estructura es necesario contar un máximo de 200 puntos en 10 a 15 secciones por objeto para tener un coeficiente de error (CE) del 5-10 %, aunque para los objetos de forma elipsoidal, este máximo de puntos puede reducirse (Gundersen y Jensen, 1987; Howard y Reed, 1998).

El cálculo del CE requiere la realización de la siguientes sumas:

$$a = \Sigma P_i \cdot P_i$$

$$b = \Sigma P_i \cdot P_{i+1}$$

$$c = \Sigma P_i \cdot P_{i+2}$$

Posteriormente, y según la fórmula que propusieron Gundersen y Jensen (1987), el cálculo del coeficiente de error se realiza de la siguiente manera:

$$CE = \sqrt{\text{Varianza total} / \Sigma Pi}$$

$$\text{Varianza total} = \{0,0724 \cdot 4,5 \cdot \sqrt{(n \cdot \Sigma Pi)} + [3(a - [0,0724 \cdot 4,5 \cdot \sqrt{(n \cdot \Sigma Pi)}] - 4b + c)]^{1/2}\}$$

Para la realización de todos estos cálculos, se empleó una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Excel 2000) elaborada para tal efecto.

4.1.4.2. Estimación de la población neuronal.

Para la estimación del número de neuronas se habían estado aplicando métodos como el recuento total de perfiles en secciones individuales, o como la reconstrucción serial completa del elemento en cuestión o por último, como los métodos basados en supuestos. Entre estos último, están el método de corrección de Abercrombie, que supone que las células son esféricas y el método de Konigsmark, que supone lo mismo que el anterior y, además, que la altura de una partícula invisible puede ser determinada (Coggeshall, 1992; Coggeshall y Lekan, 1996; West, 1999). Todos estos métodos consideraban las secciones histológicas a estudiar como planos bidimensionales y como tales las intentaban analizar, aunque suponían un consumo de tiempo y esfuerzo considerables, a pesar de proporcionar resultados sesgados y alejados del valor verdadero.

Sin embargo en 1984, bajo el pseudónimo de D. C. Sterio, que es un anagrama cuyas letras forman la palabra DiSeCtor, fue publicado un artículo que cambió por completo esta concepción bidimensional de los objetos a analizar. Su autor, un conocido estereólogo (Royet, 1991; Howard y Reed, 1998) describió y definió qué era el disector (Sterio, 1984). La idea central del disector es que las partículas con formas arbitrarias y situadas en un espacio de referencia tridimensional, pueden ser contadas considerando dos secciones paralelas consecutivas, cuyo grosor (Z) sea menor que la altura mínima de las partículas a contar (Pakkenberg y Gundersen, 1988). El término disector fue aplicado porque las secciones paralelas consecutivas son dos (*di-sector*). De esta manera, era

posible determinar si una misma partícula aparecía en la sección inferior y superior, para descartar el recuento repetido de ésta y considerar las partículas que habían aparecido una sola vez, contabilizándolas como Q^- (Gundersen y cols., 1988b; Coggeshall, 1992; Coggeshall y Lekan, 1996). Así se podía impedir la sobreestimación del número de partículas, problema que había existido previamente al establecimiento del método del disector físico (West y Gundersen, 1990; Coggeshall y Lekan, 1996).

La aportación del disector físico supuso una mejora considerable en cuanto a la ausencia de sesgo en la estimación del número de neuronas, pero poseía importantes desventajas como método Estereológico: era muy poco eficiente al consumir mucho tiempo por comparar dos secciones consecutivas y, a veces, era muy difícil distinguir si dos partículas eran o no la misma en diferentes secciones (Coggeshall y Lekan, 1996).

Entonces se ideó el método del disector óptico que, asumía los principios del disector físico y aportaba otros nuevos (Gundersen, 1986). El disector óptico es un paralelepípedo imaginario de unas dimensiones conocidas, situado en el interior de las secciones. Este disector no necesita de dos secciones consecutivas para ser comparadas pero, aún así, conserva el nombre de disector. Asimismo la estimación que proporciona es de la cantidad directa de objetos que hay un espacio tridimensional (Gundersen, 1986; Gundersen y cols., 1988b; Howard y Reed, 1998; Keuker y cols., 2001). Esta concepción de tridimensionalidad en una misma sección permitía poder hacer el recuento de las partículas que hubiese en el interior de las secciones, dentro del paralelepípedo imaginario cuyas coordenadas X, Y y Z eran conocidas (figura 4.5.). De esta manera, y en primer lugar, con este método se evita igualmente el recuento repetido de una misma partícula, ya que en el interior de este paralelepípedo imaginario se puede apreciar si las partículas son las mismas o no. En segundo lugar, otra ventaja de este método es que la orientación, la forma o el tamaño de las partículas a contar no son determinantes para el recuento (Royet, 1991; Howard y Reed, 1998). En tercer lugar el método del disector óptico aporta la enorme ventaja de que, puesto que lo que se cuantifica y analiza es una porción del interior de la sección, el problema del encogimiento en la superficie del tejido por la congelación no afectará ni sesgará la estimación. El tejido histológico, como se comentó previamente, se corta en el criostato a bajas temperaturas. Esto provoca, junto con el propio efecto del corte mecánico de una estructura blanda, que las superficies de las secciones no sean lisas, sino que estén

arrugadas y encogidas. Esto suponía que las partículas que estuviesen en algunas de las superficies podrían sobrestimarse o subestimarse, dando como resultado un valor sesgado. Con el disector óptico, este efecto se anula, puesto que las coordenadas interiores del paralelepípedo imaginario aseguran que en ninguna de sus caras haya encogimiento o arrugas.

A este respecto, los defensores de los métodos estereológicos, comentan las repercusiones científicas nefastas de un estudio, sesgado por este motivo, que tuvo confundida a la comunidad científica durante muchos años (Howard y Reed, 1998; West y Slomianka, 2001). En este trabajo que citan se comparó la pérdida neuronal en cerebros de personas ancianas y jóvenes basándose en métodos de recuento bidimensionales en el que extrajeron la conclusión de que la personas mayores iban perdiendo neuronas a medida que envejecían. Durante más de 30 años se intentó averiguar por qué ocurría esta pérdida, cuando lo que verdaderamente había sucedido era que durante la medición, no se consideró el encogimiento del tejido cerebral, que en los cerebros de jóvenes era mayor. Si el encogimiento era corregido, se encontró que la proporción de pérdida neuronal entre peronas jóvenes y ancianas era idéntica (Howard y Reed, 1998).

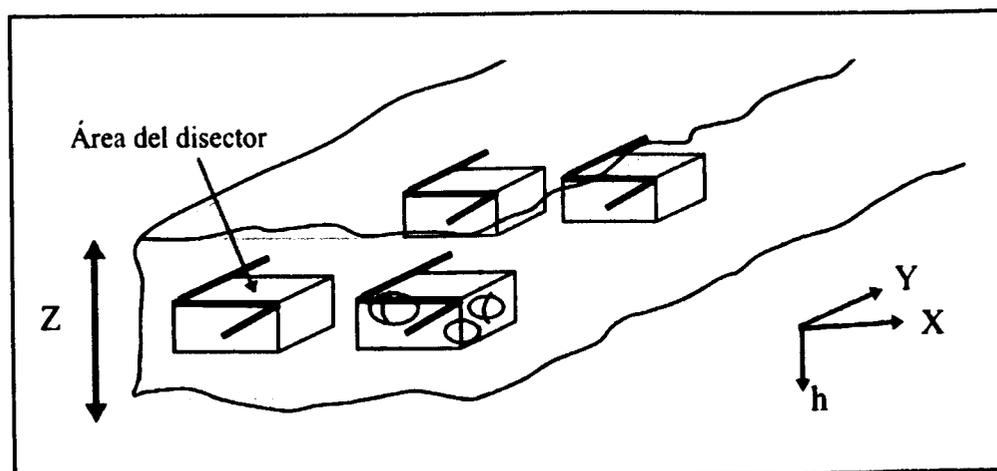


Figura 4.5.: Representación esquemática del principio del disector óptico. El disector supone la existencia de un paralelepípedo en el interior de las secciones, cuyas coordenadas X-Y-h son conocidas. Las células en el interior de esa figura serán las que se consideren en el recuento, evitando así el posible sesgo por el encoamiento del tejido.

El método del disector óptico, entre una de sus ventajas, aporta la de asegurar que las partículas no sean contadas más de una vez, como el disector físico. Pero, sin embargo, dentro de el paralelepípedo imaginario sobre el que se va a realizar el recuento, puede suceder que una misma célula aparezca dos veces en dos campos consecutivos que el programa aleatoriamente seleccione de la sección determinada y por ello, podría contarse dos veces la misma célula. Para evitar esto, existen, igual que sucedía con la estimación del volumen, retículas específicas para determinar el número de neuronas que hay en un campo, que poseen líneas de inclusión y exclusión (figura 4.6.). De esta manera, se contabilizan las neuronas que aparecen dentro del campo de inclusión, marcado por las líneas discontinuas de la retícula, y no las neuronas que aparezcan tocando las líneas de exclusión, líneas continuas, o dentro del campo prohibido. Así, la probabilidad de que una misma célula aparezca en dos campos consecutivos dentro de las regiones permitidas de recuento en los dos campos, es ínfima (Royet, 1991; Howard y Reed, 1998; Keuker y cols., 2001).

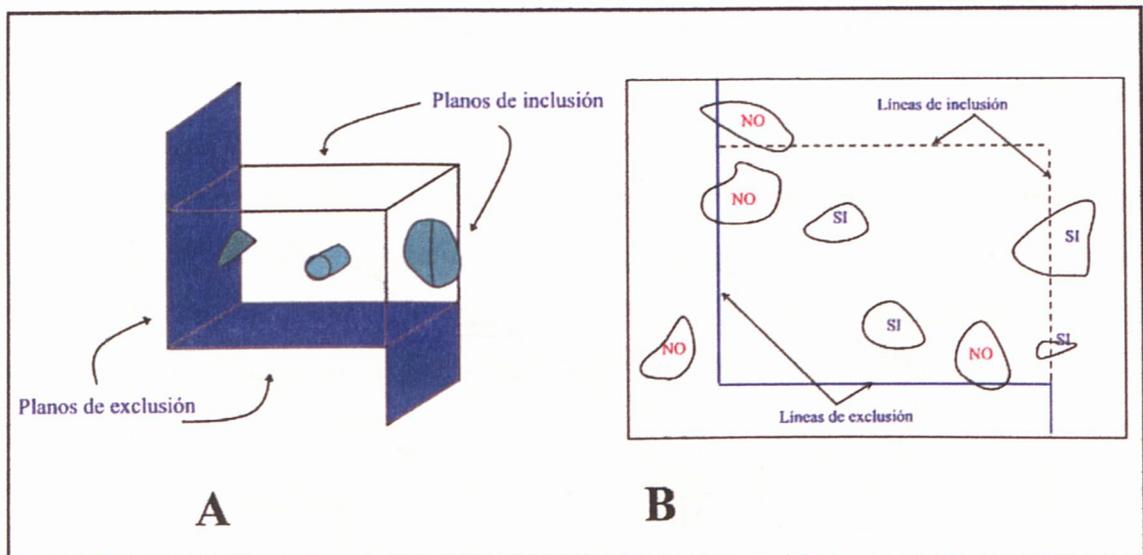


Figura 4.6.: Representación individual del disector óptico en su concepción tridimensional (A) y bidimensional (B). El recuento se realiza sobre la retícula bidimensional, pero considerando la inclusión de las células dentro del paralelepípedo tridimensional. Para evitar el recuento repetido de células en dos disectores o campos consecutivos, se aplican las líneas o planos de inclusión y exclusión representadas en el dibujo B con color azul (exclusión) y con línea punteada (inclusión).

Para contabilizar el número de neuronas de una región, además del disector óptico, se emplea el fraccionador, de tal manera que algunos autores llaman a este método que se sirve de ambas técnicas, el método del fraccionador óptico (West y cols., 1991). El fraccionador asume que, para conocer el total de partículas existentes en una región determinada, es necesario cuantificar las partículas en algunas secciones, pero siempre considerando la globalidad del objeto de interés y conociendo la segmentación que dicho objeto ha sufrido para la cuantificación de sus parámetros (Gundersen, 1986; Howard y Reed, 1998; Keuker y cols., 2001).

Por lo tanto, el método del fraccionador óptico tiene en cuenta todo lo expuesto hasta ahora y asume que, para conocer la estimación total del número de neuronas de una región cerebral, ha de tenerse en cuenta, en primer lugar, la altura del paralelepípedo imaginario que el disector óptico propone para la cuantificación de partículas, su eje Z (fracción de altura, **fh**). En segundo lugar, el área específica que posee la retícula de líneas de inclusión y exclusión empleada para el recuento (fracción del área, **fa**). Y por último, ha de tenerse en cuenta la seriación sistemática que ha sufrido el objeto de interés para la obtención de los parámetros morfológicos de interés (fracción de seriación, **fs**) (Howard y Reed, 1998; Keuker y cols., 2001). Combinado todos estos elementos, el número de partículas contadas por cada objeto (ΣQ) podrá representar el número total de partículas que ese objeto posee, aportando una estimación fiable, no sesgada y eficiente. La fórmula que permite obtener esta estimación, basándose en el fraccionador óptico es:

$$N = \Sigma Q \cdot fh \cdot fa \cdot fs$$

El procedimiento que nosotros seguimos para obtener el número de neuronas de las diferentes subdivisiones del NEST, basándonos en el fraccionador óptico, es el que se expone a continuación.

En primer lugar, la fracción de seriación (**fs**), que en nuestro caso fue de 2, ya que, al igual que para la estimación del volumen, se consideró para el recuento una de cada dos secciones dejando una sin contabilizar entre dos secciones analizadas. La primera de las secciones escogidas se seleccionó de manera aleatoria, siguiendo el mismo procedimiento que el empleado para la volumetría, puesto que es requisito

indispensable para la correcta estimación que sea elegida de esta manera (Gundersen, 1986; Gundersen y cols., 1988b).

Para realizar el recuento, previamente delimitamos el área de la región a analizar a un aumento de 4X en el microscopio, con una magnificación de 164X. Haciendo esto, el programa de Estereología genera unos campos que, siguiendo unos pasos cuyas coordenadas le hemos introducido previamente (en nuestro caso, un desplazamiento horizontal de 90 μm y vertical de 90 μm), barren la estructura en cuestión de manera aleatoria y producen los campos que posteriormente, a un aumento de 100X, magnificación de 4064X, con aceite de inmersión, se analizarán y contabilizan. Se consideraron como pertenecientes al NEST aquellos campos que, a un aumento de 4X incluían holgadamente el núcleo en el interior de la retícula menor o bien, en los casos donde esta inclusión no fuera tan evidente, que parte de las líneas de inclusión de la retícula menor estuvieran en contacto con el área del núcleo. La fracción del área (**fa**), por tanto, quedaba establecida tras dividir la multiplicación del paso X e Y (en nuestro caso, 90 x 90) entre el área de la retícula mayor (en nuestro caso, 842 μm^2), dando como resultado una $fa = 9,62$.

Finalmente, la fracción de altura (**fh**) se determinó utilizando el microcator en cada una de los campos de las secciones analizadas. Las secciones fueron cortadas a 50 μm , pero por el consiguiente encogimiento posterior, el grosor final de éstas era de unas 25 μm aproximadamente. La medida que se consideró idónea para la altura del disector o paralelepípedo imaginario fue de 12 μm , con lo cual, las neuronas que entraban en ese grosor, cuyos núcleos y/o nucleolos fueran discernibles (West y cols., 1991; West y cols., 1994) y que se encontrasen incluidos en los campos permitidos de recuento, fueron contabilizadas. El grosor medio de las secciones, medido con el microcator (Z) en cada campo fue ponderado y la fracción de altura se determinó dividiendo esta media ponderada entre el grosor establecido para el disector, de esta manera: $fh = Z \text{ ponderada}/12$.

El recuento óptimo de número de neuronas no debe superar las 100 a 200 neuronas, contadas en 10 a 20 secciones, empleando 100 a 200 disectores y contando de 1 a 2 células por cada disector (Gundersen y cols., 1981; Gundersen, 1986; Gundersen y Jensen, 1987; Guillery y Herrup, 1997). Con esta cantidad, además de satisfacer una de

las máximas que la Estereología persigue, la eficiencia, se garantiza que el coeficiente de error (CE) se sitúe por debajo de 0,10. Cuando esto no sea así, será necesario modificar el paso X-Y, o el intervalo analizado entre secciones o el número de individuos considerados para el recuento (Keuker y cols., 2001).

Para calcular el CE en la estimación del número de neuronas, se sigue un procedimiento parecido al que se llevó a cabo para la estimación del volumen. Es necesario realizar las siguientes sumas:

$$a = \sum Q^- \cdot Q^-$$

$$b = \sum Q^- \cdot Q^-_{+1}$$

$$c = \sum Q^- \cdot Q^-_{+2}$$

Posteriormente el cálculo del coeficiente de error se realiza de la siguiente manera:

$$CE = \sqrt{\text{Varianza total} / \sum Q^-}$$

$$\text{Varianza total} = \{0,0724 \cdot 4,5 \cdot \sqrt{(n \cdot \sum Q^-)} + [3(a - [0,0724 \cdot 4,5 \cdot \sqrt{(n \cdot \sum Q^-)})] - 4b + c)\}^{1/12}$$

Para la realización de estos cálculos, al igual que para los cálculos relativos al volumen, se empleó una hoja de cálculo de Excel (Microsoft 2000) elaborada para este propósito.

4.1.5. Técnicas de análisis de datos.

Para establecer las posibles diferencias entre los grupos estudiados respecto al peso corporal de los animales (variable dependiente) se consideraron dos variables independientes: sexo, con dos niveles (macho y hembra) y condición genética, con tres niveles (*Tfm*, hermano de *Tfm* y control de la misma raza). Una vez confirmada la homogeneidad de varianza de los datos obtenidos, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) bilateral univariado. Posteriormente se aplicó una prueba *post hoc*,

Bonferroni, con objeto de esclarecer las diferencias significativas entre todos los grupos experimentales.

En el caso de los pesos de los diferentes componentes del aparato sexual masculino, variable dependiente de 4 niveles (peso testículos, peso próstata, peso epidídimo, peso vesícula seminal), con una sola variable independiente, condición genética, de tres niveles (macho *Tfm*, macho hermano de *Tfm* y macho control de la misma raza) se procedió igual que en el anterior caso. Una vez confirmada la homogeneidad de varianza se sometieron los datos obtenidos a un análisis de varianza (ANOVA) bilateral univariado. Posteriormente, los datos fueron analizados con una prueba *post hoc*, Bonferroni, con objeto de determinar las diferencias significativas existentes entre los grupos experimentales.

Finalmente, para establecer las posibles diferencias significativas respecto a los parámetros morfológicos del NEST en los diferentes grupos, se analizaron los datos de la siguiente manera: las variables dependientes fueron dos (volumen y número de neuronas) con tres niveles cada una (subdivisiones NESTma, NESTla y NESTpm), mientras que las variables independientes fueron sexo, con dos niveles (macho y hembra) y condición genética, con tres niveles (*Tfm*, hermano de *Tfm* y control de la misma raza). La prueba estadísticas empleada para determinar las posibles diferencias entre los grupos fue el análisis de varianza unilateral no paramétrico de Kruskal-Wallis y posteriormente el test U-Mann-Whitney para determinar las diferencias específicas entre los grupos. Se emplearon éstas debido a la falta de homogeneidad de varianza entre los grupos, requisito indispensable para el análisis de varianza (ANOVA) bilateral. El contraste Kruskal-Wallis es la alternativa no paramétrica del método ANOVA, al servir igual que ésta para contrastar hipótesis sobre una población cuyas muestras han sido elegidas aleatoriamente.

Para llevar a cabo estos análisis se emplearon los programas SPSS versión 10.0 para Windows, los programas gráficos Power Point, Microsoft PhotoDraw y Adobe PhotoShop para Windows.

4.2. RESULTADOS.

4.2.1. Pesos corporales.

Los pesos corporales de los diferentes grupos, que son los mismos grupos y animales que se emplearon para el registro de la morfología cerebral, pesados todos a la edad de 90 días, son los siguientes (tabla 4.1.):

Machos			Hembras		
<i>Tfm</i>	Hermano	Control misma raza	<i>Tfm</i>	Hermana	Control misma raza
353 gr ± 18.25	441 gr ± 51.26	440 gr ± 9.78	277 gr ± 10.06	264 gr ± 4.3	269 gr ± 6.9

Tabla 4.1. : Medias ± EMS (error de la media estandar) de los pesos corporales de todos los grupos experimentales.

Tras el ANOVA multivariado, se encontró efecto principal del sexo ($F_{1, 33} = 81,514$; $p < 0,0001$), pero no hubo efecto principal de la condición genética ($F_{2, 33} = 2,851$; n.s.) aunque sí hubo interacción significativa entre sexo y condición genética ($F_{2, 33} = 4,536$; $p < 0,018$).

El análisis *post hoc* revela que el grupo de machos hermanos difirió significativamente las hembras *Tfm* (MH vs HT*fm*; $p < 0,0001$), de las hembras hermanas (MH vs HH; $p < 0,0001$) y de las hembras de la misma raza (MH vs HMR; $p < 0,0001$). Igual sucedió con los machos de la misma raza, que difirieron significativamente las hembras *Tfm* (MMR vs HT*fm*; $p < 0,0001$), de las hembras hermanas (MMR vs HH; $p < 0,0001$) y de las hembras de la misma raza (MMR vs HMR; $p < 0,0001$).

Sin embargo, el grupo de machos *Tfm*, al presentar un peso corporal intermedio entre los grupos de machos y hembras, difirió significativamente con dos grupos de hembras, las hermanas (MT*fm* vs HH; $p < 0,036$) y las hembras de la misma raza (MT*fm*

vs HMR; $p < 0,040$), pero no con el grupo de hembras *Tfm* (*MTfm* vs *HTfm*; $p < 0,090$; n. s.). A su vez, este grupo de machos *Tfm* difirió significativamente de los machos de la misma raza (*MTfm* vs MMR; $p < 0,031$), pero no difirió del grupo de machos hermanos (*MTfm* vs MH; $p < 0,058$; n. s.).

Estas diferencias combinadas con machos y hembras pone de manifiesto la posición intermedia que el grupo de *MTfm* ocupa respecto a los machos y a las hembras en cuanto a su peso corporal, posición intermedia que puede apreciarse en el gráfico de la figura 4.7. que se expone a continuación.

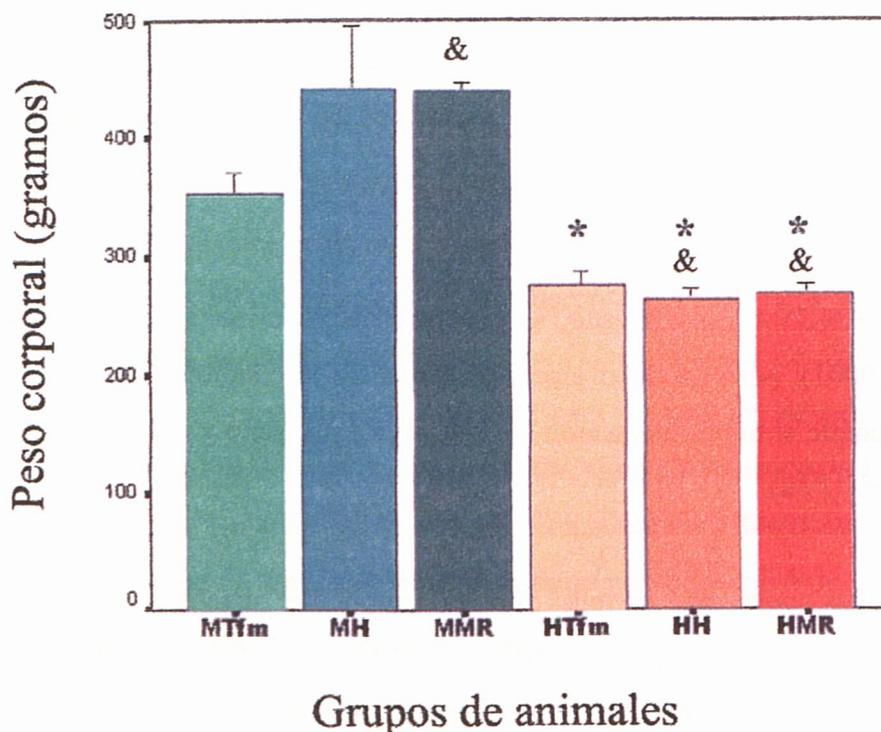


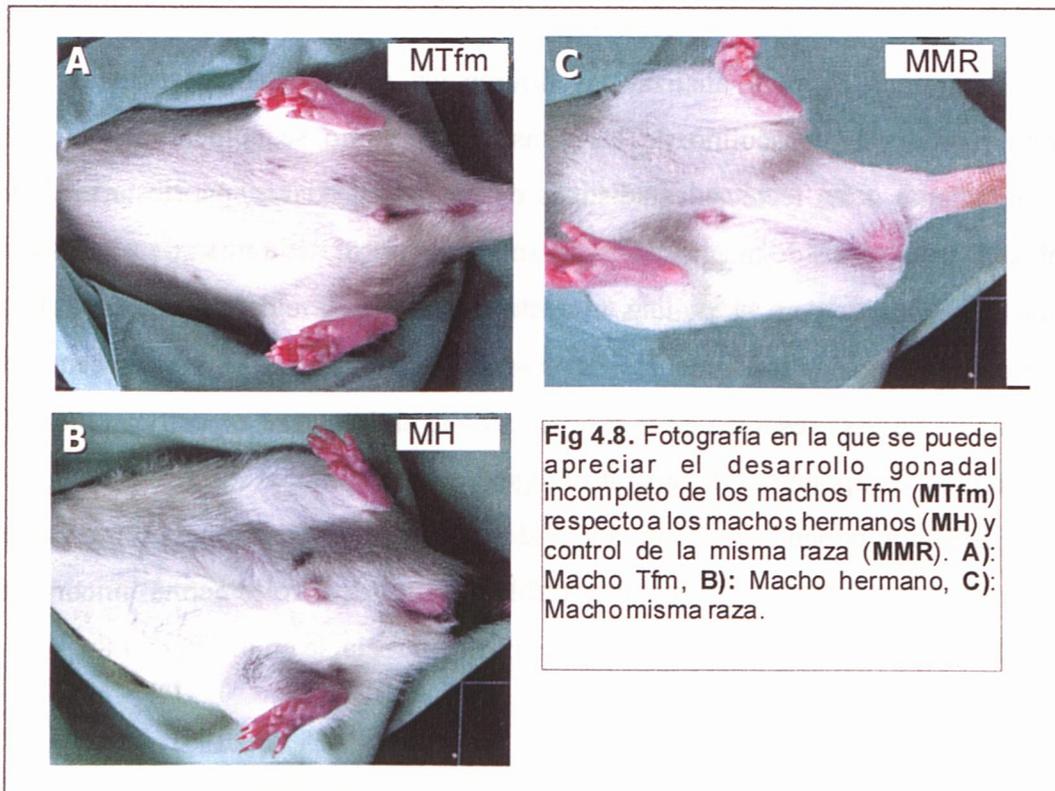
Figura 4.7. Representación gráfica de las medias de los pesos corporales en gramos de los grupos analizados (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza). En la gráfica puede apreciarse que todos los grupos de hembras difieren significativamente de los machos hermanos (MH) y de los machos de la misma raza (MMR). Los machos *Tfm*, al tener un peso intermedio, difieren significativamente de las hembras hermanas (HH) y de la misma raza (HMR) y de los machos de la misma raza (MMR).
 *: $p < 0,001$ respecto a los grupos machos hermanos (MH) y de la misma raza (MMR).
 &: $p < 0,05$ respecto al grupo *MTfm*.

4.2.2. Peso de los componentes del aparato urogenital masculino

Pasaremos ahora a analizar las diferencias encontradas respecto al peso del aparato reproductor masculino de las ratas. Tal y como se comentó en el apartado correspondiente a las técnicas estadísticas de análisis de datos, para esta medición se emplearon tres grupos de machos: *Tfm*, hermano y control de la misma raza, los mismos animales empleados para el análisis morfológico cerebral, registrándose en todos ellos los pesos en gramos de los testículos, la próstata, el epidídimo y la vesícula seminal. Los pesos encontrados se resumen en la siguiente tabla, en la que se especifican los pesos de los diferentes componentes del aparato urogenital masculino en los diferentes grupos en los que estos componentes existían, anotándose 0 para los grupos que no presentaban ni siquiera vestigios de estos componentes (tabla 4.2.). El desarrollo genital incompleto de los machos *Tfm* respecto a los otros machos puede apreciarse en la figura 4.8.

	MTfm	MH	MMR
Testículos (gr.)	1.188 ± 0.1241	3.670 ± 0.1142	3.9032 ± 0.1462
Próstata (gr.)	0	0.766 ± 0.0828	0.698 ± 0.0823
Epidídimo (gr.)	0	0.5387 ± 0.0159	0.5597 ± 0.0164
Vesícula seminal (gr.)	0	1.656 ± 0.1491	1.9136 ± 0.0354

Tabla 4.2.: Medias ± EMS (error de la media estandar) de los pesos en gramos de los diferentes componentes del aparato urogenital masculino (testículos, próstata, epidídimo y vesícula seminal) en los grupos de machos (**MTfm**: machos *Tfm*, **MH**: machos hermanos y **MMR**: machos de la misma raza). Cuando no existía ni el más mínimo vestigio de estos componentes, se anotaba 0 para el peso de esa estructura.



En este caso sólo hay un nivel para la variable dependiente (condición genética), ya que todos los animales registrados fueron machos. Por este motivo el ANOVA que se llevó a cabo fue univariado. De esta manera se determinó que, para todas las variables registradas, existían diferencias significativas: peso de testículos [$F_{2,15} = 141,686$; $p < 0,0001$]; peso de próstata [$F_{2,15} = 50,319$; $p < 0,0001$]; peso de epidídimo [$F_{2,15} = 735,138$; $p < 0,0001$]; y por último, peso de vesícula seminal [$F_{2,15} = 217,365$; $p < 0,0001$].

Pasando a las pruebas *post hoc* se detectaron diferencias significativas entre los machos *Tfm* con el resto de los grupos, en todas las variables: peso testículos (*MTfm* vs *MH*; $p < 0,0001$; *MTfm* vs *MMR*; $p < 0,0001$); peso próstata (*MTfm* vs *MH*; $p < 0,0001$; *MTfm* vs *MMR*; $p < 0,0001$); peso epidídimo (*MTfm* vs *MH*; $p < 0,0001$; *MTfm* vs *MMR*; $p < 0,0001$); y por último, peso vesícula seminal (*MTfm* vs *MH*; $p < 0,0001$; *MTfm* vs *MMR*; $p < 0,0001$).

Los grupos MH y MMR no difieren significativamente entre ellos en ningún parámetro registrado. Estas comparaciones pueden apreciarse en el gráfico que se expone a continuación en la figura 4.9.

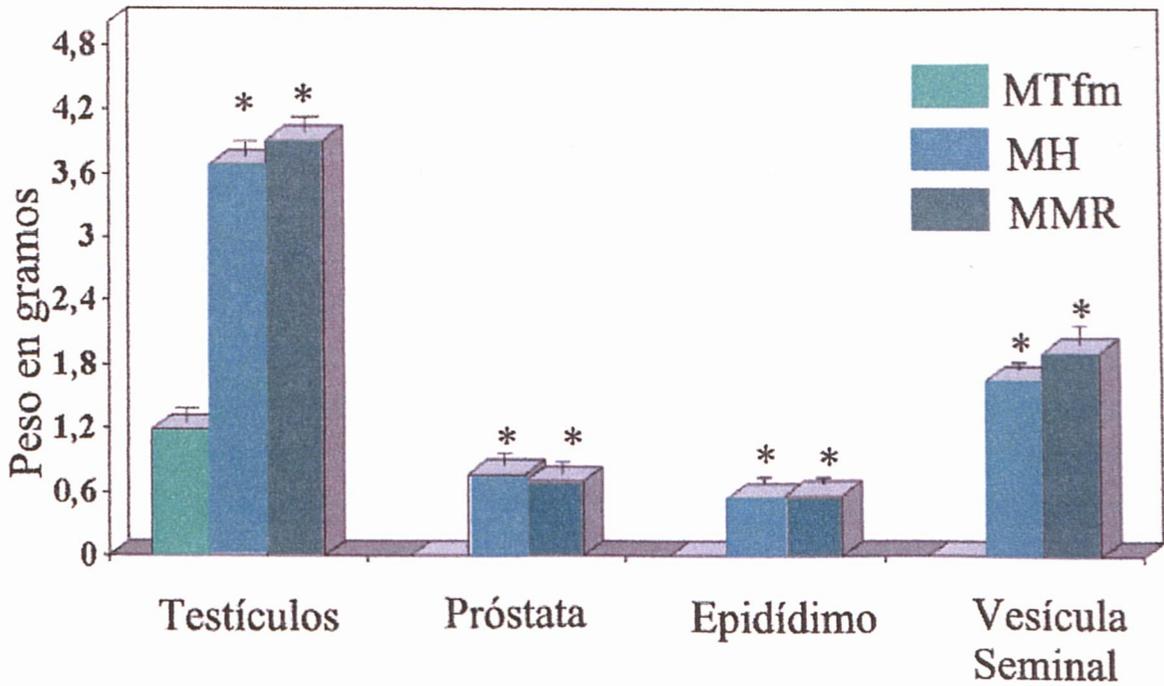


Figura 4.9.: Representación gráfica de las medias de los pesos de los componentes del aparato urogenital masculino (testículos, próstata, epidídimo y vesícula seminal) en todos los grupos de machos (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos y **MMR**: machos de la misma raza). Se puede apreciar que en todas las variables registradas los machos *Tfm* difieren significativamente de los machos hermanos (MH) y de la misma raza (MMR).

*: $p < 0,001$ respecto al grupo *MTfm*.

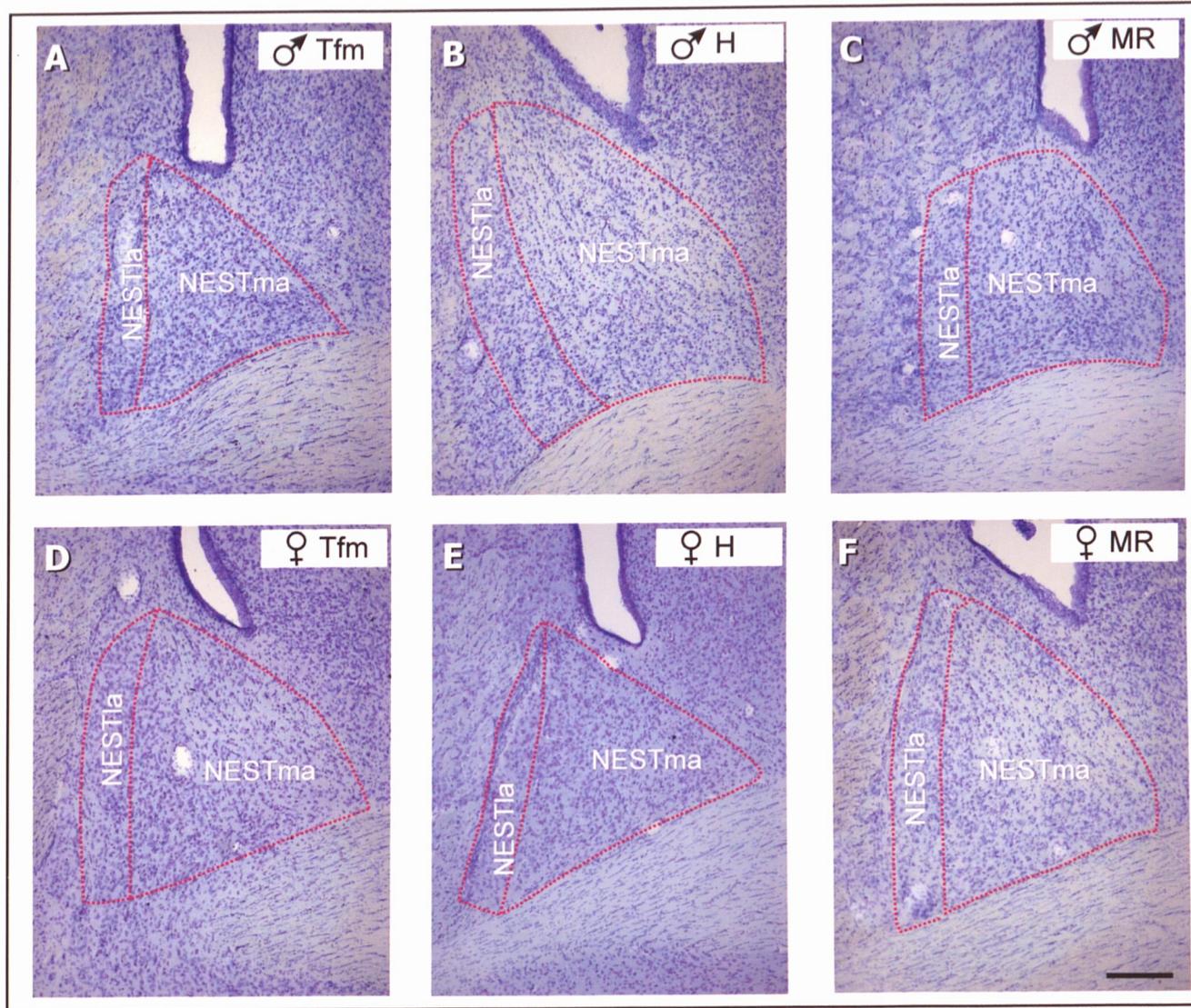


Figura 4.10. Microfotografías que muestran las diferentes subdivisiones sobre las que se llevó a cabo el análisis estereológico del volumen y número de neuronas. **A:** Subdivisión NESTma y NESTla en el grupo MTfm **B:** Subdivisión NESTma y NESTla en el grupo MH. **C:** Subdivisión NESTma y NESTla en el grupo MMR. **D:** Subdivisión NESTma y NESTla en el grupo HTfm. **E:** Subdivisión NESTma y NESTla en el grupo HH. **F:** Subdivisión NESTma y NESTla en el grupo HMR. Barra = 200 μ m.

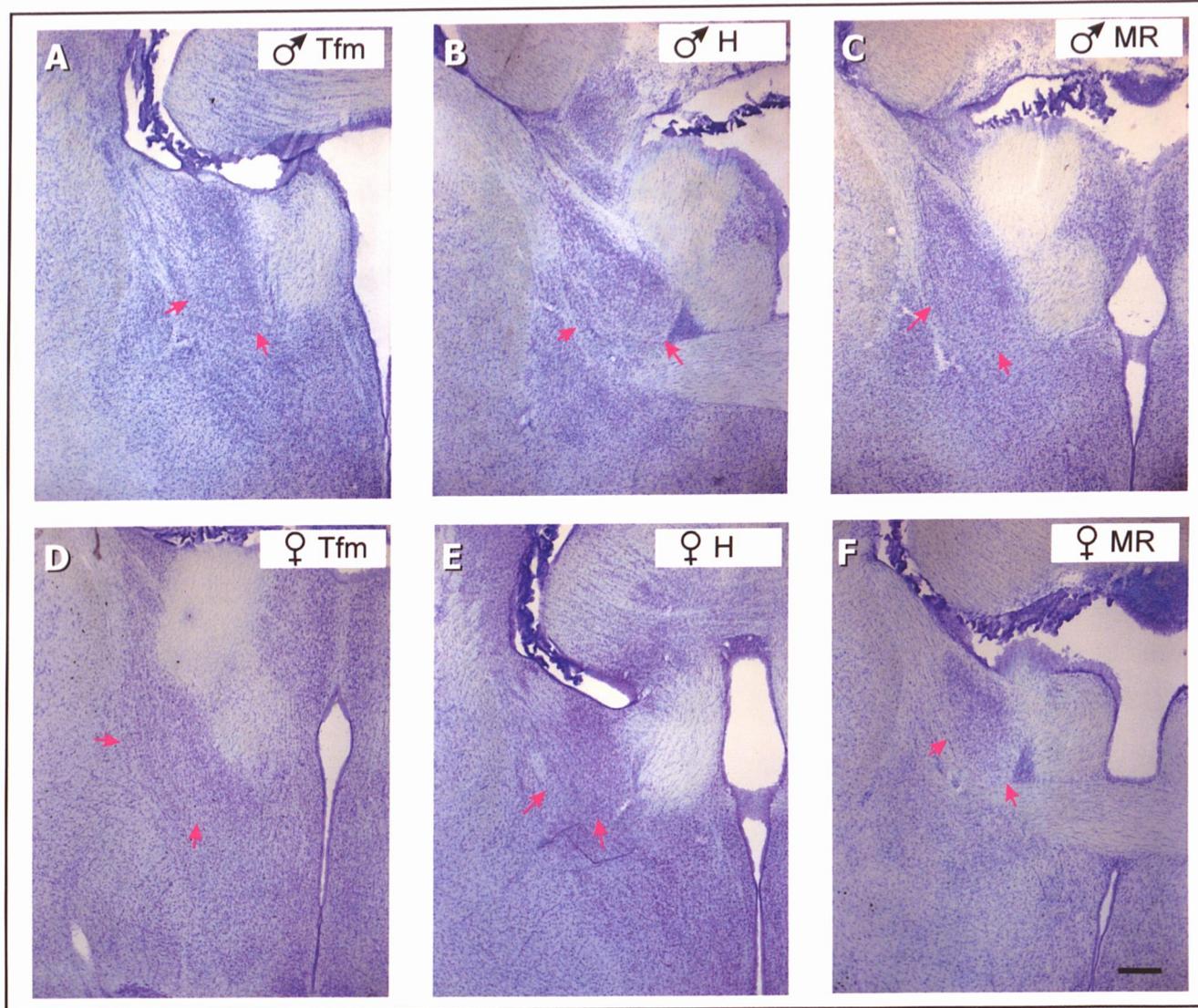


Figura 4.11. Microfotografías que muestran la subdivisión NESTpm en los diferentes grupos experimentales sobre los que se llevó a cabo el análisis estereológico. **A:** Subdivisión NESTpm en el grupo MTfm **B:** Subdivisión NESTpm en el grupo MH. **C:** Subdivisión NESTpm en el grupo MMR. **D:** Subdivisión NESTpm en el grupo HTfm. **E:** Subdivisión NESTpm en el grupo HH. **F:** Subdivisión NESTpm en el grupo HMR. Barra = 300 μ m.

4.2.3. Volumetría y estimación de la población neuronal del NESTma, NESTla y NESTpm.

Para los registros de volumen y número de neuronas en cada una de las subdivisiones del NEST se emplearon los mismos animales que los registrados anteriormente para el peso corporal y el peso de los componentes del aparato sexual masculino. Las subdivisiones analizadas fueron la parte medial anterior del NEST (NESTma), la parte lateral anterior del NEST (NESTla) y la parte medial posterior del NEST (NESTpm) (figura 4.10. y 4.11).

Región medial anterior del NEST (NESTma)

La prueba Kruskal-Wallis refleja que, respecto al volumen del NESTma, no existen diferencias significativas ($H = 3,06$; $p = 0,689$; n. s.), pero sí hay diferencias en cuanto al número de neuronas del NESTma ($H = 14,52$; $p = 0,013$), indicando que probablemente en este parámetro los grupos diferirán entre ellos.

En el volumen del NESTma, como cabía esperar por las pruebas Kruskal-Wallis, no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos existentes, ni entre sexos de grupos homólogos, ni entre machos entre sí o hembras entre sí de grupos diferentes ni entre ninguna otra comparación.

Para el número de neuronas del NESTma no se dan diferencias entre sexos ($MTfm$ vs $HTfm$; $p < 0,949$; n. s.; MH vs HH ; $p < 0,10$; n. s.; MMR vs HMR ; $p < 0,565$; n. s.). Por o tanto, en esta estructura y en estos grupos no se da dimorfismo sexual, al ser una estructura sexualmente isomorfa.

Comparando grupos de machos para el número de neuronas, hubo diferencias significativas entre los machos hermanos, al poseer éstos los valores superiores, y los machos de la misma raza, al presentar éstos unos valores muy reducidos (MH vs MMR ;

$p < 0,012$). En el resto de comparaciones entre los machos no hubo diferencias significativas (*MTfm* vs *MH*; $p < 0,088$; n. s.; *MTfm* vs *MMR*; $p < 0,406$; n. s.).

Por su parte, entre las hembras hubo diferencias significativas para el número de neuronas, concretamente entre las hembras de la misma raza, al poseer éstas los valores más reducidos, y las hembras *Tfm* y hermanas (*HMR* vs *HTfm*; $p < 0,035$; *HMR* vs *HH*; $p < 0,046$). Las hembras hermanas y las *Tfm* no difirieron significativamente entre ellas (*HTfm* vs *HH*; $p < 0,253$; n. s.).

El grupo de machos hermanos, al presentar éstos el mayor valor, difiere significativamente de los grupos de hembras *Tfm* y de las hembra de la misma raza: (*MH* vs *HTfm*; $p < 0,012$; *MH* vs *HMR*; $p < 0,004$) (tabla 4.3 y figura 4.12).

		Número de neuronas del NESTma				
	<i>MTfm</i>	<i>MH</i>	<i>MMR</i>	<i>HTfm</i>	<i>HH</i>	<i>HMR</i>
<i>MTfm</i>	-					
<i>MH</i>		-	$p < 0,012$	$p < 0,012$		$p < 0,004$
<i>MMR</i>			-			
<i>HTfm</i>				-		$p < 0,035$
<i>HH</i>					-	$p < 0,046$
<i>HMR</i>						-

Tabla 4.3.: En esta tabla se muestran los resultados de las comparaciones entre grupos (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza) con la prueba U-Mann-Whitney para el número de neuronas del NESTma. En el volumen del NESTma no existen diferencias significativas entre ningún grupo. Se puede apreciar que el grupo **HMR** difiere significativamente con los **MH** y con las hembras **HTfm** y **HH**. Las **HTfm** y los **MMR** también difieren significativamente de los **MH**.

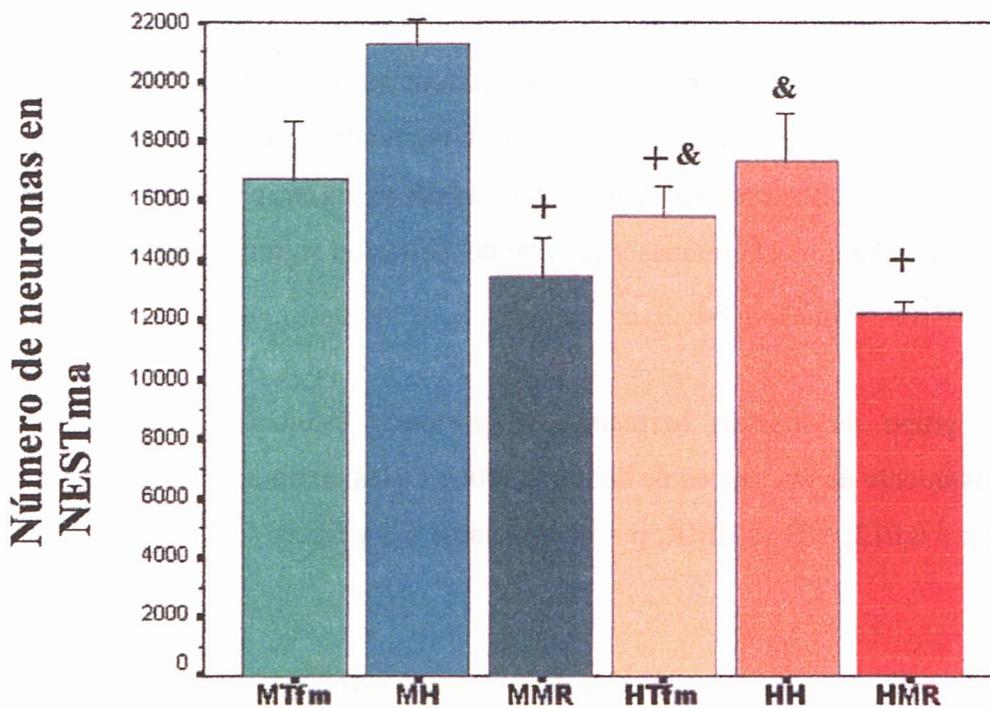


Figura 4.12.: Representación gráfica del número de neuronas en la subdivisión NESTma para cada grupo analizado (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza). En la gráfica se aprecia que el grupo MH, difiere significativamente de las hembras *HTfm*, HMR y del grupo de machos MMR. Las HMR, a su vez, difieren significativamente de las otras hembras, *HTfm* y HH.

+: $p < 0,03$ respecto al grupo MH.

&: $p < 0,05$ respecto al grupo HMR.

Región lateral anterior del NEST (NESTla).

La prueba Kruskal-Wallis refleja, igual que en el caso del NESTma, que respecto al volumen del NESTla, no existen diferencias significativas ($H = 6,03$; $p = 0,303$; n. s.). Igual que sucede para el NESTma, cuando lo que se compara es el número de neuronas, sí existen diferencias significativas, dejando entrever la posible existencia de diferencias entre grupos específicos ($H = 13,92$; $p = 0,016$).

Empezando a abordar el volumen de la estructura, de nuevo tenemos que no existen diferencias significativas entre grupos homólogos de sexos opuestos, ni entre los machos entre sí o las hembras entre sí. La única diferencia significativa que hay en el volumen del NESTla es la que se da entre los machos *Tfm*, al poseer éstos el volumen

mayor del NESTla, y las hembras de la misma raza (*MTfm* vs HMR; $p < 0,048$) (figura 4.13. y tabla 4.4.).

	Volumen del NESTla						Número de neuronas del NESTla					
	<i>MTfm</i>	MH	MMR	<i>HTfm</i>	HH	HMR	<i>MTfm</i>	MH	MMR	<i>HTfm</i>	HH	HMR
<i>MTfm</i>	-					$p < 0,048$	-		$p < 0,035$			$p < 0,035$
MH		-						-	$p < 0,012$			$p < 0,019$
MMR			-						-	$p < 0,035$		
<i>HTfm</i>				-						-		$p < 0,018$
HH					-						-	
HMR												-

Tabla 4.4.: En esta tabla se muestran los resultados de las comparaciones entre grupos (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza) con la prueba U-Mann-Whitney para el número de neuronas y el volumen del NESTla. Se puede apreciar que el grupo HMR difiere significativamente con los MH, los *MTfm* y con la hembra *HTfm*. Entre los machos hay diferencias entre el grupo MMR y los otros grupos de machos.

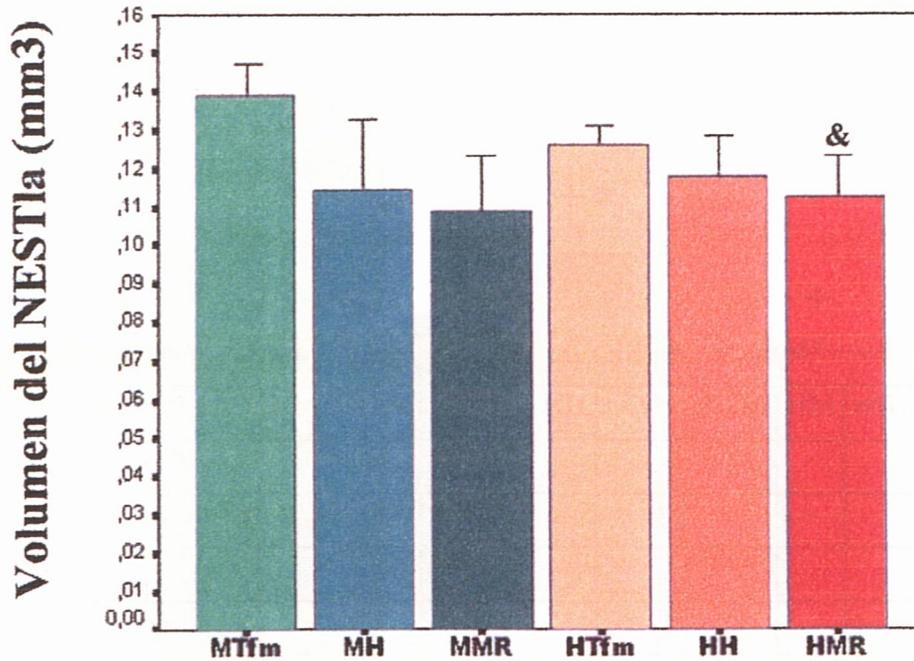


Figura 4.13.: Representación gráfica del volumen del NESTla en mm³ en los diferentes grupos experimentales (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza).
&: $p < 0,05$ respecto al grupo *MTfm*.

Refiriéndonos ahora al número de neuronas, se puede apreciar que no existen diferencias sexuales entre machos y hembras de los mismos grupos en la variable de número de neuronas del NESTla (*MTfm vs HTfm*; $p < 0,338$; n. s.; *MH vs HH*; $p < 0,361$; n. s.; *MMR vs HMR*; $p < 0,848$; n. s.), constatando así, igual que en el caso anterior, la ausencia de dimorfismo sexual, al tratarse igual que en el caso anterior, de una estructura sexualmente isomorfa.

En los grupos de machos, respecto al número de neuronas, se dan diferencias significativas entre los machos de la misma raza, al poseer un número de neuronas inferior al resto y los grupos de machos hermanos y de machos *Tfm* (*MMR vs MH*; $p < 0,012$; *MMR vs MTfm*; $p < 0,035$). De nuevo, los grupos de machos *Tfm* y hermanos no difirieron significativamente entre ellos (*MTfm vs MH*; $p < 0,223$; n.s.).

Por su parte, para el número de neuronas del NESTIa de las hembras, difieren significativamente las hembras *Tfm* de las control de la misma raza (*HTfm* vs *HMR*; $p < 0,018$). Los otros grupos de hembras no difieren entre sí (*HTfm* vs *HH*; $p < 0,775$; n. s.; *HH* vs *HMR*; $p < 0,116$; n. s.).

En el resto de comparaciones entre los grupos, en cuanto al número de neuronas del NESTIa, el grupo de hembras de la misma raza difiere significativamente de los grupos de machos *Tfm* y hermanos, al poseer éstos unos valores numéricos superiores (*HMR* vs *MH*; $p < 0,019$; *HMR* vs *MTfm*; $p < 0,035$). El grupo *MTfm* también difiere significativamente de los grupos de machos de la misma raza y hembras de la misma raza (*MTfm* vs *MMR*; $p < 0,035$; *MTfm* vs *HMR*; $p < 0,035$). Las hembras *Tfm*, al presentar unos valores numéricos similares a los que presentaron los machos hermanos y *Tfm*, también difieren significativamente del grupo de machos de la misma raza (*HTfm* vs *MMR*; $p < 0,035$) (tabla 4.4. y figura 4.14).

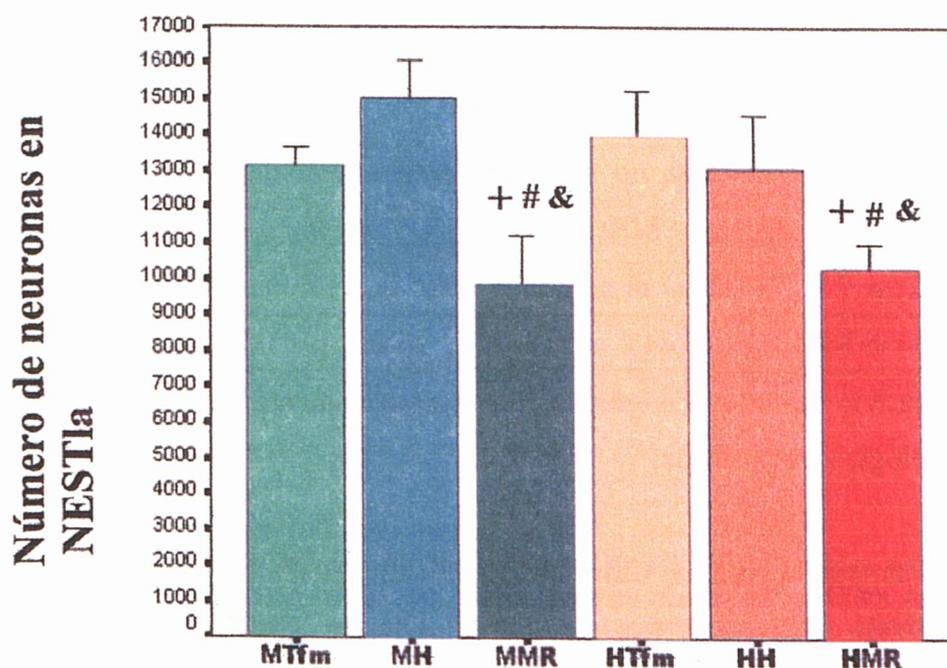


Figura 4.14.: Representación gráfica del número de neuronas que cada grupo presentó (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza) en la subdivisión NESTIa. Se puede apreciar que los grupos **MMR** y **HMR**, difirieron significativamente con los grupos que mayores valores presentaron (**MTfm**, **MH** y **HTfm**).

+: $p < 0,03$ respecto al grupo **MH**.

#: $p < 0,01$ respecto al grupo **MTfm**.

&: $p < 0,05$ respecto al grupo **HTfm**.

Región medial posterior del NEST (NESTpm).

La prueba Kruskal-Wallis indica que en la subdivisión NESTpm se dan diferencias significativas respecto a su volumen ($H = 16,291$; $p = 0,006$) y respecto a su número de neuronas ($H = 17,622$; $p = 0,003$), indicando que, en este caso, las comparaciones entre grupos revelarán, con más frecuencia, diferencias significativas entre los grupos en ambos parámetros morfológicos.

En este caso sí existen diferencias significativas entre los sexos de los grupos de la misma raza, tanto para el volumen del NESTpm (MMR vs HMR; $p < 0,002$) como para el número de neuronas (MMR vs HMR; $p < 0,004$). Sin embargo, entre los otros grupos no existen diferencias significativas entre los sexos, ni para el volumen del NESTpm (MTfm vs HTfm; $p < 0,125$; n. s.; MH vs HH; $p < 0,10$; n. s.) ni para el número de neuronas del NESTpm (MTfm vs HTfm; $p < 0,225$; n. s.; MH vs HH; $p < 0,144$; n. s.). De esta manera, queda constatada la existencia de dimorfismo sexual en la subdivisión NESTpm, tanto para su volumen como para su número de neuronas, al darse dimorfismo sexual entre los grupos control de la misma raza machos y hembras.

Comparando a los machos, no se encontraron diferencias significativas entre ellos, ni para el volumen (MTfm vs MH; $p < 0,570$; n. s.; MTfm vs MMR; $p < 0,898$; n. s.; MH vs MMR; $p < 0,871$; n. s.) ni para el número de neuronas (MTfm vs MH; $p < 0,465$; n. s.; MTfm vs MMR; $p < 0,848$; n. s.; MH vs MMR; $p < 0,291$; n. s.), ya que los valores de los machos de todos los grupos fueron prácticamente idénticos en los dos parámetros morfológicos registrados.

Las hembras, por su parte no difirieron significativamente entre ellas respecto al volumen del NESTpm (HTfm vs HH; $p < 0,830$; n. s.; HTfm vs HMR; $p < 0,141$; n. s.; HH vs HMR; $p < 0,224$; n. s.). Sin embargo, para el número de neuronas, sí hubo diferencias significativas entre las hembras de la misma raza y los otros dos grupos de hembras, las Tfm y las hermanas (HMR vs HTfm; $p < 0,013$; HMR vs HH; $p < 0,015$). Las hembras Tfm y las hermanas, como viene siendo habitual entre estos dos grupos de cualquier sexo, no difirieron significativamente entre ellas ni en volumen ni en número

de neuronas (volumen: *HTfm* vs *HH*; $p < 0,830$; n. s.; número de neuronas: *HTfm* vs *HH*; $p < 0,568$; n. s.).

Para el resto de comparaciones entre grupos, se aprecia que el grupo de machos hermanos, al poseer los valores mayores, tanto para el volumen como para el número de neuronas difieren significativamente de los grupos que menores valores poseen en los mismos parámetros, que son las hembras *Tfm* y las hembras de la misma raza (volumen: *MH* vs *HTfm*; $p < 0,028$; *MH* vs *HMR*; $p < 0,004$; número de neuronas: *MH* vs *HTfm*; $p < 0,007$; *MH* vs *HMR*; $p < 0,004$). A su vez, el grupo de machos *Tfm* difiere significativamente con las hembras de la misma raza, tanto en volumen (*MTfm* vs *HMR*; $p < 0,035$), como en número de neuronas (*MTfm* vs *HMR*; $p < 0,004$). Por su parte, el macho de la misma raza también difiere significativamente de las hembras *Tfm*, en cuanto al volumen del NESTpm (*MMR* vs *HTfm*; $p < 0,011$) (tabla 4.5. y figuras 4.15 y 4.16).

	Volumen del NESTpm						Número de neuronas del NESTpm					
	<i>MTfm</i>	<i>MH</i>	<i>MMR</i>	<i>HTfm</i>	<i>HH</i>	<i>HMR</i>	<i>MTfm</i>	<i>MH</i>	<i>MMR</i>	<i>HTfm</i>	<i>HH</i>	<i>HMR</i>
<i>MTfm</i>	-					$p < 0,035$	-					$p < 0,004$
<i>MH</i>		-		$p < 0,028$		$p < 0,004$		-		$p < 0,007$		$p < 0,004$
<i>MMR</i>			-	$p < ,011$		$p < 0,002$			-			$p < 0,004$
<i>HTfm</i>				-						-		$p < 0,013$
<i>HH</i>					-						-	$p < 0,015$
<i>HMR</i>												-

Tabla 4.5.: En esta tabla se muestran los resultados de las comparaciones entre grupos (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza) con la prueba U-Mann-Whitney para el número de neuronas y el volumen del NESTpm. Se puede apreciar que el grupo *HMR* difiere significativamente de todos los grupos para el número de neuronas y con todos los machos para el volumen. Entre los machos no hay diferencias y las *HTfm* difieren de los *MH* para el volumen y el número y de los *MMR* para el volumen..

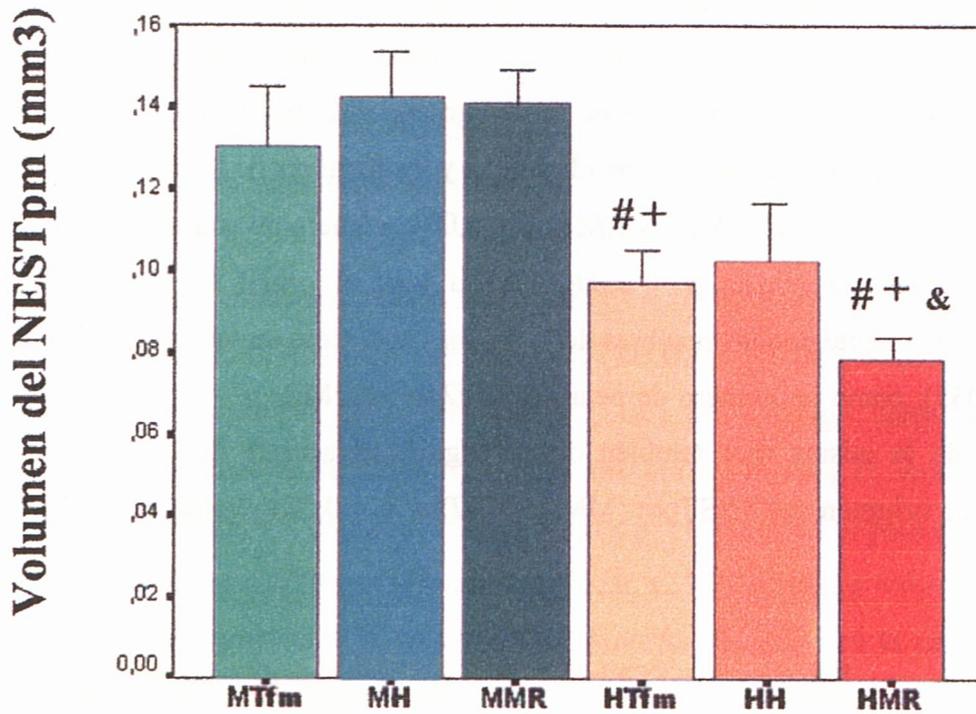


Figura 4.15. Representación gráfica de los distintos volúmenes (mm³) que presentaron los grupos (MTfm: machos *Tfm*; MH: machos hermanos; MMR: machos misma raza; HTfm: hembras *Tfm*; HH: hembras hermanas; HMR: hembras misma raza) en el NESTpm. Se puede apreciar que los grupos de hembras HTfm y HMR difirieron respecto a los machos MMR y MH. Las HMR además difirieron de los MTfm.

#: $p < 0,01$ respecto al grupo MMR.

+: $p < 0,03$ respecto al grupo MH.

&: $p < 0,05$ respecto al grupo MTfm.

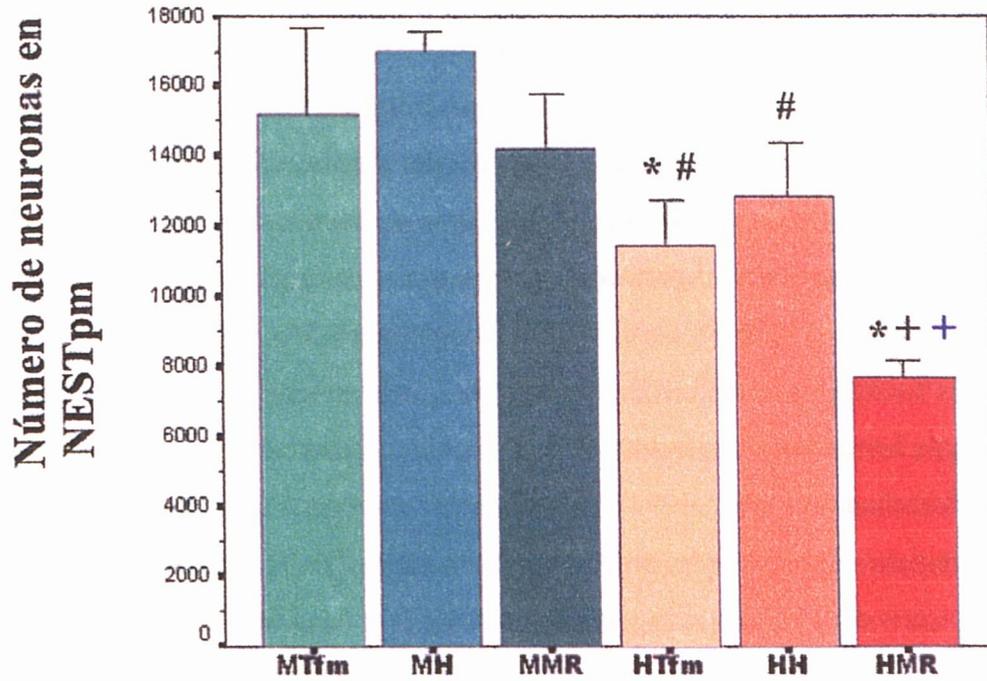


Figura 4.16: Representación gráfica del número de neuronas que presentaron los diferentes grupos (**MTfm**: machos *Tfm*; **MH**: machos hermanos; **MMR**: machos misma raza; **HTfm**: hembras *Tfm*; **HH**: hembras hermanas; **HMR**: hembras misma raza) en el NESTpm. Las HMR difieren de los todos los machos y de las hembras.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo MH.

#: $p < 0,01$ respecto al grupo HMR.

+: $p < 0,03$ respecto al grupo *MTfm*.

+: $p < 0,03$ respecto al grupo MMR.

4.3. DISCUSIÓN

En el peso corporal el balance endocrino, concretamente la correcta actuación de los andrógenos, es una variable importante, ya que ésta es capaz de modificar y/o alterar el eje de retroalimentación hipotálamo- hipófisis anterior-hormona de crecimiento (GH) tanto en ratas (Vandershueren y cols., 1992; Müller y cols., 1999; Pazos y cols., 2000) como en humanos (Marcus y cols., 2000). Como se comentó en el Capítulo 2, ratas machos *Tfm* poseen valores intermedios en cuanto a parámetros morfométricos óseos (longitud, diámetro y grosor cortical del fémur) entre los machos hermanos y las hembras hermanas (Vanderschueren y cols., 1993), aproximándose más los machos *Tfm* a las hembras hermanas y alejándose de los machos hermanos (Vanderschueren y cols., 1993; Vanderschueren y cols., 1994). Relacionado con el peso corporal, en estos trabajos citados se registró algo parecido, situándose los machos *Tfm* en una posición intermedia entre los machos de la misma raza y las hembras de la misma raza (Batson y cols., 1989; Martha y cols., 1989; Vanderschueren y cols., 1994).

En nuestro caso sucede exactamente lo mismo. Los *MTfm* difieren significativamente del macho control de la misma raza (MMR), de la hembra control de la misma raza (HMR) y de las hembras hermanas (HH) (tabla 4.1. figura 4.7.), al presentar un su peso corporal intermedio al que presentan los machos y las hembras. Por su parte, los machos hermanos (MH) y control de la misma raza (MMR) difieren significativamente de todos los grupos de hembras. En este caso la ineficacia de los receptores de andrógenos tiene su reflejo en el grupo de machos *Tfm*, en el que los andrógenos no habrían podido regular la actuación de la GH para que estimule la elongación de los huesos, tras actuar sobre los cartílagos a través de la IGF-1, para que pudieran alcanzar un peso corporal similar al presentado por los machos sin mutación. La IGF-1, también está reducida en los machos *Tfm* comparados con los machos y hembras hermanos de camada (Vandershueren y cols., 1993), pudiendo estar incidiendo esta reducción en el IGF-1 en el déficit del crecimiento óseo que se da en los machos *Tfm*.

En las hembras mosaico o *Tfm* (*HTfm*), que poseen la mutación en el receptor de andrógenos en la mitad de sus células y en la otra mitad poseen el receptor sano, la presencia parcial de la mutación ha podido afectar a su peso corporal, pero en menor medida que en los machos *Tfm*, ya que éstas no difieren significativamente de las otras hembras (tabla 4.1. figura 4.7.). Pero por otro lado, estas hembras no difieren significativamente de los machos *Tfm*. Esta ausencia de diferenciación entre los grupos *Tfm* machos y hembras podría darse por la aproximación de los machos *Tfm* al tamaño corporal de las hembras y a su vez, podría estar indicando cierta afectación de la mutación en las hembras *Tfm*, ya que en éstas el peso corporal es ligeramente superior al que presentan las otras hembras sin llegar a ser significativo. Por estos dos motivos, las hembras *Tfm* (*HTfm*) no difieren de los machos *Tfm* (*MTfm*), como hacen las hembras hermanas (HH) y las hembras de la misma raza (HMR) y, a su vez, no se diferencia del resto de las hembras (tabla 4.1. figura 4.7.). Este dato viene a indicar que los andrógenos son muy relevantes para el crecimiento en los machos, porque la ausencia de éstos detiene su desarrollo corporal normal, que se da sin alteraciones en los grupos de machos que poseen receptores de andrógenos funcionales. En las hembras, por su parte, la actuación parcial de los andrógenos sobre sus receptores de andrógenos, por su condición de mosaico, ha sido suficiente para que alcancen el peso corporal que poseen las hembras hermanas y de la misma raza, ya que no difiere significativamente de ellas.

Otro de los reflejos de la ausencia del receptor de andrógenos en los machos *Tfm* es el diferente desarrollo del aparato genital masculino. Los machos *Tfm* poseen unos testículos de menor tamaño que los otros machos (hermanos y control de la misma raza) y carecen del resto de componentes del aparato sexual, al no tener ni próstata, ni epidídimo ni vesícula seminal (figura 4.8, tabla 4.2.).

Retomando el proceso de desarrollo gonadal, expuesto en el Capítulo 1, en la determinación genética del sexo de los machos *Tfm*, aparentemente están presentes todos los componentes necesarios. Se demostró que ratones *Tfm* poseen el antígeno H-Y (Koo y cols., 1977), aunque su implicación en la determinación sexual ha sido posteriormente cuestionada (Haseltine y Ohno, 1981). Los machos *Tfm* poseen igualmente el gen *Sry*, ya que en esta investigación, para la clasificación experimental de los animales, mediante la PCR, se amplificó tanto el gen del receptor de andrógenos (*AR*), como el gen *Sry*, para

distinguir entre machos y hembras hermanos y controles de la misma raza. Por lo tanto, los machos *Tfm* empleados en esta investigación poseen el gen *Sry*. Aunque el papel determinante en el proceso de diferenciación sexual de este gen está siendo cuestionado por la presencia de otros genes del mismo o mayor peso en cuanto al desarrollo de los testículos (e. g. *Sox9*) (De Santa Bárbara y cols., 1998; Vidal y cols., 2001; Canning y Lowell-Badge, 2002; Clarkson y Harley, 2002), el *Sry* sigue siendo muy importante para que la cascada del desarrollo gonadal masculino se inicie (Graves, 1998a, Graves, 1998b; Graves, 2000).

Durante la determinación gonadal del sexo, en la etapa pregonadal (a los 12 días post coito, d.p.c. en la rata) los machos *Tfm*, en principio, llevarían a cabo de manera normal la migración de las células germinativas primordiales del mesonefros a la cresta urogenital. Asimismo durante la etapa de gónada bipotencial (a los 13 d.p.c.) se debe producir normalmente en los machos *Tfm* el reconocimiento y la interacción de las diferentes células que se encuentran en la cresta urogenital (células germinales primordiales, células del epitelio celómico y células mesonéfricas mesenquimales). Sin embargo, en el tercer estadio de desarrollo gonadal (del 14 al 16 d.p.c.), en los machos *Tfm*, a pesar de estar presente el cromosoma Y, que en principio llevaría a la diferenciación de testículos independientemente de los cromosomas X que hubiese, al no ser funcional uno de los genes determinantes para la diferenciación gonadal hacia testículos, el gen del receptor de andrógenos, el proceso se ve interrumpido y prematuramente abortado. Esto supone que, aunque parcialmente desarrollados y funcionales, los túbulos seminíferos, las células de Sertoli, las células de Leydig, las células peritubulares y las estructuras vasculares necesarias para el desarrollo completo del aparato reproductor masculino no culminan su formación. Aunque existen datos que apuntan que la esteroidogénesis de las células de Leydig embrionarias en ratones *Tfm* está incrementada hasta el día postnatal 25, a partir del cual es necesario la actuación de los andrógenos para alcanzar el estadio maduro. Por este motivo la esteroidogénesis en ratones *Tfm* permanece en un estadio inmaduro (Murphy y cols., 1994; O'Shaughnessy y cols., 2002).

La insensibilidad a los andrógenos también tiene su reflejo en los machos *Tfm* durante el desarrollo de los genitales externos. La DHT actuaría en el seno urogenital para provocar el desarrollo de la uretra y la próstata e igualmente actuaría sobre el

tubérculo genital para provocar la fusión de los pliegues genitales y la prominencia genital que acompaña a la formación del pene y del escroto. De igual manera la testosterona segregada a partir de la tercera semana postnatal (McEwen, 1978) tendría como función promover el desarrollo de los conductos de Wolff, que son los precursores del epidídimo, del conducto deferente, de la vesícula seminal y de los conductos eyaculatorios del macho. De hecho, se ha detectado la presencia de receptores de andrógenos durante el desarrollo de los genitales externos masculinos en los conductos mesonéfricos (Wolff), en el epidídimo, en la vesícula seminal, en los conductos deferentes y en los conductos eyaculatorios. Puesto que la insensibilidad en los machos *Tfm* impide que la testosterona o la DHT pueda actuar sobre estas regiones, el resultado es que carecen de los componentes del aparato reproductor masculino que dependen de la DHT, como la próstata y que dependen de la testosterona, como el epidídimo y la vesícula seminal.

Se comprobó que, en ratones *Tfm*, el peso de los testículos permanecía estancado a los 5 días de edad, siendo este peso prácticamente idéntico al que presentaron a los 25, 30 y 40 días de edad y difiriendo significativamente del peso de los testículos que presentaron los ratones machos hermanos de camada a partir del día 20 de vida (Murphy y cols., 1994).

Nuestras mediciones están en consonancia con todo lo anterior. Los machos *Tfm* (*MTfm*) carecen de todos los componentes del aparato genital masculino, excepto de los testículos, que a su vez presentan un peso significativamente menor que el de los machos hermanos (MH) y control de la misma raza (MMR) (tabla 4.2. y figura 4.8.). Esto es reflejo de la insensibilidad en los receptores de andrógenos, que empieza a hacerse evidente desde el tercer estadio embrionario de desarrollo gonadal y que marca y determina todo el proceso de diferenciación gonadal en los machos *Tfm*, sin afectar a los machos hermanos y a los machos de la misma raza, por poseer éstos el receptor de andrógenos funcional.

Pasaremos ahora a discutir los resultados más relevantes, los de morfología cerebral, sirviéndonos del orden con el que fueron expuestos los resultados en el apartado correspondiente.

Respecto a las comparaciones entre machos y hembras de los mismo grupos experimentales, para la detección de la existencia de dimorfismo sexual en las diferentes subdivisiones del NEST, diremos que en el único caso en el que éste se dio fue en el volumen y en el número de neuronas del NESTpm, en los grupos controles de la misma raza (MMR y HMR) (tabla 4.5. figuras 4.15. y 4.16.). En éstos, los machos de la misma raza (MMR) presentaron un volumen y un número de neuronas significativamente superior al que presentaron las hembras. Este mismo dimorfismo sexual, en la misma dirección, fue también detectada en otras especies animales, tales como el volumen del NESTpm en cobayas (Hines y cols., 1992; Hines y cols., 1985), el volumen y número de neuronas en ratas Wistar (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, 1988; Guillamón y cols., 1988b), el volumen en ratas Sprague-Dawley (Chung y cols., 2000) e incluso el volumen y número de neuronas en el NESTc, equivalente humano al NESTpm de la rata (Allen y Gorski 1990; Zhou y cols., 1995; Kruijver y cols., 2000; Chung y cols., 2002). Estos datos vienen a indicar que la diferencia de raza e incluso de especie no anula la diferencia entre sexos del NESTpm, probablemente por la relevancia funcional que la diferenciación sexual de esta estructura tiene sobre las conductas que regula. Este tema será retomado con posterioridad.

Sin embargo, para las otras subdivisiones del NEST, no hubo ninguna diferencia entre los sexos de los grupos homólogos. Esta ausencia estaría indicando que el dimorfismo encontrado en la raza Wistar, respecto a las subdivisiones del NESTma y NESTla (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b), son específicas de la raza Wistar. Los animales experimentales empleados en esta investigación, tal y como se comentó con anterioridad, provenían de una raza diferente de ratas, King-Holtzman (Stanley y cols., 1973; Gumbreck y cols., 1982), que a su vez, fueron cruzadas repetidamente con machos Long-Evans y por nuestra parte, cruzadas con machos Wistar. Este efecto de mezcla de razas ha podido anular la posible diferenciación sexual que pudiera ocurrir en estas subdivisiones del NEST (NESTma y NESTla). La repercusión que la raza pueda tener sobre el dimorfismo sexual en cuanto al establecimiento de los parámetros morfológicos de volumen y número de neuronas será posteriormente tratado en el experimento 3 del Capítulo 6.

Por otro lado, la comparación entre los grupos reveló que los machos *Tfm* y los machos hermanos no difirieron significativamente en ninguna de las subdivisiones del

NEST, e igual sucedió en el caso de las hembras *Tfm* y las hembras hermanas, pues poseían resultados similares en todas las subdivisiones del NEST. Estos datos de manera aislada estarían indicando que la ausencia de andrógenos no sería un condicionante importante para que el proceso de desarrollo del NEST se llevase a cabo, puesto que los animales que poseen la mutación, machos y hembras, y los que no la poseen pero son compañeros de camada de los primeros, también machos y hembras, presentan valores similares entre ellos en todos los parámetros morfológicos del NEST. Focalizándonos sólo sobre estos resultados de los grupos *Tfm* y hermanos machos y hembras, sin entrar en cada una de las estructuras del NEST y sin considerar a los grupos control de la misma raza, podríamos interpretar que esta ausencia de testosterona y DHT no incide en el desarrollo del NEST masculino y femenino y, puesto que la actuación de otros esteroides gonadales, como el estradiol, es perfectamente normal tanto en los grupos de hermanos como en los *Tfm* (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982), esta similitud en cuanto a la morfología cerebral del NEST pudiera deberse a la actuación normal de otros esteroides, como el estradiol. Pero con los análisis detallados de cada subdivisión, comprobaremos que este esquema simplificador falla en su propósito explicativo.

Por otro lado, estos datos aislados referidos sólo a los machos *Tfm* y hermanos podrían interpretarse bajo el prisma explicativo de la determinación genética en la diferenciación sexual. En el trabajo de Arnold y su equipo del 2002 y 2003 (De Vries y cols., 2002; Markham y cols., 2003) se manipuló el gen *Sry* para poder aislar el efecto gonadal del cromosómico. Encontraron que para el *séptum* lateral y para el número de fibras inmunorreactivas a la vasopresina que hubiera en éste, el patrón genético XY, con o sin testículo, tenía mayor cantidad de fibras VS-ir en el *séptum* que el patrón XX, con o sin testículos (De Vries y cols., 2002; Markham y cols., 2003). En nuestro caso, comparando a machos *Tfm* (genéticamente XY con testículos pequeños) con machos hermanos (genéticamente XY con testículos y aparato genital funcional), podemos ver que los valores que ambos presentan en las diferentes subdivisiones del NEST son similares. Esto nos permitiría sugerir, al igual que los autores de la investigación comentada, que los genes sexuales, ya sea debido al cromosoma Y o a algún gen que éste posea (*Sry*), estarían incidiendo en el proceso de diferenciación sexual, independientemente del grado de desarrollo gonadal que posea el individuo, ya que los

machos *Tfm* y los machos hermanos poseen valores muy similares entre ellos en las subdivisiones del NEST.

Sin embargo, para poder explicar qué ha podido suceder entre los grupos portadores de la mutación, machos y hembras *Tfm* y los grupos compañeros de camada de éstos, machos y hembras hermanos, es necesario considerar el tercer grupo experimental, el control de la misma raza, machos y hembras. La presencia de este grupo control, que comparte todas las características que poseen los animales *Tfm* y hermanos, al tener la misma edad y la misma mezcla de razas (King-Holtman con Long Evans y Wistar), pero diferenciarse respecto al ambiente hormonal embrionario, posibilita el entendimiento global de los datos obtenidos y hace desestimar posibles explicaciones referentes a la determinación genética de la diferenciación sexual del cerebro en el NEST.

Las diferencias significativas encontradas entre los grupos siempre implican la presencia de un grupo control de la misma raza, macho o hembra, diferenciándose de ellos los animales *Tfm* o hermanos en casi los mismos parámetros. Este dato está indicando que, entre los animales machos y hembras *Tfm* y hermanos, existe una similitud que provoca que se aproximen entre ellos y a su vez se diferencien de los grupos controles de la misma raza. Esta similitud podría ser el ambiente hormonal que han compartido los animales *Tfm* y los hermanos en el seno materno, al ser ambos grupos hijos de madres portadoras de la mutación, mientras que los animales que son controles de la misma raza, al ser sus madres no portadoras de la mutación, habrán tenido otro ambiente hormonal diferente en el seno materno.

Existen ejemplos en la literatura que ponen de manifiesto esta relación bidireccional que se establece entre una alteración endocrina por mutación en las crías o en la madre sobre la madre o las crías, respectivamente. Ejemplo de ello es el trabajo realizado en humanos, por Morishima en 1995, en el que se analizó la repercusión que tuvo sobre la madre, durante la gestación, el hecho de que sus hijos gemelos poseyeran una mutación genética para el gen responsable de la enzima Aromatasa (*CYP19*). Ella no poseía esta mutación y sin embargo, durante la gestación, la madre de estos chicos presentó signos de progresiva virilización, traducido en acné severo, hirsutismo, clitoromegalia y su voz se volvió más grave signos que remitieron por completo tras el

parto (Morishima y cols., 1995). Este dato indica que la alteración hormonal que se produjo en los hijos durante su desarrollo embrionario, por motivo de la mutación que poseían, que les provocaba un incremento de la cantidad de andrógenos en plasma por el déficit en la aromatización de éstos, afectó a la madre masculinizándola, debido a la estrecha relación biológica que existe entre madre e hijo durante la gestación.

Como ejemplo de la repercusión que la mutación en la madre puede causar sobre sus crías, está el trabajo realizado en ratones por Mahendroo en 1997. En éste se demostró que, siendo la madre homocigótica para la mutación en el gen de la enzima 5 α -reductasa tipo 1, las crías suelen fallecer entre los días embrionarios E10.75 y E11, ya que los elevados niveles de testosterona en plasma que se dan en la madre en este momento, incrementados de 2 a 3 veces, debido a la mutación, se aromatizan en exceso dando como resultado niveles muy elevados y tóxicos de estradiol en plasma, que resultan letales para la camada en curso (Mahendroo y cols., 1997).

Pues bien, en nuestro caso, y debido a la mutación en el receptor de andrógenos que presentan las madres mosaico, éstas podrían tener más andrógeno libre en plasma, ya que la mitad de sus células son insensibles a éstos. De hecho, existen evidencias en la investigación de que la imposibilidad de actuación de los andrógenos sobre sus receptores tras la administración de antiandrógenos, conlleva un incremento de testosterona y estradiol en plasma, debido a, según los autores, un incremento en la síntesis de testosterona, que no puede actuar sobre sus receptores al estar bloqueados, así como un incremento de la actividad de la enzima Aromatasa (Pazos y cols., 2000). Este exceso de testosterona por causa de la mutación en las madres portadoras estaría repercutiendo, durante los períodos críticos de diferenciación, en las crías que ha gestado, portadoras o no de la mutación, provocando un acercamiento de los valores morfológicos cerebrales entre estas crías *Tfm* y hermanas. Asimismo los valores que presentan los grupos control de la misma raza, crías de madres no portadoras de la mutación que no tendrían exceso de andrógenos en plasma por una actuación normal de éstos sobre sus receptores, presentan unos valores morfológicos cerebrales diferentes de los otros dos grupos, representando el valor basal o normal de la estructura sin la presencia de mutación ni de alteración endocrina en sus madres por ella.

Pasaremos ahora a discutir los resultados encontrados en cada una de las subdivisiones del NEST, teniendo presente por un lado, lo comentado previamente como suposición explicativa de la similitud entre los grupos de hermanos y *Tfm* y por otro lado el perfil endocrino diferencial de los diferentes grupos de animales que puedan explicar los resultados. Este perfil se recoge en la tabla que se expone a continuación (tabla 4.6.), en la que se representan los niveles hormonales diferenciales referidos a los grupos analizados en la literatura, cuyas referencias se anotan en los lugares correspondientes. Para los grupos en los que no se conoce, por referencia bibliográfica, el perfil endocrino exacto al no haber sido analizados experimentalmente, se especifica la ausencia de referencia bibliográfica mediante la anotación de un signo de interrogación en las casillas correspondientes.

	<i>MTfm</i>	MH	MMR	<i>HTfm</i>	HH	HMR
T	++++ (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990)	++ (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990)	(?)	(?)	(?)	(?)
E ₂	++++ (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990)	++ (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990)	(?)	(?)	(?)	(?)
DHT	+++ (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990)	+ (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990)	(?)	(?)	(?)	(?)
AMH/MIS	+++ (Al-Attar y cols., 1997) en ratones	(?)	+ (Al-Attar y cols., 1997) en ratones	(?)	(?)	(?)
Aromatización	- (Roselli y cols., 1987)	+++ (Roselli y cols., 1987)	(?)	(?)	(?)	(?)
AR	- (Yarbrough y cols., 1990; Fernández y cols., 2003)	+ (Yarbrough y cols., 1990; Fernández y cols., 2003)	+ (Fernández y cols., 2003)	-/+ (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001; Fernández y cols., 2003)	+ (Fernández y cols., 2003)	+ (Fernández y cols., 2003)
ER	+ (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982)	+	+	+	+	+

Tabla 4.6. : Perfil endocrino de los animales experimentales, comparativamente con los otros grupos. Se señala la referencia bibliográfica que hace mención de ese perfil concreto, anotándose un signo de interrogación para aquellos casos en los que aún no se ha investigado el perfil en cuestión.

Discutiremos los resultados respetando el orden en el que fueron presentados, empezando por analizar la existencia o no de dimorfismo sexual en la estructura, para seguir por discutir las diferencias significativas que pueda haber entre los diferentes grupos de los mismos sexos y analizar las posibles causas de las diferencias significativas existentes.

El NESTma es una estructura sexualmente isomorfa, en todos los grupos analizados. A este respecto, sólo se ha analizado el dimorfismo sexual en esta subdivisión del NEST en ratas de raza Wistar, demostrándose que en volumen y número de neuronas esta subdivisión era superior en las hembras que en los machos (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988).

Ni en otras especies ni en otras razas esta subdivisión ha sido analizada. Por lo tanto, suponemos que el motivo por el que el NESTma es isomorfo sexualmente en las ratas analizadas en esta investigación es debido a la diferente raza de los animales. Este tema será tratado en el experimento 3 del Capítulo 6.

Respecto al volumen del NESTma, no existe ninguna diferencia entre ninguno de los grupos. Con el número de neuronas sí se dan diferencias y las discutiremos según fueron presentados los datos, primero lo que ha sucedido en los machos y posteriormente lo que ha sucedido en las hembras.

En los grupos de machos hay diferentes valores en cuanto al número de neuronas del NESTma (figura 4.12 y tabla 4.3). Los machos hermanos (MH) poseen significativamente más neuronas que los machos control de la misma raza (MMR), pero no difieren de los machos portadores de la mutación (*MTfm*). El grupo MMR representaría lo que sucede en esta estructura sin la presencia de mutación en el receptor de andrógenos, ni en la madre ni en el individuo. Suponemos que la alteración del ambiente hormonal de la madre mutada ha provocado un incremento en los niveles de andrógenos tanto en los machos *Tfm* como en los hermanos. Este incremento de

andrógenos podría haber repercutido en el número de neuronas que presentasen estos grupos, sin embargo, sólo se refleja la actuación de este andrógeno en el grupo de machos hermanos (MH), ya que en los machos *Tfm* (*MTfm*) este andrógeno extra en plasma no habría podido actuar sobre sus receptores al ser éstos insensibles (Naess y cols., 1976; Yarbrough y cols., 1990) y por ello, los machos *Tfm* no difieren significativamente de ningún grupo de machos (figura 4.12 y tabla 4.3.). El incremento en los niveles de andrógenos en plasma en ratas macho *Tfm* es un hecho probado (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990). Esto puede deberse posiblemente, por un lado, al ambiente hormonal embrionario alterado de la madre mutada, como suponemos que ha sucedido igual para los machos hermanos, y por otro lado por el elevado nivel de LH que tienen las ratas *Tfm* comparados con machos y hembras de cepa sin mutación (Krieg y cols., 1990).

El NEST posee receptores para los andrógenos (Simerly y cols., 1990; Lisciotto y Morrell, 1994; Bakker y cols., 1997; McAbee y DonCarlos, 1999a; McAbee y DonCarlos, 1999b). Concretamente, en la subdivisión medial anterior de NEST se encontró una expresión moderada del ARNm del receptor de andrógenos durante el desarrollo postnatal de ratas Sprague-Dawley, que no difirió entre machos y hembras (McAbee y DonCarlos, 1999a).

La testosterona se ha demostrado que puede actuar promoviendo el desarrollo de estructuras en las que el machos presenta valores superiores, como en el caso de las motoneuronas y otros parámetros del Núcleo Espinal Bulbocavernoso (Breedlove y cols., 1982; Breedlove y Arnold, 1983b; Nordeen y cols., 1985; Matsumoto y cols., 1988; Tobin y Payne, 1991; Fishman y Breedlove, 1992; Rand y Breedlove, 1992; Jordan y cols., 1995; Christensen y cols., 1999), en el número de neuronas del NESTpm (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988) y en el volumen del NESTpm (Chung y cols., 2000) y, por último, en el NSD-APM (Davis y cols., 1996). También la androgenización de hembras en época perinatal provoca un incremento en los parámetros morfológicos que éstas presentaban en el OVN (Segovia y Guillamón, 1982) en el BOA (Segovia y cols., 1984a; Valencia y cols., 1986; Pérez-Laso y cols., 1996; Collado y cols., 1990; Collado y cols., 1993), en el NTOA (Collado y cols., 1990; Collado y cols., 1993) en el NESTpm

(Del Abril y cols., 1987; Guillamón y cols., 1988b), en la Me (Nishizuka y Arai, 1981) y en el NSD-APM (Gorski y cols., 1980; Gorski y cols., 1981; Jacobson y cols., 1981).

Pero esta testosterona podría estar aromatizándose, actuando por lo tanto a través del estradiol y no de la testosterona. En nuestro caso, para los machos, esta explicación queda descartada, puesto que si así fuese, los machos *Tfm*, en los que los receptores de estrógenos son perfectamente funcionales (Attardi y cols., 1976; Krey y cols., 1982; Olsen y Whalen, 1982), diferirían significativamente de los machos de la misma raza, en los que no habría exceso de andrógenos en plasma para aromatizarse y esto no es lo que sucede, dando más vigor explicativo a la posibilidad de que lo que haya actuado para determinar el número de neuronas definitivas del NESTma en los machos sean los andrógenos directamente.

En las hembras existen diferencias significativas respecto al número de neuronas del NESTma entre el grupo de hembras de la misma raza (HMR) y los otros dos grupos de hembras, las *Tfm* y las hermanas (*HTfm* y HH) (figura 4.12 y tabla 4.3). Las hembras que han compartido un ambiente hormonal alterado, al ser ambas hijas de madres portadoras de la mutación, presentan similitud en cuanto al número de neuronas del NESTma y difieren del tercer grupo experimental, el de hembras de la misma raza (HMR), hijas éstas de madres no portadoras de la mutación. Estas diferencias, por tanto, podrían deberse, igual que en el caso anterior con los machos, a un posible efecto del andrógeno excedente que ha circulado en plasma durante los períodos críticos del desarrollo, por motivo de la alteración hormonal en las madres portadoras de la mutación. Pero en este caso, las diferencias entre los grupos HH y *HTfm* respecto al grupo HMR podrían estar debidas a la actuación de la testosterona directamente o a través de su aromatización a estradiol o de ambas maneras.

Si fuera la actuación directa de la testosterona la causante del número de neuronas incrementados en los grupos de hembras HH y *HTfm*, entonces los niveles incrementados de andrógenos en el plasma de estos grupos de hembras, por los mismos motivos que se aludieron en el caso anterior del NESTma para los machos, habrían actuado incrementando el número de neuronas que presentan las HH y *HTfm* respecto al grupo HMR. En las hembras *Tfm*, por su parte, la testosterona habría actuado pero de

manera parcial, puesto que la insensibilidad a los andrógenos que presentan en la mitad de sus células, al ser mosaicos, hubiera impedido esta actuación (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001). Sin embargo, con esta actuación parcial sobre sus receptores hubiera bastado para que, aunque presente un valor ligeramente inferior al que se dio en sus compañeras de camada, las hembras hermanas, sí difieran significativamente de las hembras control de la misma raza, en la que los niveles de andrógenos serían inferiores.

Por otro lado, si lo que hubiese actuado en los grupos de hembras *Tfm* (*HTfm*) y hermanas (HH) para provocar el incremento en el número de neuronas, fuese el estradiol aromatizado de la testosterona, entonces ambos grupos de hembras presentarían este incremento en el número de neuronas respecto al grupo de hembras de la misma raza, debido a que las HH y *HTfm* poseen sus niveles normales de estradiol y además, el estradiol aromatizado de la testosterona extra que pueden tener por motivo de ser hijas de madre portadora de la mutación.

Y por último, si lo que provoca este resultado morfológico es una actuación conjunta de los andrógenos directamente y del estradiol, por aromatización de la testosterona, entonces se explicaría apelando a que el estradiol, el propio y el aromatizado del exceso de testosterona en plasma por ser hijas de madre portadora, ha provocado el incremento en el número de neuronas del NESTma de las hembras *Tfm* y hermanas y la testosterona por su parte, ha colaborado en este incremento, aumentando también el número de neuronas en estas hembras, pero actuando de manera parcial en las *HTfm*, que explicaría por qué éstas últimas han presentado valores numéricos en el NESTma ligeramente inferiores a las hembras hermanas.

En los estudios llevados a cabo sobre animales de raza Wistar, se demostraba que, tras la castración de los machos el día P1, experimentaban un incremento del volumen y el número de neuronas que poseían en el NESTma hasta asimilarse a las hembras controles (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988). Esto no coincide con lo que hemos encontrado en este caso, ya que en nuestro caso los andrógenos en los machos hermanos estarían actuando provocando un incremento en el

número de neuronas, sin afectar a los machos *Tfm* por su insensibilidad para el receptor de andrógenos. Esta discrepancia podría estar debida a la existencia de diferentes períodos críticos en el desarrollo del NESTma de los machos, o simplemente ser un ejemplo de mecanismos de diferenciación divergentes entre razas distintas. No obstante para resolver esta discrepancia, es necesaria más investigación.

Por su parte, en las hembras Wistar se ponía en evidencia que administrando una dosis de propionato de testosterona (PT) el día de su nacimiento, no se modificaba el volumen ni el número de neuronas del NESTma que presentaban en estado adulto (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988). Este dato, junto con los resultados experimentales aportados en este experimento para el NESTma, estarían indicando que la testosterona o un derivado de ésta efectuaría un incremento del número de neuronas, si el individuo está expuesto a un aumento de andrógenos en plasma de manera prolongada en el tiempo, como sucede para las hembras *Tfm* y hermanas, pero no afectaría si esta exposición es limitada en el tiempo, como la inyección de PT en el día P1, pudiendo sugerir más de un período crítico de diferenciación y desarrollo para el NESTma, aparte del postnatal temprano.

En síntesis para el NESTma, podríamos decir que para que se establezca el número definitivo de neuronas en el NESTma en las ratas machos empleadas en este experimento, es necesaria la actuación de los andrógenos sobre sus receptores funcionales, que en el caso de los machos hermanos, están incrementados, supuestamente por efecto del ambiente hormonal compartido en el seno materno de una madre portadora de la mutación. En los machos *Tfm*, a pesar de estar también incrementados, no podrían actuar y por ello, éstos no difieren significativamente de los otros grupos de machos. En las hembras, podría estar incidiendo la testosterona, igual que en los machos, puesta de manifiesto por la superioridad en número de neuronas de las hembras *Tfm* y hermanas respecto a las control de la misma raza. También en las hembras podría estar actuando el estradiol que poseen normalmente más el aromatizado de la testosterona excedente, o bien, por último, y por la imposibilidad de acotar uno u otro mecanismo, podría estar actuando una combinación de ambas expresiones de la testosterona, directa e indirectamente.

Por lo tanto, en el NESTma, la mutación en el receptor de andrógenos estaría incidiendo en el desarrollo del NESTma, tanto en machos como en hembras a nivel de madre portadora y específicamente en los machos, a nivel de posesión de la mutación individual, motivo por el cual los machos *Tfm* no difieren significativamente de los machos hermanos.

Refiriéndonos ahora a la subdivisión NESTla, diremos que se trata, igual que en el caso anterior, de una estructura isomorfa sexualmente, ya que tampoco existen diferencias entre los sexos de ningún grupo. A este respecto, sólo se ha analizado esta estructura en ratas de raza Wistar, en la que se determinó que las hembras poseían un número de neuronas superior a los machos (Guillamón y cols., 1988b). Igual que en el caso anterior, suponemos que el motivo por el que el NESTla es isomorfo sexualmente en las ratas analizadas en esta investigación es debido a las diferencias entre raza de los animales. Este tema será tratado en el experimento 3 del Capítulo 6.

Respecto al número de neuronas del NESTla, podríamos decir que se repite en parte los resultados hallados para la subdivisión NESTma, pero con algunas particularidades que ponen de manifiesto que el proceso de desarrollo y diferenciación de estas dos subdivisiones, aunque no es idéntico, es parecido. En primer lugar, en los machos, se dan diferencias significativas entre los machos de la misma raza (MMR) y los otros dos grupos de machos, los *Tfm* (*MTfm*) y los hermanos (MH) (figura 4.14, tabla 4.4.). En este caso, por lo tanto, puesto que los machos *Tfm* han diferido significativamente de los machos control de la misma raza, el incremento en el número de neuronas que se dan en los *MTfm* y en los MH no puede deberse al andrógeno directamente, puesto que si así fuese, como sugerimos para el caso de la subdivisión anterior, los *MTfm* no se distanciarían tanto de los MMR, ya que en ellos no puede actuar el andrógeno. Por este motivo, sugerimos que en este caso, las diferencias en el número de neuronas de los machos podrían deberse a la actuación diferencial del estradiol aromatizado de la testosterona extra que poseen los *MTfm* y los MH.

Avalando esta sugerencia, están los resultados experimentales que demuestran que el estradiol tiene una función muy importante para el proceso de masculinización de algunas regiones cerebrales, como los casos del BOA (Pérez-Laso y cols., 1996), del

NTOA (Collado y cols., 1993), del NSD-APM (Gosrki y cols., 1981; Döhler y cols., 1982; Döhler y cols., 1986), de la Me (Mizukami y cols., 1983) y de la PMCo (Vinader-Caerols y cols., 1998). El estradiol, tal y como se comentó en el Capítulo 1, está relacionado con el crecimiento y proliferación dendrítica (Torand-Allerand, 1984; Torand-Allerand, 1986; Breedlove y Jordan, 2001), con el incremento de proteínas antiapoptóticas *bcl-2* y *bcl-x_L* (García-Segura y cols., 1998b; McEwen y Alves, 1999b; Sastry y Rao, 2000; Harms y cols., 2001) y con un efecto antioxidante sobre las neuronas (Behl y cols., 1997; García-Segura y cols., 2001). Por lo tanto, a través de alguno o de varios de estos mecanismos, el estradiol aromatizado del exceso de testosterona en los machos *MTfm* y MH ha podido provocar que éstos tengan un mayor número de neuronas y que por ello difieran significativamente de los machos de la misma raza (MMR).

Por otro lado, en el NEST se ha detectado abundante actividad de la enzima Aromatasa (Aro) (Roselli y cols., 1996; Roselli y Resko, 1997; Negri-Cesi y cols., 2001) siendo su presencia significativamente mayor en el NEST de los machos que de las hembras en el día postnatal 2 (Raab y cols., 1995; Roselli y cols., 1996; Lauber y cols., 1997) para descender posteriormente en ambos sexos estando prácticamente ausente el día P20 (Raab y cols., 1995).

Sin embargo, para que la actividad de la Aromatasa se produzca, es necesario la existencia de unos receptores de andrógenos funcionales (Rosenfeld y cols., 1977). Ratas macho *Tfm* poseían una actividad de la Aromatasa disminuida en un 40% a 70% en las regiones del área preóptica del hipotálamo y de la amígdala, comparada con machos hermanos de camada (Roselli y cols., 1987). Avalando esta diferencia, están las mayores cantidades que poseen en plasma los machos *Tfm* comparados con los machos normales de hormona antimülleriana (AMH/MIS) (Al-Attar y cols., 1997) y de DHT (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990), ya que ambas, tanto la AMH/MIS (Vigier y cols., 1984; Vigier y cols., 1987; Vigier y cols., 1989), como la DHT (Roselli y Klosterman, 1998; Negri-Cesi y cols., 2001) están relacionada con una reducción en la biosíntesis de la enzima Aromatasa.

Pero en este trabajo comentado, se demuestra que la menor actividad de la enzima Aromatasa en los machos *Tfm*, es inferior comparada sólo con los machos hermanos, pero no ha sido comparada con los controles de la misma raza (Roselli y cols., 1987), los cuales podrían tener una actividad de la Aromatasa aún más reducida respecto a estos dos grupos, por el hecho de poseer menor cantidad de testosterona en plasma que promueva la aromatización, ya que se sabe que la cantidad de testosterona con la que cuente el organismo es una variable importante en cuanto a la actividad de la Aromatasa (Roselli y Resko, 1984; Roselli, 1991a; Abdelgadir y cols., 1994; Roselli y cols., 1997). Esta posible reducción en la actividad de la Aro de los machos control de la misma raza (MMR) podría explicar por qué los machos *Tfm* y hermanos, en los que la actividad de la Aromatasa ha sido estimulada en mayor medida por el andrógenos en plasma y han contado, por lo tanto, con más estradiol para su desarrollo y diferenciación, presentan un número de neuronas significativamente superior a los machos de la misma raza.

Por su parte, en el número de neuronas del NESTIa de las hembras, sucede algo diferente. En éstas se da diferencia significativa entre el grupo de hembras *Tfm* (*HTfm*) y el de hembras control de la misma raza (HMR) (figura 4.14, tabla 4.4.). En este caso, igual que para el número de neuronas del NESTma de los machos (figura 4.13), puesto que el grupo portador de la mutación (*Tfm*) se comporta diferente del grupo hermano (H) con respecto al grupo control de la misma raza (MR), podemos decir que la mutación está afectando a nivel individual, cambiando la morfología cerebral de los sujetos que la poseen. En este caso, en el NESTIa, se pone de manifiesto la repercusión de la mutación a nivel individual en las hembras y en el caso del NESTma, sucedió en los machos. Puesto que las hembras *Tfm* (*HTfm*) difieren significativamente de las HMR, la mutación en el receptor de andrógenos y la no actuación de los andrógenos en la mitad de sus células, al ser mosaico para esta mutación (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001), estaría repercutiendo en que presentasen un número de neuronas más elevado respecto al grupo de HMR, que ni posee la mutación ni ha sido afectado por el ambiente hormonal. Esto podría explicarse si considerásemos que la actuación de los andrógenos en el NESTIa, tanto de la testosterona como de la DHT, tuviese un efecto inhibitorio del crecimiento o desarrollo de la estructura, de manera que anulando esta inhibición, por la imposibilidad de

actuación de los andrógenos sobre sus receptores, el número de neuronas se incrementase.

Por otro lado, y apoyando esta hipótesis, estaría el hecho de que las hembras hermanas (HH) no difieren significativamente de ninguna de las otras hembras. Esto pondría de manifiesto que, en esta subdivisión, no es el estradiol aromatizado del exceso de la testosterona lo que estaría determinando la diferencia entre los grupos, o al menos no es el estradiol sólo, porque si así fuese, entonces las hembras hermanas (HH) también diferirían significativamente de la hembra de la misma raza (HMR) y esto no sucede. Sin embargo, tampoco es lícito descartar la posible actuación del estradiol en esta estructura, derivado del supuesto exceso de testosterona que tendrían en plasma las hembras *Tfm* y hermanas, como en el caso de los machos en esta misma subdivisión. Y es que podría estar actuando por un lado, el estradiol en hembras *Tfm* y hermanas, por motivo de la mutación en sus madres y por otro lado, la mutación individual de las *HTfm*, que provocaría que, al anular la inhibición que los andrógenos pudieran ejercer en el desarrollo del NESTla, las *HTfm* tuviesen todavía más neuronas que las hermanas, en las que el andrógeno sí puede inhibir difiriendo así las *HTfm* de las HMR.

Apoyando la hipótesis del efecto inhibitorio del andrógenos en el desarrollo de algunas estructuras cerebrales, existen evidencias en la literatura que ponen de manifiesto que administrando DHT en época postnatal temprana a machos castrados se producía una reducción en el número de neuronas de estructuras tales como el BOA (Valencia y cols., 1992), el NTOA (Collado y cols., 1992, Collado y cols., 1993) y en la Me (Malsbury, 1993). La DHT ha demostrado tener incidencia en la actividad de la enzima Aromatasa, inhibiéndola en ratas macho (Roselli y Klosterman, 1998; Negri-Cesi y cols., 2001). Esta inhibición de la enzima Aromatasa provocaría que hubiese menos estradiol aromatizado para el desarrollo de las estructuras cerebrales. Por otro lado, también existen ejemplos que hacen referencia a un posible efecto antiestrogénico de la DHT en relación, por ejemplo, a células cancerígenas mamarias, tanto en la mujer como en el ratón (McIndoe y Etre, 1981; Casey y Wilson, 1984; Keefer y cols., 1987; Stover y cols., 1987).

En el NESTIa de los animales Wistar sucedió que, en los machos castrados, se produjo un incremento en el número de neuronas que poseían en el NESTIa de adultos hasta asimilarse al número que se daba en las hembras intactas. Por su parte en las hembras, tras administrarles propionato de testosterona el día postnatal 1, éstas presentaron en estado adulto un número menor de neuronas que las hembras que no se sometieron a esta administración, pero aún diferentes de los machos controles (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Los machos privados de su fuente principal de andrógenos incrementaron su número de neuronas y las hembras tratadas con andrógenos redujeron este número. Estos datos estarían indicando que los andrógenos pudieran tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del NESTIa, tanto en machos como en hembras Wistar (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). En nuestro caso este efecto inhibitorio lo hemos detectado sólo en las hembras *Tfm*, pero no en los machos.

Estos resultados nos sugieren que el mecanismo que media en la morfología definitiva del número de neuronas en el NESTIa de las ratas empleadas en este experimento depende del sexo, predominando en los machos la actuación del estradiol aromatizado de la testosterona excedente por causa del ambiente hormonal de la madre portadora de la mutación y predominando en las hembras un efecto inhibitorio de los andrógenos, puesto de manifiesto por la superioridad en número de neuronas del grupo de hembras *Tfm*, en las que no ha podido actuar enteramente el andrógeno para inhibir el desarrollo de la estructura que sí podría haberse dado en el grupo de hembras control de la misma raza. El efecto del estradiol en el desarrollo de una estructura sexualmente isomorfa, como el NESTIa de los machos, no había sido puesto de manifiesto con anterioridad. Aunque esta dicotomía no es excluyente, pudiendo estar actuando en ambos sexos, con toda probabilidad, ambos mecanismos de manera cruzada. Se podría haber dado inhibición del exceso de andrógeno en los machos, motivo que explicaría por qué los machos de la misma raza, en los que ha podido actuar también el andrógeno inhibiendo, poseen valores tan reducidos en el número de neuronas del NESTIa comparados con los otros grupos de machos. Por su parte, en las hembras podría también estar actuando el estradiol aromatizado de la testosterona para promover el desarrollo del NESTIa, que explicaría asimismo por qué en la hembra hermana, que posee más testosterona en plasma potencialmente aromatizable por haber sido hija de madre portadora, los valores se aproximan bastante a las *HTfm*, sin alcanzarlas. En las hembras

Wistar tratadas con propionato de testosterona también se pone de manifiesto esta posibilidad, ya que tras este tratamiento, no redujeron tanto su número de neuronas hasta igualarse a los machos, dejando entrever un posible efecto residual del estradiol sobre la estructura (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Este mecanismo cruzado de actuación pone de manifiesto lo complejo y redundante que puede llegar a ser el proceso de diferenciación del sistema nervioso central, como ya sugirieron algunos autores (Miranda y cols., 1993; Torand-Alleran, 1996a; Torand-Allerand, 1996b).

La mutación en el receptor de andrógenos se pone de manifiesto en el NESTIa en dos niveles. Por un lado, el hecho de haber compartido, los animales machos *Tfm* y machos hermanos, el seno materno de una madre portadora de la mutación, se refleja en el superior número de neuronas que presentan ambos respecto al grupo machos de la misma raza, que no ha compartido este ambiente hormonal. Por otro lado, la mutación en el receptor de andrógenos se pone de manifiesto a nivel individual en las hembras *Tfm*, que, por poseer insensibles los receptores de andrógenos, presentan un número de neuronas significativamente mayor que las hembras control de la misma raza, en las que sí ha actuado el andrógeno con normalidad.

Por último, discutiremos qué ha sucedido con el NESTpm y, dado que en ambos parámetros morfológicos, de número de neuronas y volumen, se dan prácticamente las mismas diferencias significativas entre grupos, las discutiremos conjuntamente. En esta subdivisión sí hubo dimorfismo sexual, ya que los machos de la misma raza (MMR) tuvieron un número de neuronas y un volumen significativamente mayor que las hembras de la misma raza (HMR) (figuras 4.15 y 4.16, tabla 4.5). Esto estaría indicando que, en los animales empleados para este experimento, se conserva el mismo dimorfismo sexual en volumen y número de neuronas que presentaron las ratas de la raza Wistar en el NESTpm (Guillamón y cols., 1988b). Asimismo la subdivisión NESTc en seres humanos, equivalente al NESTpm, fue sexodimorfa en volumen y número de neuronas (Allen y Gorski 1990; Zhou y cols., 1995; Kruijver y cols., 2000; Chung y cols., 2002) así como el NESTpm de cobayas respecto al volumen (Hines y cols., 1992; Hines y cols., 1985) y el volumen del NESTpm de ratas Sprague-Dawley (Chung y cols., 2000).

Estos datos estarían indicando que la relevancia del dimorfismo sexual del NESTpm se conserva entre diferentes especies, probablemente por la importancia que esta región ha demostrado tener en la conducta sexual masculina (Claro, Tesis Doctoral, 1992; Claro y cols., 1995). El mayor número de neuronas en los machos en el NESTpm podría estar incidiendo en que la conducta sexual copulatoria masculina se llevase a cabo en los machos, inhibiendo también la ejecución de lordosis en ellos y, a su vez, el menor número de neuronas en el NESTpm de las hembras podría estar repercutiendo en que la conducta sexual de lordosis se llevase a cabo en las hembras y no la conducta de monta masculina (Segovia y Guillamón, 1993). Por ello, podría ser muy relevante para todas las especies de animales en las que se ha demostrado la existencia de este patrón de diferenciación sexual del NESTpm, la conservación de este dimorfismo sexual, por las consecuencias funcionales y conductuales que ello conllevaría, con las que se garantizaría la reproducción de los animales y la conservación de la especie.

Respecto a los otros grupos experimentales, no existe dimorfismo sexual entre ninguna otra pareja de machos y hembras del mismo grupo, porque la mutación en el receptor de andrógenos estaría actuando en alguno de los niveles en los que viene siendo habitual. Para esclarecerlo, discutiremos qué ha sucedido primero entre los machos y luego entre las hembras.

En relación a los machos y su NESTpm, no existen diferencias significativas en ningún parámetro morfológico entre ellos, teniendo además un volumen y un número de neuronas aproximados. En los machos *Tfm*, por lo tanto, se ha producido una masculinización normal del núcleo. A este respecto, traemos a colación la afirmación que la Dra. Olsen realizó en su trabajo de 1979, en el que planteaba la posibilidad de que, puesto que en los machos *Tfm* se producía conducta sexual masculina, el entramado neuronal responsable de esta conducta debía de estar masculinizado (Olsen, 1979). Por lo tanto, si lo determinante para el establecimiento de la diferenciación sexual fuesen los andrógenos, entonces los machos *Tfm*, en los que éstos no han podido actuar, presentarían un volumen y número de neuronas similar al de las hembras, pero esto no sucede. Por esto sugerimos que el esteroide clave en este caso para el establecimiento definitivo del volumen y del número de neuronas en el NESTpm de los machos podría ser el estradiol.

Este mismo resultado fue el que obtuvieron Gorski y su equipo en 1981, en el que comprobaron que la masculinización del volumen del Núcleo Sexodimorfo del Área Preóptica Medial (NSD-APM) se había producido normalmente en los machos *Tfm*, comparados con los machos compañeros de camada que no poseían la mutación (Gorski y cols., 1981), dejando entrever el posible efecto del estradiol en este proceso (Segovia y Guillamón, 1993). Este resultado está avalando la posibilidad que nosotros apuntamos de que la completa masculinización del NESTpm en los machos *Tfm* pueda haberse debido a la actuación del estradiol, ya que los machos *Tfm* poseen un volumen y un número de neuronas prácticamente idéntico al que presentan los machos sin mutación. En esta subdivisión, así como en el NSD-APM, los andrógenos y su actuación parecen no ser relevantes para que el proceso de masculinización se lleve a cabo.

El NESTpm posee altas concentraciones de células inmunorreactivas al receptor de andrógenos (AR-ir) (Bakker y cols., 1997; Lisciotto y Morrell, 1994). Además, los niveles de AR en el NESTpm dependen de la actuación de la testosterona o el estradiol en época temprana del desarrollo (McAbee y DonCarlos, 1999a; McAbee y DonCarlos, 1999b). Con esto suponemos que, puesto que los machos hermanos tendrían supuestamente mayor cantidad de andrógenos en plasma por el ambiente hormonal materno, según el estudio previamente comentado, estos machos hermanos deberían tener mayor concentración de receptores de andrógenos que los machos de la misma raza y que los machos *Tfm*, en los que el excedente de andrógenos por la madre portadora no ha podido actuar para regular al alza los receptores de andrógenos. Siendo esto así, y de nuevo, si los andrógenos fueran determinantes en el establecimiento del dimorfismo sexual del NESTpm, los machos hermanos tendrían un volumen y número de neuronas significativamente superior a los machos *Tfm*, ya que en éstos no ha podido actuar el andrógeno, y significativamente superior a los machos de la misma raza, ya que en éstos no se han regulado al alza la cantidad de receptores de andrógenos que pudiera haber, por no ser hijos de madres portadoras. Y sin embargo, esto no sucede y los machos no se diferencian entre sí, dejando entrever que el mecanismo de diferenciación del NESTpm no puede ser por actuación directa del andrógeno.

Por su parte en el NESTpm de las hembras, sucede algo ligeramente distinto. En este caso las hembras de la misma raza (HMR), en las que no ha habido incremento del nivel hormonal de andrógenos en plasma por no haber compartido el ambiente hormonal

de una madre portadora de la mutación, poseen un número de neuronas en el NESTpm significativamente menor que el que tienen las hembras *Tfm* (*HTfm*) y las hembras hermanas (HH) (figura 4.16 y tabla 4.5.). Esto mismo es lo que sucedía en las hembras para el número de neuronas del NESTma. En aquel caso, planteamos que lo que podría estar sucediendo era que la testosterona fuese determinante en el establecimiento del número de neuronas del NESTma definitivo de los machos y en las hembras, podrían haber actuado o la testosterona o el estradiol o ambos. Pues bien, exactamente esto es lo que puede haberse producido respecto al número de neuronas del NESTpm entre las hembras, ya que no podemos determinar a qué se está debiendo exactamente la diferencia entre grupos en estos casos.

Las hembras *Tfm* y hermanas poseen un número de neuronas en el NESTpm masculinizado, al incrementarse en ellas y acercarse sus valores a los que se dan en los machos. Este también sería el motivo de por qué entre ningún otro grupo de machos y hembras existe dimorfismo sexual en el NESTpm, y es que en las hembras *Tfm* y hermanas al haberse masculinizado su NESTpm, se han anulado las posibles diferencias que hubiese entre machos y hembras de otros grupos.

El mecanismo de diferenciación sexual de exclusiva actuación directa del andrógeno que se sugirió para el NESTpm de ratas Wistar (Del Abril, Tesis Doctoral, 1988) no es factible en este caso, como tampoco lo es el descartar la existencia de actividad de la Aromatasa en el NESTpm. De hecho, se ha detectado una amplia actividad de la enzima Aromatasa (Aro) en el NEST (Roselli y cols., 1996; Roselli y Resko, 1997; Negri-Cesi y cols., 2001). Durante el período embrionario, en el E15, se encontraron neuronas inmunorreactiva a la Aromatasa (Aro-ir) en machos y hembras en el NEST (Tsuru y cols., 1994) y entre los días embrionario E18 y E20, la actividad del ARNm del gen de la enzima Aro es especialmente abundante en NEST de los machos (Lauber y Lichtensteiger, 1994; Lauber y cols., 1997). Postnatalmente el ARNm del gen de la Aro experimenta, en ambos sexos, una elevación en el P2 (Raab y cols., 1995), momento en el que su presencia en el NEST es significativamente mayor en los machos (Lauber y cols., 1997). La existencia de actividad de la enzima Aromatasa en el NEST, así como su presencia diferencial entre machos y hembras en épocas tempranas y probablemente críticas del desarrollo, estarían avalando la posibilidad de que la

diferencia en este subnúcleo, tanto en machos como en hembras, se produjese debido al estradiol aromatizado de la testosterona.

Por otro lado, existen evidencias de que en el NEST hay receptores para estrógenos. En ratas Wistar hembras adultas los receptores de estrógenos se expresan acorde a su estado cíclico, siendo la ocupación de receptores de estradiol (*ER*) baja durante el estro (del 9%) y ascendiendo hasta el 46 % de ocupación en proestro (Yuan y cols., 1995). Tratándose de los machos Wistar en el NEST, hay un 55 % de receptores de estrógenos ocupados, pero si son gonadectomizados, este porcentaje se reduce a un 0 % (Yuan y cols, 1995).

En ratas de raza Wistar, si se someten a castración a los machos el día P1, los valores del NESTpm en volumen y número de neuronas quedan reducidos hasta los valores típicamente femeninos, mientras que si a las hembras se les trata con propionato de testosterona (PT) en el mismo día P1, sus valores se masculinizan incrementándose (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Estos datos en ratas de raza Wistar estarían en consonancia con los que hemos expuesto en este caso. La ausencia de andrógenos en los machos desde el día postnatal 1 estaría impidiendo que el proceso de masculinización, llevado a cabo por el estradiol aromatizado de la testosterona, llegase a su fin. La ocupación de los receptores de estrógenos en los machos Wistar tras la castración hubiera sido reducida al 0 % (Yuan y cols, 1995), no pudiendo por ello culminar el proceso de masculinización normal que el estradiol hubiese llevado a cabo, aunque se hubiese iniciado el proceso de masculinización del NESTpm en época embrionaria, puesto que en el NESTpm se da actividad de la enzima Aromatasa en esta época (Lauber y Lichtensteiger, 1994; Tsuru y cols., 1994; Lauber y cols., 1997).

En las hembras de raza Wistar, por su parte, la administración de testosterona en el P1 podría estar incidiendo en que actuase ésta directamente provocando un incremento en el número de neuronas del NESTpm, o bien induciría una mayor actividad de la Aromatasa sobre esa testosterona que provocaría un aumento de estradiol, traduciéndose como consecuencia, uno, o bien ambos mecanismos, en un incremento de los parámetros femeninos hasta asimilarse al macho, como nosotros hemos sugerido que sucede en las hembras *Tfm* y hermanas.

Estos resultados nos sugieren que el mecanismo que media en la morfología definitiva del volumen y el número de neuronas en el NESTpm de las ratas machos empleadas en este experimento es principalmente la actuación del estradiol. Respecto a las hembras, el mecanismo responsable pudiera ser la actuación del andrógeno o la actuación del estradiol o ambas.

La mutación en el receptor de andrógenos se pone de manifiesto en el NESTpm a nivel de madre portadora de la mutación sólo en las hembras, ya que las hembras *Tfm* y hermanas, al haber compartido el seno materno de una madre portadora de la mutación, poseen un número de neuronas significativamente superior que el que presentan las hembras de la misma raza, que no han compartido este ambiente hormonal.

Recopilando lo que hemos comentado hasta ahora, podríamos decir que en el NEST de las ratas analizadas en este experimento existe una subdivisión sexualmente isomorfa, el NESTma, donde lo determinante para el establecimiento del número de neuronas definitivo en los machos es la cantidad de andrógenos que haya y en las hembras, la cantidad de andrógenos o de estradiol o ambas. En esta subdivisión la mutación está actuando a nivel de madre portadora en ambos sexos y a nivel de individuo, reflejado en el grupo de machos *Tfm*, que no difieren de los machos de la misma raza porque el andrógeno no pudo actuar en ellos incrementando el número de neuronas. Existe, asimismo, otra estructura isomorfa sexualmente, el NESTla, en la que para el establecimiento definitivo del número de neuronas, estaría actuando, predominantemente, el estradiol en los machos y en las hembras una posible inhibición de los andrógenos, puesta de manifiesto en las hembras *Tfm*. En esta subdivisión del NEST, la mutación estaría afectando a nivel de madre portadora, tanto en machos como en hembras y a nivel de posesión individual de la mutación en el grupo de hembras *Tfm*, ya que poseen más neuronas que las hembras de la misma raza porque no han actuado los andrógenos inhibiendo el desarrollo en éstas. Y por último, existe una estructura sexodimorfa, el NESTpm, en la que lo determinante para el establecimiento del patrón sexualmente dimorfo, así como para el desarrollo definitivo de la estructura en los machos, es el estradiol aromatizado de la testosterona y en las hembras es esto mismo y/o la testosterona directamente. La mutación, en el caso del NESTpm estaría incidiendo a nivel de madre portadora, puesta de manifiesto sólo en los grupos de hembras.

En relación con los supuestos mecanismos comentados que estarían incidiendo en el desarrollo de las diferentes estructuras del NEST, estas posibilidades han sido extraídas considerando las actuaciones conocidas de la testosterona y del estradiol sobre otras regiones cerebrales y sobre estas mismas en ratas Wistar. Sin embargo, tal y como se expuso en el Capítulo 1, los mecanismos que estos esteroides llevan a cabo para provocar el desarrollo diferencial de los sexos son redundantes, complicados y a veces confusos, hasta el punto de haberse propuesto, como forma de actuación definitiva de los esteroides, una conversación cruzada o *cross talk* entre todas las variables que pudieran estar incidiendo en esta compleja maquinaria de desarrollo diferencial (figura 1.6.) (Segovia y cols., 1999). Esto supone que, en los mecanismos supuestos para el desarrollo diferencial del NEST, no se han descartado otras variables que posiblemente estén incidiendo en el número definitivo de neuronas. Estas variables, sin embargo, se han demostrado que pueden estar impulsadas o moduladas por los esteroides gonadales, como en los casos de la proteína fosforilada *pCREB* y los estrógenos (Meyer y cols., 1993; Gu y Moss, 1996; Murphy y Segal, 1997; Walton y cols., 1999; Bergado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000; Küppers y cols., 2001; Behl, 2002), en el coactivador del receptor del ER β 1 *SRC-1* (McEwen y Alves, 1999; McEwen 1999b; Auger y cols., 2000), en los genes productores de proteínas antiapoptóticas *bcl-2* y *bcl-x_L* y el estradiol (García-Segura y cols., 1998b; McEwen y Alves, 1999b; Harms y cols., 2001) o en la posible actuación no genómica del estradiol a través del receptor de membrana NMDA (Gazzaley y cols., 1996; Woolley y cols., 1997; Rupprecht y Holsboer, 1999).

Por ello, dado que los animales experimentales empleados en esta investigación poseen una alteración en el receptor de andrógenos, que a su vez conlleva otras alteraciones endocrinas referidas a la testosterona, DHT y estradiol en plasma (Naess y cols., 1976; Roselli y cols., 1987; Krieg y cols., 1990) y otras, las conclusiones que podemos derivar de los resultados morfológicos cerebrales han de estar necesariamente vinculados a estas hormonas, pero sin descartar otras variables, relacionadas con los esteroides, que pudieran estar incidiendo en el número definitivo de neuronas del NEST en estos animales.

Capítulo 5

Experimento 2: Conducta Maternal natural en ratas *Tfm*.

Las actuaciones dirigidas al cuidado de las crías en los mamíferos supone un despliegue conductual necesario para la supervivencia de la camada y a la larga, un beneficio para la especie. Tal y como comentamos en el Capítulo 1, esta conducta en muchas especies es de naturaleza sexodimorfa, en el sentido de que es la hembra la que mayoritariamente ejecuta las pautas conductuales destinadas al cuidado de sus crías (Rosenblatt, 1967; Numan, 1994a; Del Cerro, 1998). Teniendo en cuenta esta característica, quisimos comprobar en qué medida la condición de mosaicismo que presentan las hembras *Tfm* ($X^{Tfm}X$) podría estar repercutiendo sobre el cuidado que desplegaran sobre sus crías, las cuales son también, algunas de ellas, portadoras de la mutación.

La conducta maternal en hembras de estas características no se ha investigado previamente. Los trabajos que existen sobre hembras *Tfm* se han centrado en las características y la morfología del Núcleo Espinal Bulbocavernoso (NEB) (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001). Dada la particularidad que presentan en sus células, al ser la mitad de estas células insensibles a los andrógenos (*Tfm*), las provenientes del gen materno mutado y al ser la otra mitad de sus células sanas, las provenientes del gen paterno sano, el estudio del NEB en estas

hembras mosaico permite vislumbrar el efecto diferencial que la administración de andrógenos pueda efectuar sobre las células sanas y las mutadas (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001). Esta peculiaridad supone para las hembras *Tfm* que el andrógeno no puede actuar en su totalidad, pudiendo repercutir por ello en la expresión de conductas dependientes del ambiente hormonal, como sucede con la conducta maternal natural.

Las hormonas que están siendo modificadas de manera natural durante la conducta maternal son, como se comentó en el Capítulo 1, el estradiol, la progesterona, la prolactina y la oxitocina. Sin embargo, a los andrógenos y la repercusión que éstos pudieran tener sobre esta conducta, no se les ha prestado demasiada atención, estudiándose sólo en algunas especies y no muy abundantemente. En ratones, conejos, jerbos y primates se ha encontrado que la testosterona es elevada en hembras durante la gestación y la lactancia (González-Mariscal y Poindron, 2002) y en ratas machos alojados con sus crías se da una correlación positiva entre la testosterona en plasma y la conducta paternal de éstos (Reburn y Wynne-Edwards, 1999; González-Mariscal y Poindron, 2002). Por estos motivos el estudio de la conducta maternal en hembras portadoras de la mutación en el receptor de andrógenos puede ser informativo de la función que desempeñen los andrógenos en el desarrollo de esta conducta.

Algunos investigadores han relacionado la subdivisión ventral del NEST y su conexión con el APM con la conducta maternal natural (Numan y Sheehan, 1997; Lonstein y cols., 2000; Lonstein y De Vries, 2000; Stack y cols., 2002), estando esta conexión NESTv-APM implicada en conductas maternas motoras, tales como el acarreo, el lamido y el acicalamiento de las crías (Numan y Numan, 1996; Numan y Sheehan, 1997; Lonstein y De Vries, 2000), mientras que las conductas quiescentes, como la postura de amamantamiento, dependen de otra región cerebral, que es la sustancia gris periacueductal, parte ventrocaudal (SGPvc) (Lonstein y Stern, 1997; Lonstein y De Vries, 2000; Stern y Lonstein, 2001). El NESTpm envía eferencias entre otras, al APM (Swanson y Cowan, 1976,1979; Hutton y cols., 1998). Por otro lado, una parte de la subdivisión lateral del NEST, la juxtacapsular, envía proyecciones, entre otras regiones, a la sustancia gris periacueductal (Dong y cols., 2000). Dado que el NESTpm y el NESTla han sido analizados y cuantificados morfológicamente en el experimento anterior y dado que el NESTpm parece mantener conexiones con regiones

muy relevantes para el despliegue de la conducta maternal natural en las hembras (APM), los datos morfológicos podrán contribuir a interpretar los datos conductuales.

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1.1. Sujetos.

Las mismas 12 hembras obtenidas de la Universidad de Berkeley, que fueron cruzadas para obtener la camada de animales experimentales empleados para el primer experimento, fueron cruzadas de nuevo con otros 12 machos de raza Wistar (Charles River, Criffa; Saint-Aubin-Lès- Elbeuf, France). Igual que en el primer caso, las hembras preñadas fueron alojadas en el estabulario del Departamento de Psicobiología de la Universidad Nacional de Educación a Distancia, en jaulas individualizadas con serrín y viruta suficiente para construir el nido, disponiendo de agua y comida *ad libitum*. Las condiciones de temperatura y humedad permanecieron constantes ($22 \pm 1^\circ \text{C}$ y una humedad del 60 %), al igual que el ciclo luz-oscuridad (luz de 8:00 am - 20:00 pm) que se controló mediante un reloj automático.

De esta segunda generación de animales se obtuvieron las hembras experimentales de la observación de conducta maternal. Una vez nacidas estas crías de la segunda generación, permanecieron con sus madres hasta los 21 días, momento en el cual fueron destetadas y alojadas en jaulas individuales, en condiciones de temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) y humedad constantes (del 60 %) y con el ciclo luz-oscuridad invertido (luz de 20:00 pm a 8:00 am), controlado por un reloj automático, para poder realizar la observación y registro de la conducta maternal durante el momento del día más activo de las ratas, su noche, siendo de día para nosotros.

A los 75 días de edad se procedió a obtener su sangre para realizarles el análisis de ADN mediante PCR y establecer así su condición genética. Tras ser anestesiadas con tribomoetanol (250 mg/g), se les extrajo sangre del seno venoso ocular, empleando una pipeta "pasteur" impregnada en anticoagulante (Edta Kf). Posterior a la extracción, se limpiaba la herida con agua destilada. La sangre de esta segunda generación fue

analizada mediante la técnica de PCR descrita para el experimento 1, de manera que los grupos experimentales seleccionados según los resultados obtenidos con la PCR, fueron los siguientes:

- Grupo de hembras portadoras (**HTfm**): en el gel de poliacrilamida presentan tres bandas, una de 135 pb (la enzima no ha cortado) y dos de 79 pb y de 56 pb (corresponden a la copia del gen *Ar* del X sano). N = 13.
- Grupo de hembras hermanas compañeras de camada (**HH**): en el gel presentan el gen *Ar* cortado (fragmentos 79 pb y 56 pb). Estos animales son hijas de madres portadoras. N = 11.
- Grupo de hembras de la misma raza (**HMR**): estas hembras presentan las mismas bandas que las hembras hermanas de camada (fragmentos 79 pb y 56 pb de los genes sanos *Ar*), pero sus madres no son portadoras de la mutación. N = 6.

Una vez seleccionados los sujetos experimentales tras el análisis por PCR, para que el experimento fuese ciego, se procedió a tapar las etiquetas de las jaulas de las hembras experimentales con otras etiquetas blancas, para que ni la numeración ni su condición genética fueran visibles. Se pidió a un miembro del personal de laboratorio que escribiera un número en las etiquetas blancas de las jaulas con un orden aleatorio y según ese orden, se realizó la observación experimental.

A la edad de 90 días, estas hembras fueron alojadas en sus jaulas con un macho Wistar cada una (Charles River, Criffa; Saint-Aubin-Lès- Elbeuf, France) durante una semana, tiempo suficiente para que fueran fecundadas. Después de esa semana, se les extrajo el macho de las jaulas y se esperó el tiempo requerido de gestación. La observación de cada animal empezó a realizarse el día en el que se produjo el parto de cada hembra.

5.1.2. Registro de conducta maternal: *Maternal Behavior Recorder (MBR)*.

La conducta maternal en las ratas supone unas pautas de comportamiento estereotipadas por parte de la madre, que se van desvaneciendo en el tiempo, según las crías van madurando. Estas pautas de comportamiento estereotipadas son asombrosamente similares en todas las hembras que han tenido crías, dándose en la misma secuencia temporal en todas las hembras y difiriendo entre ellas en aspectos sutiles como el tiempo empleado en llevar a cabo estas conductas o la frecuencia con la que las ejecutan.

Además de esta similitud en el comportamiento de las hembras, estas conductas están perfectamente definidas operacionalmente, de manera que su observación, identificación y registro se ven facilitados (figura 5.1.).



Figura 5.1.: Fotografía en la que se puede apreciar la expresión de algunas conductas maternas, como el acarreo de las crías del lugar extraño al nido (A y B), la adopción de la postura de amamantamiento para facilitar el acceso a los pezones a las crías (C), el lamido anogenital, para estimular el desarrollo de las crías (D) y por último, las crías amontonadas en el nido para combatir la hipotermia (E). *Cortesía de la Dra. Pérez-Laso.*

La observación de estas conductas se realizó desde el día del parto (P1) hasta el día 5 de vida de las crías (P5), realizándose el registro a la misma hora cada uno de los días (de 9: 00 am a 14: 00 pm) durando el registro para cada animal 10 minutos. Lo primero en evaluar es la calidad del nido, según el criterio que se expone a continuación. Posteriormente, tras haber sacado a las crías del nido, procurando dejarlo intacto, se colocan a las crías en la esquina opuesta al nido. Una vez colocadas las crías en este lugar, se inician los 10 minutos de observación, considerándose y por lo tanto registrándose todas las conductas dirigidas al cuidado de las crías que se ajusten a las definiciones operacionales que se exponen a continuación (Guillamón y cols., 1993; Del Cerro, 1998) (figura 5.1.):

- Calidad del nido: la construcción de éste es la primera manifestación maternal en la hembra y lo lleva a cabo en los últimos días de gestación y durante toda la lactancia. Consiste en almacenar el material del que disponga (virutas, serrín, tiras de papel, etc.) en un rincón de la jaula, para construir paredes que protejan a las crías del frío y ayude a mantenerlas juntas. La evaluación de la calidad del nido atiende a dos principios. Por un lado, la calidad en su construcción, según tenga las paredes más o menos definidas y formadas para que pueda cumplir su propósito de protección de las crías. Y por otro lado, es importante considerar si todas las crías que hay están o no dentro del nido. Según estos dos criterios, la calificación del nido va de 0 (no hay nido construido y las crías están esparcidas por la jaula) a 4 (nido muy bien construido y todas las crías dentro de él).
- Acarreo de las crías: una vez sacadas a las crías del nido y colocadas en el lugar contrario a éste, la hembra recoge una por una a las crías con la boca y las vuelve a colocar en el lugar del nido. Va y vuelve del nido al lugar donde están las crías tantas veces como crías tenga. De esta conducta se registra la rapidez con la que la hembra es capaz de recoger a la camada completa (latencia de acarreo) y el porcentaje por grupo de las hembras que han realizado el acarreo completo cada día de registro.
- Limpieza general de las crías o acicalamiento: una vez llevadas las crías a su nido de nuevo, las hembras suelen desplegar toda una serie de conductas de

acicalamiento y cuidados hacia ellas, destinadas a ayudarlas a mantener la temperatura corporal y a estimularles el crecimiento. El acicalamiento consiste en lamer a las crías por la cabeza y el dorso mientras que la madre las sostiene con sus patas. De esta conducta se registra el tiempo total que la madre emplea en realizar esta conducta y la frecuencia con la que la lleva a cabo.

- Lamido anogenital: forma parte de las conductas de limpieza o acicalamiento, pero por su relevancia se registra de manera independiente. Tal y como se comentó en el Capítulo 1 referente a la conducta maternal, este comportamiento es muy importante y definitorio de la motivación maternal de la madre. Consiste en que, mientras la madre sostiene a la cría con sus patas, concentra la limpieza, el lamido y la estimulación en la zona anogenital. De esta conducta también se registra el tiempo total que la madre emplea en llevar a cabo el lamido anogenital y la frecuencia con la que esta conducta es practicada.

- Contactos: en esta categoría conductual entran todas aquellas aproximaciones efectuadas por la madre hacia las crías que no sean ni acicalamiento ni lamido anogenital, esto es, por ejemplo olerlas o moverlas con el hocico. Se registra de ella, igualmente, el tiempo total dedicado a desplegar esta conducta y la frecuencia con la que es practicada.

- Postura de amamantamiento: por último, la conducta definitoria del estado de lactancia, la postura que adopta la hembra cubriendo a las crías con su región ventral para facilitar el acceso a los pezones y proporcionarles calor. Al igual que el lamido anogenital, su ejecución supone una expresión muy importante de la motivación maternal existente. De esta conducta se registra el tiempo total que la madre permanece en esta postura y la frecuencia con la que las hembras la adoptan.

Para llevar a cabo el registro de estas manifestaciones conductuales maternas, se empleó el programa informático diseñado para tal efecto *MBR (Maternal Behavior Recorder)* (Claro y cols., 1994). Este programa permite registrar todas estas variables conductuales, en sus dimensiones temporales de tiempo total y frecuencia. Además, por su diseño, permite corregir de manera sencilla los posibles fallos de registro cometidos por el observador después del período de observación. También ofrece la posibilidad de que haya más de un observador registrando con el programa, bien sobre el mismo animal, para generar criterios de fiabilidad inter jueces, bien dos personas registrando animales diferentes, posibilitando agilizar la observación o bien un mismo observador registrando a dos animales simultáneamente, permitiendo reducir a la mitad el tiempo total de observación de los animales (Claro y cols., 1994). Estas combinaciones posibilitan dinamizar el registro de los animales durante su despliegue conductual. Los datos extraídos con este programa, una vez generados los paquetes estadísticos correspondientes, fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 10.0.

5.1.3. Técnicas de análisis de datos

Los datos obtenidos con el programa *MBR* se agruparon en torno a 11 variables dependientes: calidad del nido, tiempo invertido en completar el acarreo (latencia de acarreo) y porcentaje de animales por día que realizaron completo el acarreo, tiempo medio y frecuencia de acicalamiento, tiempo medio y frecuencia de lamido anogenital, tiempo medio y frecuencia de contactos y por último, tiempo medio y frecuencia en mantener la postura de amamantamiento. Los datos se analizaron según su naturaleza, teniendo en cuenta la homogeneidad de varianza y la distribución normal de los datos.

Para determinar la posible diferencia entre los grupos que había en relación a la calidad del nido, y puesto que esta variable posee homogeneidad de varianza y además se distribuye de manera normal, se realizó un ANOVA univariado y posteriormente se compararon las diferencias entre los grupos con la prueba *post hoc* de Bonferroni.

Respecto al acarreo, se realizaron dos pruebas estadísticas diferentes. Para determinar las posibles diferencias entre los grupos en relación al tiempo empleado en

completar el acarreo (latencia de acarreo) cada uno de los cinco días del registro, se empleó la técnica estadística de análisis de varianza unilateral no paramétrico de Kruskal-Wallis y posteriormente el test U-Mann-Whitney para determinar las diferencias específicas entre los grupos. En cuanto a las posibles diferencias entre los grupos respecto al porcentaje por grupo de animales que realizaron el acarreo completo cada día del registro, se empleó la prueba estadística Chi-cuadrado de Pearson (χ^2).

Para el resto de variables dependientes (tiempo y frecuencia de acicalamiento, de lamido anogenital, de contactos y de postura de amamantamiento), se aplicó el mismo análisis estadístico en todas ellas, que fue el análisis de varianza unilateral no paramétrico de Kruskal-Wallis y posteriormente el test U-Mann-Whitney para determinar las diferencias específicas entre los grupos.

Para llevar a cabo estos análisis se emplearon los programas SPSS versión 10.0 para Windows, los programas gráficos Power Point, Microsoft PhotoDraw y Adobe PhotoShop para Windows.

5.2. RESULTADOS.

Comentaremos los resultados según el orden que hemos empleado para referirnos a ellos en el apartado de técnicas estadísticas. En la calidad del nido, existen diferencias significativas entre los grupos ($F_{2, 29} = 16, 527$; $p < 0, 0001$). Realizando la prueba *post hoc* se detecta que, el grupo de hembras de la misma raza, al poseer la media más baja en calidad de nido, difiere significativamente de la hembras *Tfm* y hermanas (HMR vs *HTfm*; $p < 0,0001$; HMR vs HH; $p < 0,002$) (figura 5.2.).

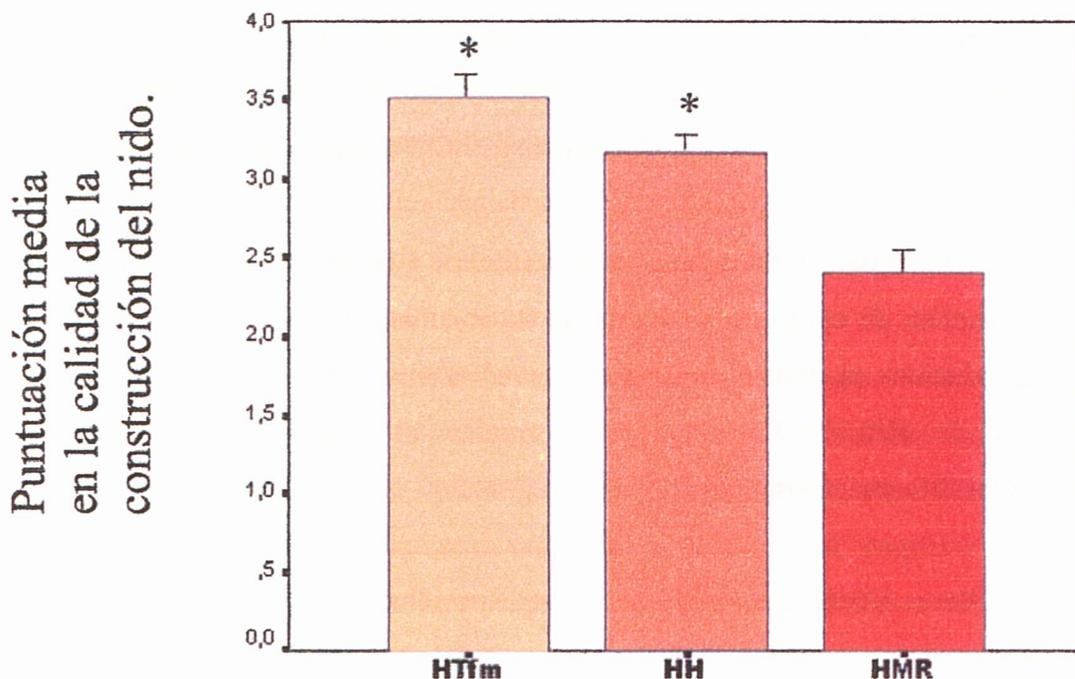


Figura 5.2.: Representación gráfica de la puntuación media obtenida por cada grupo de hembras (**HTfm**: hembras *Tfm*, **HH**: hembras hermanas y **HMR**: hembras misma raza) en cuanto a la calidad de construcción de sus nidos. Se puede apreciar que las HMR construyeron nidos de calidad significativamente menor que las otras hembras.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo HMR.

Tratando ahora el acarreo y el tiempo empleado en llevarlo a cabo (latencia de acarreo) cada día de registro, existen diferencias significativas entre los grupos para el primer (H = 9, 030; $p = 0, 011$) y para el tercer día (H = 6, 272; $p = 0, 043$) de observación. La prueba de U-Mann-Whitney revela que las diferencias entre los grupos se localizan, en el primer día de registro, entre las hembras de la misma raza y las hembras hermanas (HMR vs HH; $p < 0, 003$) y, en el tercer día de registro, entre hembras de la misma raza y las hembras *Tfm* (HMR vs HTfm; $p < 0, 004$). En este caso, a menor latencia de acarreo, mejor ejecución, puesto que supone haber tardado menos en trasladar a la camada completa del lugar ajeno al nido al propio nido, aunque si no presentan ningún valor, supone que nadie del grupo en cuestión realizó el acarreo completo ese día de registro (figuras 5.3. y 5.4.).

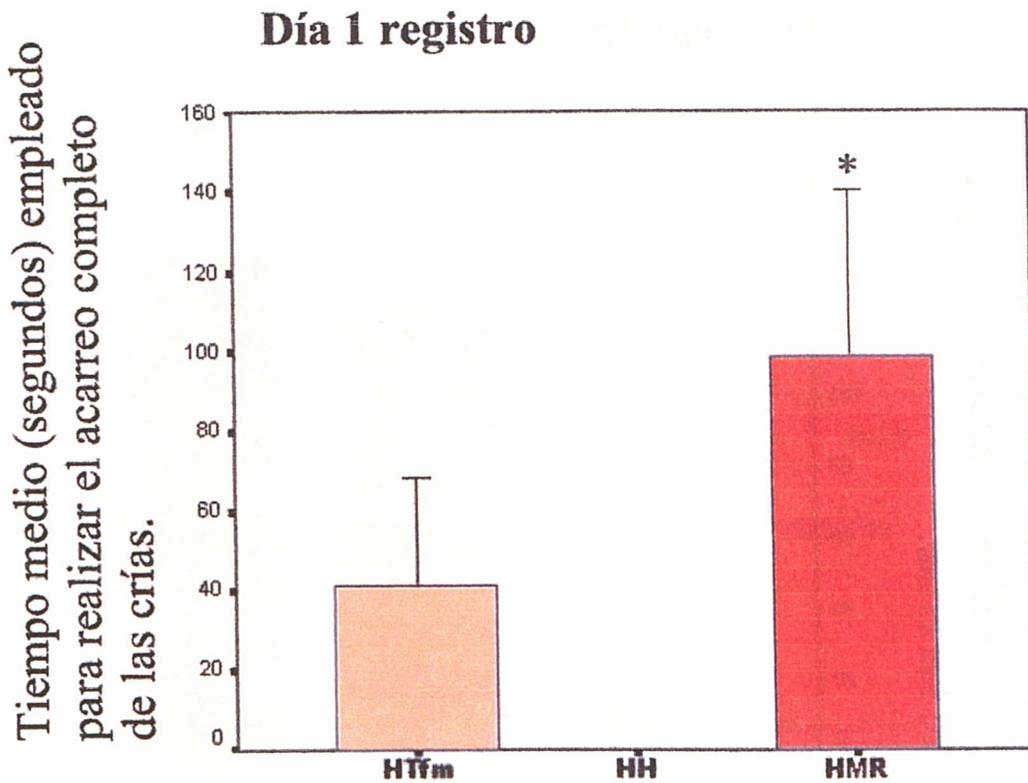


Figura 5.3.: Representación gráfica del tiempo medio empleado por los grupos (**HTfm**: hembras *Tfm*, **HH**: hembras hermanas y **HMR**: hembras misma raza) para llevar a cabo el acarreo completo de las crías en el primer día de registro. El grupo HH no presenta ningún valor ya que ninguno de sus miembros completó el acarreo ese día de registro.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo HH.

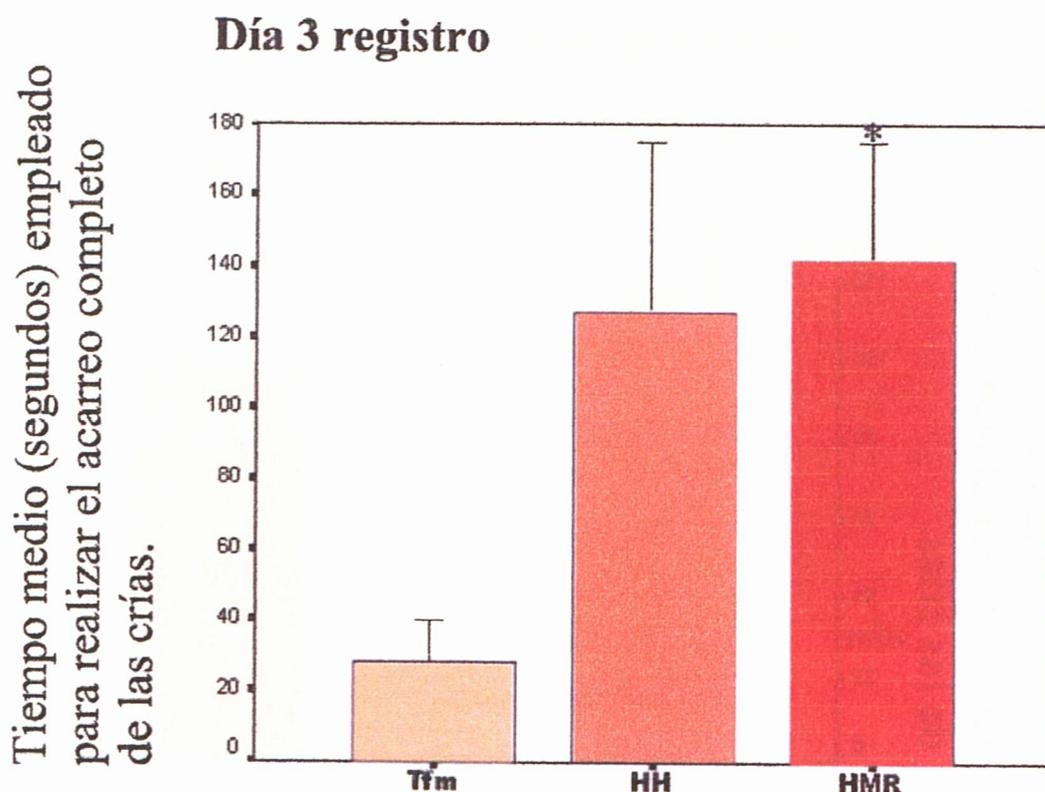


Figura 5.4.: Representación gráfica del tiempo medio empleado por los grupos (**HTfm**: hembras *Tfm*, **HH**: hembras hermanas y **HMR**: hembras misma raza) para realizar el acarreo completo de las crías en el tercer día de registro. Las **HTfm** tardaron significativamente menos tiempo en completar el acarreo que las **HMR**.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo **HTfm**.

Los datos referidos al porcentaje de animales por grupos que realizaban completo el acarreo de las crías durante los diferentes días de observación, se exponen en el siguiente gráfico (figura 5.5.).

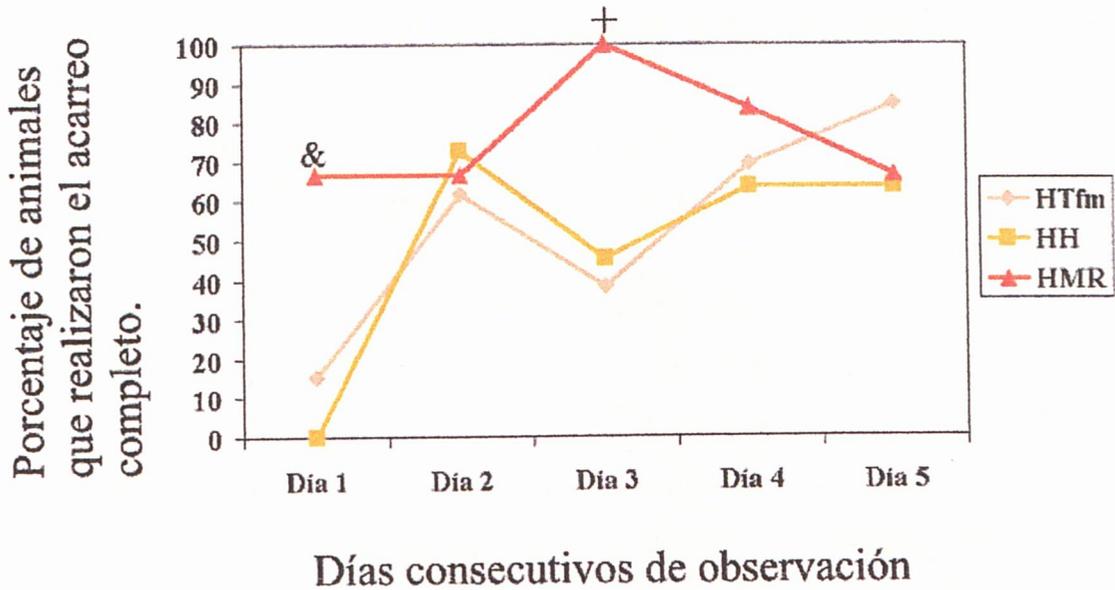


Figura 5.5: Representación gráfica del porcentaje de animales por grupo (**HTfm**: hembras *Tfm*, **HH**: hembras hermanas y **HMR**: hembras misma raza) que realizaron el acarreo completo los cinco días del registro. Se puede apreciar cómo los grupos HTfm y HH van prácticamente al unísono, mientras que el grupo HMR sigue otro patrón diferente.

+: $p < 0,03$ respecto a los grupos HTfm y HH.

&: $p < 0,05$ respecto a los grupos HTfm y HH.

En el primer día, los porcentajes de los grupos que efectuaron el acarreo completo fueron el 0 % de las HH, el 15,38% de las HTfm y el 66,66 % de las HMR. Entre estos grupos para el primer día de registro, existen diferencias significativas entre el grupo HMR y los grupos HH y HTfm (HMR vs HTfm; $p < 0,048$; HMR vs HH; $p < 0,048$). En el tercer día de registro, también se dieron diferencias significativas entre los grupos, que efectuaron el acarreo completo las HMR en un 100 %, las HH en un 45,45% y las HTfm en un 38,46 %. En este caso, igual que en el día de registro 1, las diferencias significativas se dieron entre los grupos HMR y los grupos HH y HTfm (HMR vs HTfm; $p < 0,025$; HMR vs HH; $p < 0,049$ (figura 5.5.)). Estos datos ponen de manifiesto que los grupos de hembras hermanas y *Tfm* van prácticamente al unísono, difiriendo de las hembras de la misma raza, habiendo sido registradas en el despliegue de su conducta maternal en diferentes días, según el parto de cada hembra.

La prueba de Kruskal-Wallis revela que para el resto de variables dependientes, existen diferencias significativas entre los grupos en el tiempo de acicalamiento ($H = 8,739$; $p = 0,013$) y en la frecuencia de acicalamiento ($H = 6,730$; $p = 0,035$); también en el tiempo de contactos ($H = 9,823$; $p = 0,007$).

El test U-Mann-Whitney indica que estas diferencias generales se traducen en diferencias específicas entre los grupos: existen diferencias entre las HMR y HTfm en cuanto al tiempo de acicalamiento (HMR vs HTfm; $p < 0,002$) (figura 5.6.) y en cuanto a la frecuencia de acicalamiento (HMR vs HTfm; $p < 0,011$), al presentar el grupo HTfm los valores mayores y el HMR los menores valores en ambas variables (figura 5.7.). Por otro lado, estos mismos grupos HMR y HTfm también difieren significativamente respecto al tiempo de contacto (HMR vs HTfm; $p < 0,043$) (figura 5.8.) y respecto a la frecuencia de expresión de la postura de amamantamiento (HMR vs HTfm; $p < 0,025$), al poseer de nuevo, en ambos casos, el grupo HMR los valores inferiores (figura 5.9.).

Los grupos HMR y HH difieren significativamente respecto al tiempo de contactos (HMR vs HH; $p < 0,004$), ya que las HMR presentan menos tiempo de contacto con las crías comparados con los otros dos grupos (figura 5.8.).

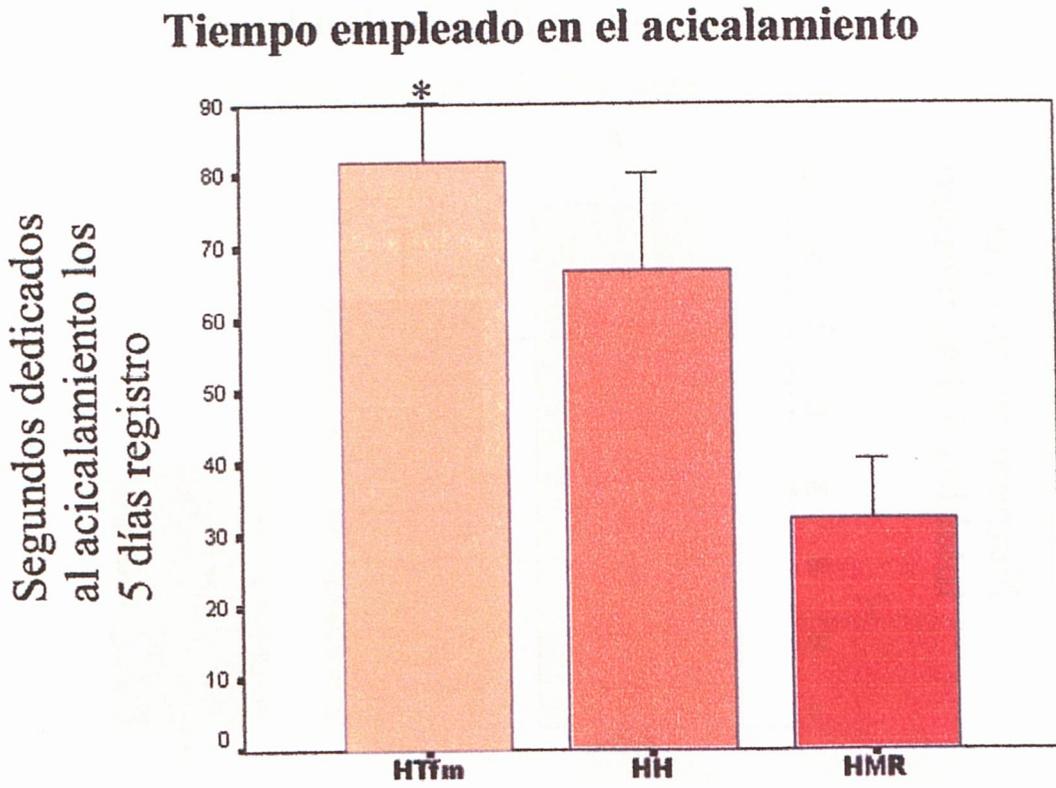


Figura 5.6.: Representación gráfica del tiempo total, por grupos (HTfm: hembras *Tfm*, HH: hembras hermanas y HMR: hembras misma raza), dedicado a la ejecución de la conducta de acicalamiento a las crías. Se distingue en la gráfica que el grupo HTfm invierte significativamente más tiempo en el acicalamiento de sus crías que las HMR.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo HMR.

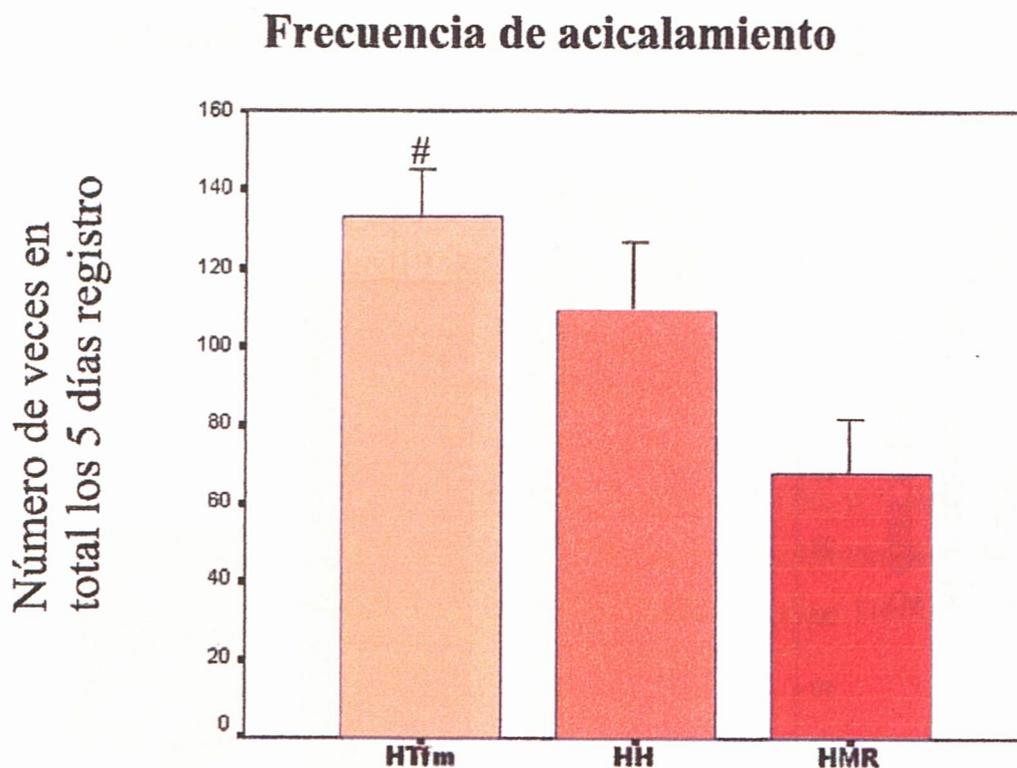


Figura 5.7.: Representación gráfica de la frecuencia con la que fue practicada la conducta de acicalamiento por parte de las madres (**HTfm**: hembras *Tfm*, **HH**: hembras hermanas y **HMR**: hembras misma raza) hacia las crías. Se aprecia que las *HTfm* acicalaron con mayor frecuencia a sus crías que las HMR. #: $p < 0, 01$ respecto al grupo HMR.

Tiempo empleado en el contacto

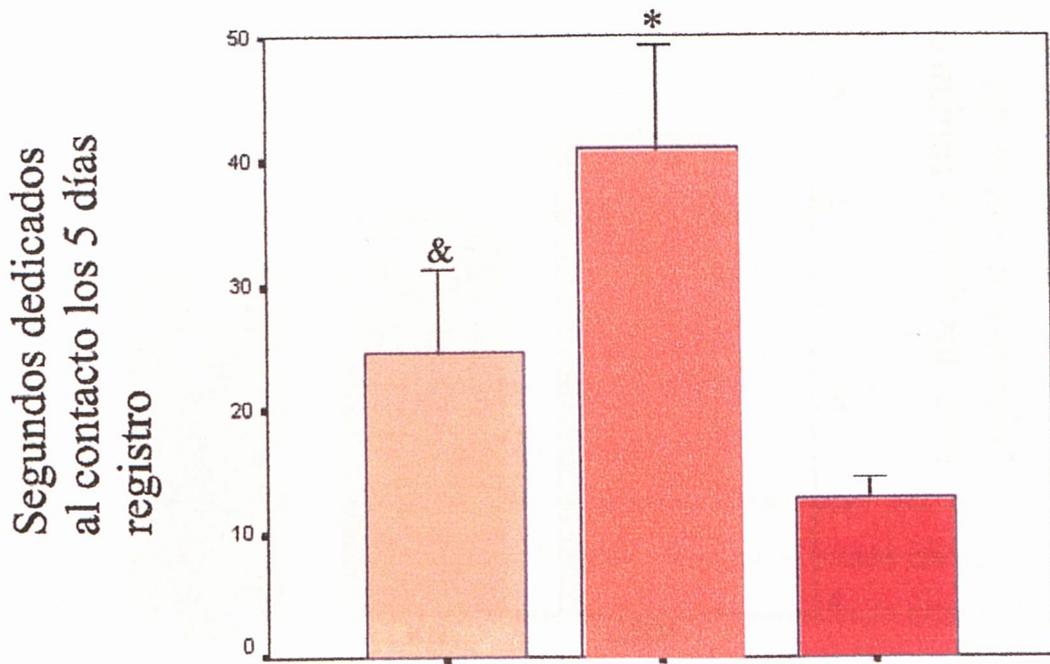


Figura 5.8.: Representación gráfica del tiempo total, por grupos (**HTfm**: hembras *Tfm*, **HH**: hembras hermanas y **HMR**: hembras misma raza), dedicado al contacto de las crías. Se aprecia que tanto la **HTfm** como la **HH** dedican significativamente más tiempo a esta conducta que las **HMR**.
 *: $p < 0,001$ respecto al grupo **HMR**.
 &: $p < 0,05$ respecto al grupo **HMR**.

Frecuencia de expresión de la postura de amamantamiento

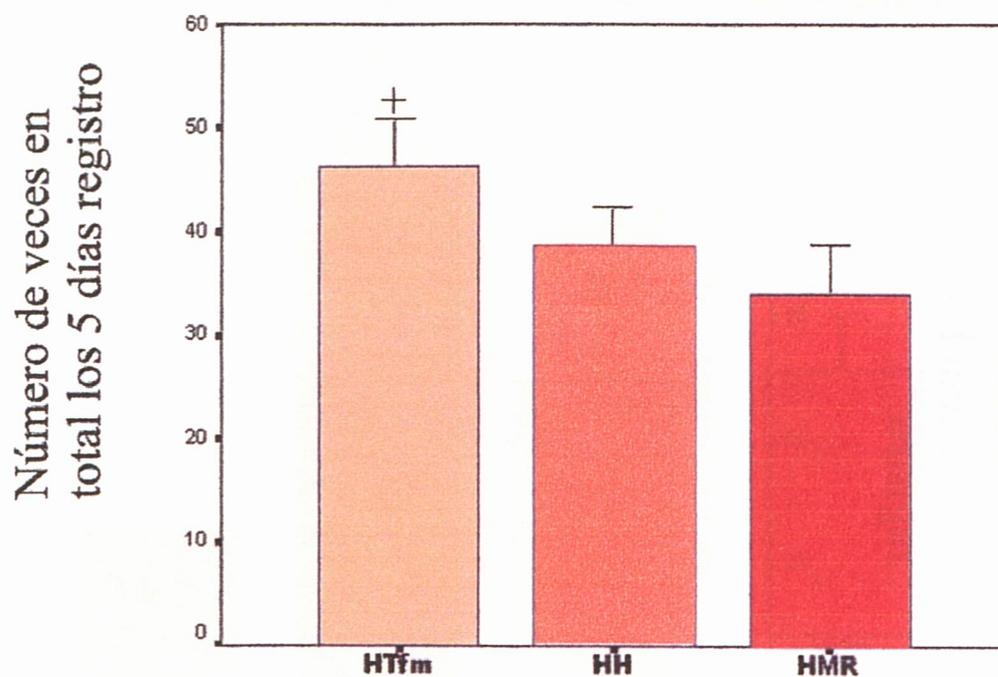


Figura 5.9.: Representación gráfica de la frecuencia con la que fue adoptada la postura de amamantamiento por parte de las madres (**HTfm**: hembras *Tfm*, **HH**: hembras hermanas y **HMR**: hembras misma raza). Las *HTfm* la adoptaron con más frecuencia que las *HMR*.
+: $p < 0,03$ respecto al grupo *HMR*.

5.3. DISCUSIÓN

A primera vista lo más llamativo de estos datos es que los grupos de *HTfm* y de HH no difieren significativamente y sin embargo, sí difieren en algunas variables respecto al grupo HMR. Este hecho viene a demostrar que los animales *HTfm* y los HH poseen una característica en común que los aproxima en conducta y a su vez los diferencia de otro grupo, el HMR. La única característica que las *HTfm* y las HH han compartido y que les diferencia del tercer grupo HMR es el seno materno durante la gestación en una madre mosaico o mutada, de manera que las alteraciones endocrinas que esta mutación pudiera haber causado a las madres repercute tanto en los animales que poseen la mutación (*HTfm*) como en los que no la han heredado (HH). Esto exactamente es lo que se había sugerido que sucedía respecto a la morfología del NEST en el experimento 1, ya que ni el macho *Tfm* difiere significativamente del MH, ni la *HTfm* difiere significativamente de la HH en ninguna subdivisión del NEST. Esta similitud, por haber compartido el ambiente hormonal durante el estado embrionario, se muestra tanto en la morfología cerebral, como en la conducta, pudiendo estar reflejando por un lado los efectos organizacionales y por otro los efectos activacionales de este ambiente hormonal compartido. Esto es, la morfología cerebral del NEST se organizaría durante los períodos críticos de manera similar en animales *Tfm* y hermanos machos y en hembras, por haber compartido el ambiente hormonal embrionario alterado, proveniente de la madre mosaico. Por otro lado, la conducta maternal reflejaría el efecto activacional de este ambiente hormonal compartido, ya que la alteración hormonal persistiría en estado adulto en las *Tfm* y las hermanas y esta modificación hormonal, diferente a la que se daría en una hembra lactante sin mutación y sin relación con esta mutación, activaría diferencialmente el circuito neuronal ya organizado de manera común en las madres *HTfm* y las madre HH. Por este motivo se asimilarían tanto los grupos de *HTfm* y HH en las conductas maternas registradas.

Las hembras *Tfm* y hermanas han demostrado tener los mejores valores en casi todos los parámetros conductuales registrados donde ha habido diferencias entre los grupos: calidad del nido (figura 5.2.), tiempo empleado para el acarreo completo en el primer (figura 5.3.) y tercer día de registro (figura 5.4.), porcentaje de animales por

grupos de animales que efectuaron el acarreo completo el primer y tercer día de registro (figura 5.5.) y el tiempo medio de contactos a las crías (figura 5.8.).

Esta superioridad de las *HTfm* y de las HH frente a las HMR podría interpretarse argumentando que las hembras *Tfm* y hermanas se comportarían de manera más maternal debido a la alteración endocrina que se produce en ellas por motivo de ser hijas de madres portadoras. Bajo este supuesto, las hembras *Tfm* y hermanas tendrían mayor cantidad de estradiol en plasma, hormona muy relacionada con el despliegue maternal, como se expuso en el Capítulo 1. El estradiol en estas hembras estaría incrementado, al contar con el estradiol que poseerían normalmente por su estado de lactancia y además, el que sería aromatizado del supuesto exceso de testosterona circulante en el plasma por motivo de ser hijas de madres portadoras. Este incremento podría estar traduciéndose en la mayor efectividad que muestran las hembras hermanas y *Tfm* en los parámetros conductuales maternos registrados citados anteriormente.

Además, las hembras *Tfm* han diferido significativamente de las HMR en más parámetros conductuales maternos. Éstos son el tiempo total (figura 5.6.) y la frecuencia total (figura 5.7.) dedicada al acicalamiento de las crías y la frecuencia con la que se adoptó la postura de amamantamiento (figura 5.9.). Las madres *Tfm* registradas en esta observación poseen la mitad de sus receptores de andrógenos insensibles, dada su calidad de mosaicos (Freeman y cols., 1996; Monks y cols., 1999; Monks y Watson, 2001; Watson y cols., 2001). Esta insensibilidad parcial a los andrógenos podría provocar que éstas hembras se comportasen de manera más maternal. A este respecto, no existen demasiados datos referentes a la función que desempeñan los andrógenos en la conducta maternal y los que hay, se refieren a otras especies animales (ratones, conejos, jerbos y primates) (González-Mariscal y Poindron, 2002). Sin embargo sí existen abundantes datos referidos al efecto agresivo que los andrógenos desempeñan tanto en ratas hembra y macho en situaciones de ataque a extraños y en el canibalismo o infanticidio de las madres hacia sus crías. Por otro lado se ha detectado una correlación positiva en ratas macho entre la cantidad de testosterona en plasma y la agresividad ante extraños y en ratas hembra, entre la cantidad de testosterona en plasma y el infanticidio (Miley y cols., 1982; Albert y cols., 1988; Albert cols., 1989a; Albert y cols., 1989c; Albert y cols., 1991; Albert y cols., 1992). Por lo tanto, parece ser que la testosterona en ratas está relacionada con conductas alejadas del cuidado maternal (canibalismo,

infanticidio, agresividad) y dado que las hembras *Tfm* poseen la mitad de sus células insensibles a los andrógenos, se podría estar anulando en ellas las conductas promovidas por la testosterona e incrementarse por ello los cuidados maternos hacia sus crías, comparadas con las hembras control de la misma raza. El hecho de que los valores superiores de las variables en las que hay diferencias significativas entre los grupos los presentan las *HTfm*, excepto para el tiempo de contactos y la latencia de acarreo en el primer día de registro, sugiere que esta insensibilidad de los andrógenos podrían tener un reflejo conductual de mejora en la calidad o efectividad del despliegue conductual. Las hembras del grupo HH, aunque no difieran significativamente de las *HTfm* en ningún parámetro conductual, no llegan a alcanzar los valores de éstas, pudiendo deberse a la sensibilidad a los andrógenos que las hermanas presentan.

Por otro lado, las propias crías sobre las que las *HTfm* efectúan el cuidado maternal en esta observación, o poseen esta mutación al haberla heredado de sus madre o han estado compartiendo el seno materno con las que la poseían. Esta variable podría estar, asimismo, incidiendo en que los niveles hormonales de estas crías estuviesen igualmente alterados o modificados, respecto a las crías sobre las que se efectuó el cuidado maternal de las madres de la misma raza, que ni poseen la mutación ni han compartido el ambiente hormonal alterado. Este hecho podría estar repercutiendo en que estas crías despertasen más activamente en sus madres la conducta maternal, pudiendo estar influyendo esta alteración hormonal de las crías en las señales feromónicas que éstas emitan para provocar el cuidado maternal en sus madres. De esta manera la presencia de la mutación en la madre puede condicionar los cuidados que efectúe hacia sus crías primero por la alteración hormonal que la propia mutación efectúa sobre las madres *Tfm* y segundo, por la alteración hormonal que la mutación provocaría sobre sus crías, ambas variables ausentes en las madres de la misma raza y sus crías. Esta relación bidireccional explicaría la diferencia que existe en la calidad maternal entre las madre *Tfm* y las madres control de la misma raza y la ligera inferioridad en los parámetros conductuales que las HH presentan frente a las *HTfm*, puesto que en éstas, las crías no han heredado la mutación ni han compartido el ambiente hormonal alterado, no incidiendo por ello en las señales feromónicas que éstas pudieran emitir para iniciar los cuidados maternos de las hembras hermanas.

Por último, abordaremos la explicación de la conducta maternal según el entramado neuronal. Existen evidencias en la literatura de que el despliegue de conducta maternal es capaz por sí mismo, de cambiar la morfología cerebral de algunos núcleos. Tal es el caso de lo que sucede con las ramificaciones dendríticas del núcleo supraóptico en hembras nulíparas, que se incrementan en longitud tras expresar éstas conducta maternal hacia crías extrañas (Hatton y cols., 1992) o lo que sucede en el APM del ratón de California (*Peromyscus californicus*) macho tras ser paternal con sus crías, que disminuye en su número de neuronas un 20 % (Alberts y Gubernick, 1990).

La olfacción de feromonas a través del SVN está mediando el despliegue de la conducta maternal en las ratas (Fleming y cols., 1979; Wysocki, 1979; Fleming y cols., 1980; Saito, 1986; Halpern, 1987; Wysocki, 1987; Wysocki y Meredith, 1987; Menella y Moltz, 1988a; Menella y Moltz, 1988b; Numan, 1988; Saito y cols., 1988; Meredith, 1991; Del Cerro, 1998). Las proyecciones primarias (BOA) y secundarias (NEST, NTOA y amígdala) del SVN son muy relevantes para que la conducta maternal se lleve a cabo (Segovia y Guillamón, 1993; Guillamón y Segovia, 1996; Del Cerro, 1998). Respecto a las proyecciones terciarias del SVN implicadas en la conducta maternal natural, se propone que lo determinante es la conexión que se establece entre el APM y el área tegmental ventral, a través de las conexiones que el área preóptica lateral (APL) envía (Numan, 1994a).

Algunos autores han sugerido que la conexión que se establece entre el NESTv y el APM son muy importantes en el establecimiento de conductas maternas motoras, tales como el acarreo, el lamido y acicalamiento de las crías (Numan y Numan, 1996; Numan y Sheehan, 1997; Lonstein y De Vries, 2000; Stack y cols., 2002), mientras que otras conductas más estáticas como la postura de amamantamiento, dependerían de la sustancia gris periacueductal, parte ventrocaudal (SGPvc) (Lonstein y Stern, 1997; Lonstein y De Vries, 2000; Stern y Lonstein, 2001).

La subdivisión NESTpm envía eferencias al APM (Swanson y Cowan, 1976, 1979; Hutton y cols., 1998). Esta región ha sido analizada morfológicamente en el experimento 1, en el que se demostró que *HTfm* y *HH* poseen unos valores significativamente superiores en número de neuronas al grupo de HMR. El NEST está implicado en el circuito neuronal que media la conducta maternal y, aunque la

subdivisión que ha sido más estudiada en relación a las conductas motoras maternas de acarreo, acicalamiento y lamido de las crías, es el NESTv, (Numan y Numan, 1996; Numan y Sheehan, 1997; Lonstein y De Vries, 2000; Stack y cols., 2002), el NESTpm podría estar relacionado indirectamente con estas conductas. Y es que las hembras *Tfm* (*HTfm*), que poseen valores superiores a las hembras control de la misma raza (HMR) en el número de neuronas del NESTpm (Experimento 1 de esta Tesis Doctoral, figura 4.16.), también presentan conductas maternas significativamente superiores a éstas en cuanto a la calidad del nido (figura 5.2.), en cuanto a la latencia del acarreo en el tercer día de registro (figura 5.4.), en cuanto al porcentaje de animales que efectuaron el acarreo completo el primer y tercer día de registro (figura 5.5.) en cuanto al tiempo total (figura 5.6.) y la frecuencia (figura 5.7.) dedicada al acicalamiento de las crías y en cuanto al tiempo de contacto con las crías (figura 5.8.). Por su parte, las hembras hermanas (HH), que también presentan un número significativamente superior de neuronas que las HMR en el NESTpm (figura 4.16.), también superan a éstas en la calidad del nido (figura 5.2.), en el tiempo empleado en el acarreo el primer día de registro (figura 5.4.), en el porcentaje de animales que efectuaron el acarreo completo el primer y tercer día de registro (figura 5.5.) y en el tiempo total dedicado al contacto de las crías (figura 5.8.). Todas estas conductas encajarían en lo que los autores llamaron conductas motoras maternas, para las que la conexión del NESTv con el APM y probablemente la conexión que existe entre el NESTpm y el APM (Swanson y Cowan, 1976, 1979; Hutton y cols., 1998) están siendo determinantes.

Por otro lado, una parte de la subdivisión lateral del NEST, la juxtacapsular, (NESTjxt) envía proyecciones a la sustancia gris periacueductal (SGP) (Dong y cols., 2000). La SGP parte ventrocaudal (SGPvc) está mediando conductas estáticas maternas como el mantenimiento de la postura de amamantamiento, que se desencadenan una vez iniciada la conductual maternal y se mantiene por la relación de estimulación bidireccional que se establece entre madre y crías (Stern y Lonstein, 2001). En nuestro caso, la región analizada en el experimento 1 de la subdivisión lateral del NEST fue la NESTla, en la que las hembras *Tfm* (*HTfm*) presentaron valores significativamente superiores a los que presentaban las HMR, debido a un posible efecto inhibitorio del andrógeno en el desarrollo de esta región, ausente en las hembras mosaico por su condición de insensibilidad a los andrógenos (figura 4.14). La frecuencia con la que las *HTfm* adoptaron la postura de amamantamiento fue significativamente mayor a

la que presentaron las HMR, pudiendo poner de manifiesto una posible relación del NESTIa con la conexión que el NESTjxt mantiene con la SGPvc. En el caso de las HH, no difirieron significativamente de las HMR respecto al número de neuronas del NESTIa (figura 4.14.) y tampoco hubo diferencias entre ellas en cuanto a la frecuencia con la que adoptaron la postura de amamantamiento con sus crías.

Esta relación entre el número de neuronas en una estructura y la ejecución de la conducta asociada a esa estructura ya fue sugerida para las estructuras del SVN y la conducta sexual de los machos y las hembras (Segovia y Guillamón, 1993). Esta teoría explicativa propone una explicación funcional a los patrones cerebrales sexualmente dimorfos, tanto en machos como en hembras, que es aplicable para los resultados de conducta maternal obtenidos en este experimento. Nosotros sugerimos una posible relación entre la subdivisión del NESTpm y su número de neuronas en la hembra con conductas motoras maternas y de igual manera, sugerimos una posible relación entre la subdivisión NESTIa y el número de neuronas que presente con conductas maternas más quiescentes. La superioridad en el número de neuronas de estas regiones cerebrales podría estar incidiendo en que las conductas asociadas a estas regiones se efectuasen de manera más pronunciada o bien, en que conductas antagónicas a la maternal específica fuesen inhibidas por las neuronas supernumerarias. A este respecto, tanto para entender el significado de las neuronas supernumerarias en el NESTpm y NESTIa de las hembras *Tfm* traducidas en una mejor ejecución conductual maternal, como para esclarecer la función exacta que desempeñan estas dos regiones concretas del NEST en la conducta maternal, es necesario más investigación.

Capítulo 6

Experimento 3: Volumen y población neuronal en el Núcleo de la Estría Terminal en ratas de raza Wistar y Long Evans

Los resultados obtenidos en el experimento 1 ponen de manifiesto que en la raza analizada, raza resultado de la combinación de la raza King-Holtzman con Long Evans y Wistar, no existía dimorfismo sexual en la región cerebral del NESTma y NESTla. Estas subdivisiones eran sexualmente isomorfas, contrariamente a lo que se había encontrado que sucedía en las ratas de raza Wistar, en la que estas mismas subdivisiones presentaban dimorfismo sexual, siendo superior las hembras respecto al macho en cuanto a número de neuronas y volumen (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b). Este dato nos hizo plantearnos la posibilidad de que, en el fenómeno de diferenciación sexual, la variable raza pudiera tener alguna relevancia. Por ello, quisimos averiguar qué sucedía en estas mismas subdivisiones en otras razas diferentes de la estudiada en el experimento 1, pero relacionadas con ésta.

Como comentamos con anterioridad, los animales empleados en el experimento 1 habían sido múltiples veces cruzadas con animales de raza Long-Evans (Dra. Jordan, comunicación personal a la autora). Por nuestra parte, además, los cruces de estas hembras portadoras de la mutación siempre se realizaron con ratas macho de la raza Wistar (Charles River, Criffa; Saint-Aubin-Lès- Elbeuf, France), de manera que los

animales analizados morfológicamente en el experimento 1 eran hijos de madres cuyo origen era una mezcla indefinida de ratas King-Holtzman con Long-Evans y de padres de origen claro de raza Wistar. Pudiendo haber interferido esta mezcla de razas en la ausencia de dimorfismo sexual en las subdivisiones NESTma y NESTla, nos planteamos analizar las subdivisiones del NESTma, del NESTla y del NESTpm en ratas de raza pura Wistar y Long-Evans.

Las ratas de raza Wistar y Long Evans pertenecen ambas a la familia *Rattus Norvegicus*, concretamente al orden: *Rodentia*; suborden: *Myomorpha*; familia: *Muridae*; subfamilia: *Murinae*; género: *Rattus*; especie: *Norvegicus*. La raza Wistar (WI), también conocida como rata blanca o albina, es la que antes se empezó a criar como animal domesticado de investigación por el Instituto Wistar. Éste se dedicó a criarlas desde 1947 hasta 1975, momento en el que la casa Charles River United Kingdom se hizo cargo hasta la fecha. Por otro lado, la raza Long Evans (LE), también conocida como rata moteada o picazo, tiene su origen en 1915, cuando los Drs. Long y Evans cruzaron varias ratas hembra blancas del Instituto Wistar con un macho gris salvaje (Zucker, 1960; Russel-Lindsay, 1979; Pass y Freeth, 1993).

Existen datos que aportan evidencias de que estas dos razas se diferencian a varios niveles. Exactamente hay datos en la literatura que ponen de manifiesto que difieren conductualmente, neuroquímicamente y en habilidades perceptuales. Asimismo, referente a otras razas de ratas o ratones, existen evidencias de que la morfología de algunos núcleos cerebrales son diferentes entre especies. A continuación exponaremos estos niveles en los que se han encontrado diferencias entre las razas LE y WI.

Se ha registrado la ejecución conductual en la piscina de Morris de ratas macho WI y LE y se han encontrado diferencias entre ellos. Las ratas LE macho presentan mayor rapidez en el aprendizaje y menores latencias en la ejecución correcta que las ratas macho WI (Hort y cols., 2000). En otro experimento donde se les administraba a los machos LE y WI galanina previa a la ejecución conductual de Morris, se pudo comprobar que esta sustancia sólo afectó a las WI, al presentar mayores latencias en alcanzar la plataforma, respecto a ellas mismas sin administrárseles galanina y respecto a los machos LE tras la galanina. Los autores sugieren que esta eficacia diferente puede deberse a una concentración distinta de receptores o de subtipos de receptores de

galanina entre las razas (Gleason y cols., 1999). En la mayoría de los test aplicados a ratas WI y LE, éstas últimas han demostrado tener ventaja respecto a las WI en cuanto a la rapidez de aprendizaje (Andrews y cols., 1995).

Otro aspecto conductual donde ratas macho WI y LE difieren es en la conducta sexual. Existe una respuesta refleja en las ratas, llamada "erección sin contacto", que se presenta cuando los machos son expuestos a hembras en estro inaccesibles para ellos. Se pudo comprobar que los machos LE presentaban con mucha más frecuencia que los machos WI esta respuesta refleja cuando eran expuestos a hembras en estro separadas por un cristal transparente pero que permitía la comunicación de otras señales (olfatorias). Sin embargo, aunque los machos WI raramente presentaron esta respuesta, sí mostraron el mismo interés en la hembra en estro que los machos LE, contabilizado por el número de acercamientos a la pared separadora de la hembra que ambas razas de machos efectuaron (Sachs, 1996).

Estas diferencias conductuales podrían explicarse por diferencias a nivel neuroquímico entre las razas, como por ejemplo las que ya apuntaron los autores en el experimento donde se comprobaba que las ratas WI y LE respondían de manera diferente a la galanina cuando efectuaban el test de Morris (Gleason y cols., 1999). Pero esta no es la única sustancia a la que las razas responden de manera diferente. También con la metopina, un inhibidor de la histamina, dándose en los machos WI un incremento de la ingesta de agua y de la micción urinaria tras administrárseles, mientras que en los LE este incremento tras la misma administración no es significativo, sugiriendo por ello los autores un balance de fluidos diferente entre razas (Leckin y Tuomisto, 1995). Con la morfina y el efecto que ésta produce de aumento de tolerancia ante situaciones estresantes, también hay diferencias entre machos LE y WI. La morfina en la rata WI es dosis-dependiente en cuanto a la latencia en el test del pinchazo en el rabo, pero no es efectiva en este sentido con las ratas macho LE (Onaivi y cols., 1992; Woolfolk y Holtzman, 1995). Referente a la posible diferencia sexual que hubiese entre ratas machos y hembras de diferentes razas en cuanto a las latencias en un test nociceptivo térmico, se encontró que existían diferencias sexuales sólo en la raza LE, en la que las hembras eran más sensibles al dolor, no existiendo esta diferencia sexual en las ratas WI (Mogil, 1999; Mogil y cols., 2000; Sternberg y Mogil, 2001). De entre todos los trabajos dedicados a la diferencia entre razas, éstos últimos son de los pocos que analizan las

posibles diferencias entre sexos a la vez que las diferencias entre razas, ya que la mayoría de los trabajos se concentran sólo en la diferencia de razas entre machos.

Por otro lado el efecto que el antidepresivo tricíclico imipramina tiene sobre el sistema noradrenérgico, administrado de manera crónica, también difiere entre machos WI y LE (Vetulani y cols., 1991). También existen evidencias de que los machos LE responden de manera más homogénea a la pilocarpina, un potente agonista colinérgico muscarínico, aunque la mortalidad en los LE es mayor que en la WI, al sobrevivir las WI mejor al estatus epiléptico que les pueda ocasionar la pilocarpina (Hort y cols., 2000). En el período adulto, las ratas LE son 1000 veces más sensibles a la toxicidad aguda de una dioxina (TDCC) que las Wistar (Pohjanvirta y cols., 1988) y la administración embrionaria de esta dioxina (TDCC) tiene un efecto diferencial sobre Wistars y Long Evans, provocando en las primeras un incremento en la síntesis de testosterona y de LH, mientras que a las segundas no les afecta (Haavisto y cols., 2001). Y por último, se ha demostrado que administrando prenatalmente a ratas Wistar y Long Evans vinclozolina, un antiandrógeno, los efectos que éste provocaba a dosis equiparables eran muy parecidos en cada raza, poniendo de manifiesto una sensibilidad similar al antiandrógeno y unas consecuencias similares en estado adulto de éste entre razas (Hellwig y cols., 2000).

La peor ejecución de los machos WI en los test de Morris podrían explicarse porque los machos LE son más activos ante situaciones adversas, ya que existen evidencias de que éstos responden de manera más rápida y reactiva que los machos WI cuando en la piscina de Morris hay agua fría o aceite, pudiendo este dato ser indicio de que los WI no reaccionan ante situaciones potencialmente peligrosas tan eficazmente a como lo hacen los LE (Abel, 1992; Abel, 1993).

En otro aspecto en el que difirieron las razas Wistar y la Long Evans es en la capacidad de respuesta a los bloqueadores del óxido nítrico (NOS). Se demostró que administrando inhibidores del NOS a machos LE y WI, los WI presentan un bloqueo completo mientras que para los machos LE las mismas dosis de inhibidor resultó en un bloqueo muy débil, poniendo en evidencia un posible efecto diferencial del NOS entre razas (Hölscher, 2002).

Pero las diferencias conductuales encontradas entre razas también podrían explicarse haciendo referencia a las diferentes habilidades perceptuales o sensitivas que pudieran existir entre las razas LE y WI. Por ejemplo, el sentido de la percepción visual es diferente entre estas dos razas, ya que la condición de albina de las Wistar no sólo se relaciona con un déficit en la pigmentación, sino también con un sistema visual deficitario (Hort y cols., 2000). Aunque en algunos test de respuesta ante estímulos visuales las WI y las LE han demostrado tener la misma eficacia en cuanto a rapidez e impulsividad de la respuesta (Didriksen y Christensen, 1993), existen diferencias entre las WI y las LE en amplitud de latencia de respuesta ante un estímulo visual, a favor de las LE (Dyer y Swartzwelder, 1978). Además las retinas y fotorreceptores de las WI, de machos y de hembras, parecen ser más sensibles a la estimulación lumínica constante, sufriendo con ello más daño en la retina y mayor pérdida de fotorreceptores que los machos y hembras LE, al poseer éstos últimos mayor protección a la estimulación fototóxica por tener pigmentos de melanina en el iris (Wasowicz y cols., 2002). Esta protección diferencial ante la luz constante podría estar incidiendo en una mayor o menor calidad visual, pudiendo expresarse esta diferencia conductualmente, por ejemplo, no percibiendo las ratas WI con nitidez las claves visuales indicativas de la localización de la plataforma en el test de Morris y por ello, siendo peores en éste test.

Otros sentidos en los que estas razas difieren son el oído y el gusto. Se encontraron diferencias entre cuarenta y seis razas de ratas diferentes en cuando a la amplitud media y a la habituación ante estímulos auditivos, poniendo de manifiesto una diferente capacidad acústica entre las razas de ratas (Glowa y Hansen, 1994). Respecto al gusto, existen trabajos en los que se demuestran que las ratas macho WI realizan un consumo *ad libitum* mayor de etanol que el que realizan los machos LE en las mismas condiciones (Gauvin y cols., 1993). En otro trabajo, los machos de las razas WI y LE demostraron tener diferentes preferencias ante los sabores, eligiendo las LE el sabor de la mezcla de la sacarina y etanol con mucha más frecuencia que las WI, sin modificarse esta preferencia tras administrarles el antagonista de los opiáceos naltrexona (Goodwin y cols., 2001). Por otro lado, los valores de los reforzadores instrumentales entre estas razas son distintos, debido a posibles diferencias sensitivas en el sentido del gusto entre razas. Se encontró que proporcionando a las ratas machos LE y WI en diferentes sesiones agua destilada (valor neutro), agua azucarada (valor positivo) o agua con cloro (valor negativo), las ratas LE demandaban con la misma intensidad el agua azucarada

que la que llevaba cloro y la destilada casi no la bebía, mientras que las ratas WI presentaron la misma ingesta de agua azucarada que de la destilada, no bebiendo casi del agua clorada (Sorensen y cols., 2001).

Para explicar estas preferencias diferentes por los sabores, los autores aluden a la existencia de sensibilidades perceptuales distintas entre razas, en relación a los sentido del gusto y del olfato (Sorensen y cols., 2001). Si esta diferencia en el sistema olfativo existiese, cabría esperar que el SVN de estos animales fuese diferente y con él los núcleos de relevo del SVN, presentando patrones de diferenciación o de desarrollo distintos. En ratones, el área preóptica medial (APM), región que pertenece a las proyecciones terciarias del SVN, es diferente entre razas. Los ratones de raza DBA/2J (D2) machos y hembras poseen la parte compacta del APM (APMpc), la parte caudal del APM y el núcleo supraquiasmático dorsal, mientras que en la raza C57BL/6J (B6), ni machos ni hembras poseen ninguna de estas regiones (Mathieson y cols., 2000). En otras razas también existen diferencias en regiones cerebrales pertenecientes o relacionadas con el SVN. La subdivisión NESTpm es mayor en volumen en los machos de cobayas (Hines y cols., 1992; Hines y cols., 1985), de ratas Sprague-Dawley (Chung y cols., 2000) y de ratas Wistar (Del Abril y cols., 1987). Sin embargo en otras subdivisiones del NEST, como la NESTm, la NESTl y la NESTv no fueron diferentes entre los sexos en la raza Sprague-Dawley respecto al volumen, ni siquiera tras realizarles manipulaciones hormonales pre o postnatal (Stefanova y cols., 1998; Stefanova y Ovtscharoff, 2000).

Por otro lado, la región del *Locus Coeruleus*, es sexualmente dimorfa ya que la hembra posee mayor volumen y número de neuronas que el macho en ratas de raza Wistar (Guillamón y cols., 1988a; De Blas y cols., 1990; Luque y cols., 1992), pero la subdivisión dorsal de este núcleo en ratas de raza Sprague-Dawley presenta un volumen mayor en los machos que en las hembras (Babstock y cols., 1997).

No existen muchos más ejemplos referidos a la diferente configuración cerebral de las ratas de diferente raza, por ello quisimos plantear este experimento, en el que se analiza una región cerebral perteneciente al SVN (proyecciones secundarias), el NEST, que en ratas de raza Wistar posee ambos patrones de diferenciación sexual, el de macho mayor que hembra (NESTpm) (Guillamón y cols., 1988b) y el de hembra mayor que

macho (NESTma y NESTla) (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b), para comprobar si en las ratas de raza Long Evans se mantenían estos mismos patrones de diferenciación sexual o, si bien, eran diferentes.

6.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1.1. Sujetos.

Los sujetos empleados para llevar a cabo este experimento fueron pedidos *ad hoc* a la casa proveedora, tanto los animales de raza Wistar (Charles River, Criffa; Saint-Aubin-Lès- Elbeuf, France) como los animales de raza Long Evans (Janvier, España, Madrid). Se solicitaron con una edad de 80 días, para que, tras unos días de adaptación al lugar nuevo, a los 90 días fuesen sacrificados mediante perfusión transcardíaca. Durante estos días de adaptación, permanecieron en el estabulario del laboratorio del Departamento de Psicobiología de la UNED, en jaulas con un máximo de 4 individuos del mismo sexo, disponiendo de agua y comida *ad libitum*. Las condiciones de temperatura y humedad permanecieron constantes ($22 \pm 1^\circ \text{C}$ y una humedad del 60 %), al igual que el ciclo luz-oscuridad (luz de 8:00 a.m - 20:00 pm) que se controló mediante un reloj automático.

Los grupos de los animales experimentales en este caso fueron los siguientes:

- Grupo de machos Long-Evans (**MLE**): se pidieron a la casa proveedora (Janvier, España, Madrid). N = 7.
- Grupo de hembras Long-Evans (**HLE**): se pidieron a la casa proveedora (Janvier, España, Madrid). N = 7.
- Grupo de machos Wistar (**MWI**): se pidieron a la casa proveedora (Charles River, Criffa; Saint-Aubin-Lès- Elbeuf, France). N = 7.
- Grupo de hembras Wistar (**HWI**): se pidieron a la casa proveedora (Charles River, Criffa; Saint-Aubin-Lès- Elbeuf, France). N = 7.

6.1.2. Técnicas histológicas

Para el proceso de perfusión, de fijación, de corte y de tinción del tejido encefálico empleado en este experimento se procedió de idéntica manera a la llevada a cabo para el experimento 1, descrito en el epígrafe 4.1.3.

6.1.3. Estereología.

Puesto que en estos animales también se analizó el volumen y el número de neuronas del NEST, subdivisiones NESTma, NESTla y NESTpm, las técnicas estereológicas y la metodología empleada, ambas descritas para el experimento 1 en el epígrafe 4.1.4., son igualmente aplicables para este caso, ya que se procedió de idéntica manera.

6.1.4. Técnicas de análisis de datos.

Los datos obtenidos de la morfología del NEST se sometieron a los análisis estadísticos pertinentes. Las variables dependientes fueron número de neuronas y volumen de las subdivisiones NESTma, NESTla y NESTpm. Las variables independientes fueron dos: sexo, con dos niveles (macho y hembra) y raza, con dos niveles (LE y WI). Tras comprobar la homogeneidad de la varianza, se sometió a los datos a un análisis de varianza (ANOVA) bilateral multivariado y para comprobar las diferencias entre los grupos, se procedió a aplicar el test *post hoc* de Bonferroni.

6.2. RESULTADOS.

El análisis de varianza multifactorial revela la existencia de un efecto principal del sexo respecto al número de neuronas del NESTpm ($F_{1, 24} = 39,326$; $p < 0, 0001$) y respecto al volumen del NESTpm ($F_{1, 24} = 27,915$; $p < 0,0001$). Igualmente hay efecto

principal de la raza en cuanto al número de neuronas de las subdivisiones NESTma ($F_{1, 24} = 26,373$; $p < 0,0001$), NESTla ($F_{1, 24} = 17,936$; $p < 0,0001$) y NESTpm ($F_{1, 24} = 13,767$; $p < 0,001$). Hay interacción entre las variables sexo y raza en el número de neuronas de las subdivisiones NESTma ($F_{1, 24} = 39,326$; $p < 0,0001$) y NESTla ($F_{1, 24} = 39,326$; $p < 0,0001$).

Empezando por el volumen en las comparaciones entre grupos, diremos que existen diferencias significativas para el NESTpm de machos y hembras Wistar y Long Evans (MW vs HW; $p < 0,011$; MLE vs HLE; $p < 0,003$). Los machos Wistar, además, difieren significativamente con las hembras Long Evans (MW vs HLE; $p < 0,001$). Para el resto de subdivisiones del NEST no hay diferencias entre sexos en el volumen. Con estas diferencias se replica la existencia de dimorfismo sexual para el volumen del NESTpm en las razas Wistar, que ya se conocía con anterioridad (Guillamón y cols., 1988b) y se pone de manifiesto la existencia del mismo dimorfismo sexual en el volumen del NESTpm en la raza Long Evans (figura 6.1.).

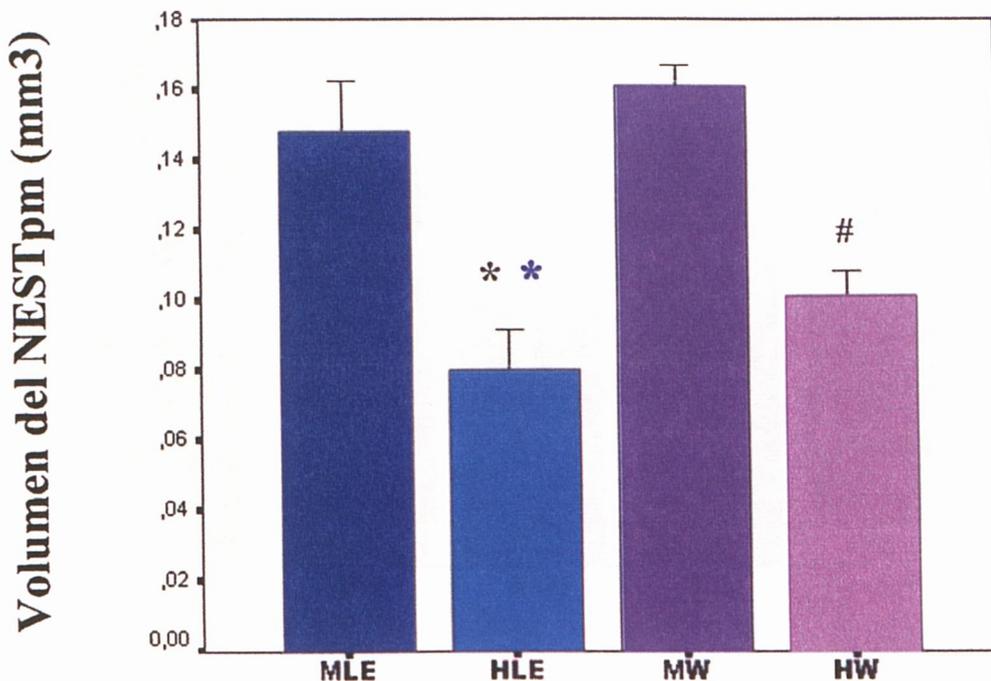


Figura 6.1. Representación gráfica del volumen del NESTpm en los grupos (MLE: macho Long Evans; HLE: hembra Long Evans; MW: macho Wistar; HW: hembra Wistar). Hay dimorfismo sexual en las dos razas, superando en ambos casos los machos a las hembras y además, las HLE difieren de los MW.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo MLE.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo MW.

#: $p < 0,01$ respecto al grupo MW.

Analizando el número de neuronas de las diferentes subdivisiones, podemos comprobar que en el NESTma, existe dimorfismo sexual en la raza Wistar, teniendo las hembras mayor número de neuronas que el macho (HWI vs MWI; $p < 0,010$) y a su vez, las hembras WI, al presentar el mayor número de neuronas de todos los grupos, también difieren significativamente de los machos y hembras LE (HWI vs MLE; $p < 0,0001$; HWI vs HLE; $p < 0,0001$) (figura 6.2.). En este caso no se ha producido el dimorfismo sexual en la raza LE (MLE vs HLE; $p = 1$; n. s.), pero sí en la Wistar, en la dirección de hembra mayor que macho en cuanto al número de neuronas. En esta raza se conocía el dimorfismo sexual del NESTma mayor en hembras referidos al volumen y al número de neuronas del NESTma (Del Abril y cols., 1987).

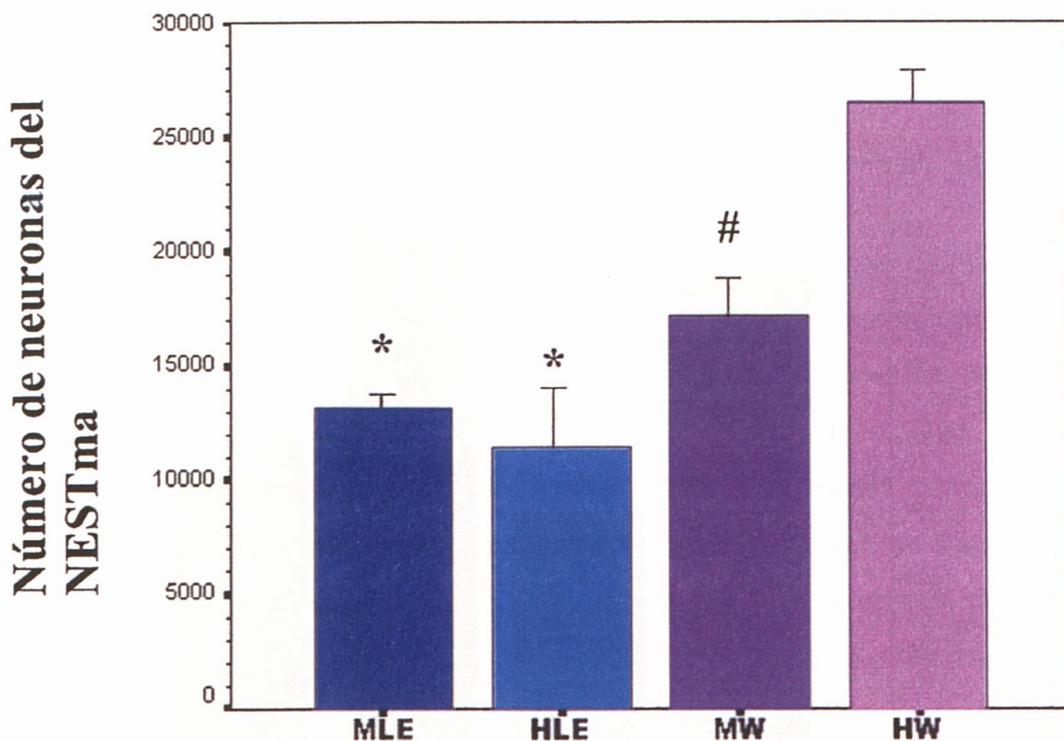


Figura 6.2. Representación gráfica del número de neuronas del NESTma en los grupos (MLE: macho Long Evans; HLE: hembra Long Evans; MW: macho Wistar; HW: hembra Wistar). Hay dimorfismo sexual en la raza Wistar, siendo las hembras superiores, pero no en la Long Evans. Los dos grupos Long Evans machos y hembras difieren de las HW.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo HW.

#: $p < 0,01$ respecto al grupo HW.

En el caso del número de neuronas de la subdivisión NESTIa, sucede exactamente lo mismo que para el NESTma. Las HWI difieren significativamente de su homólogo macho (HWI vs MWI; $p < 0,014$), al presentar éstas el mayor número de neuronas y, a su vez, las hembras WI difieren del resto de los grupos de raza Long Evans (HWI vs HLE; $p < 0,0001$; HWI vs MLE; $p < 0,003$) (figura 6.3.). De nuevo en la raza Long Evans no hay dimorfismo sexual, pero sí en la Wistar, replicando los datos que ya se conocían en esta raza, en esta subdivisión y en esta dirección (hembra > macho) (Guillamón y cols., 1988b).

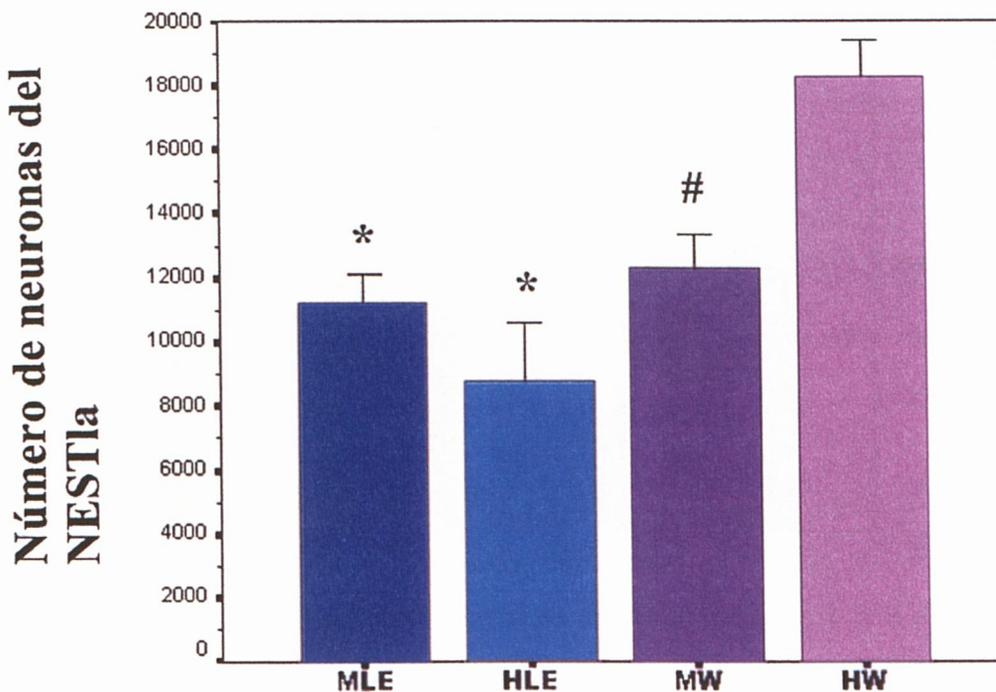


Figura 6.3. Representación gráfica del número de neuronas del NESTIa en los diferentes grupos (MLE: macho Long Evans; HLE: hembra Long Evans; MW: macho Wistar; HW: hembra Wistar). Como en la gráfica anterior, en los Wistar se conserva el dimorfismo sexual, siendo las hembras superiores y los dos grupos de Long Evans machos y hembras difieren de las HW.

*: $p < 0,001$ respecto al grupo HW.

#: $p < 0,01$ respecto al grupo HW.

Por último, el número de neuronas que presenta el NESTpm es sexodimorfo en ambas razas, siendo los machos superiores (MLE vs HLE; $p < 0,010$; MWI vs HW; $p < 0,0001$). Además, el grupo MWI, al poseer el valor numérico más elevado, también difiere significativamente de los otros dos grupos de animales Long Evans (MWI vs MLE; $p < 0,011$; MWI vs HLE; $p < 0,0001$) (figura 6.4.). En este caso se replicó el dimorfismo sexual ya conocido en la raza WI (Guillamón y cols., 1988b) y se comprobó que en la raza Long Evans también existe el mismo dimorfismo sexual en la misma dirección en el número de neuronas del NESTpm.

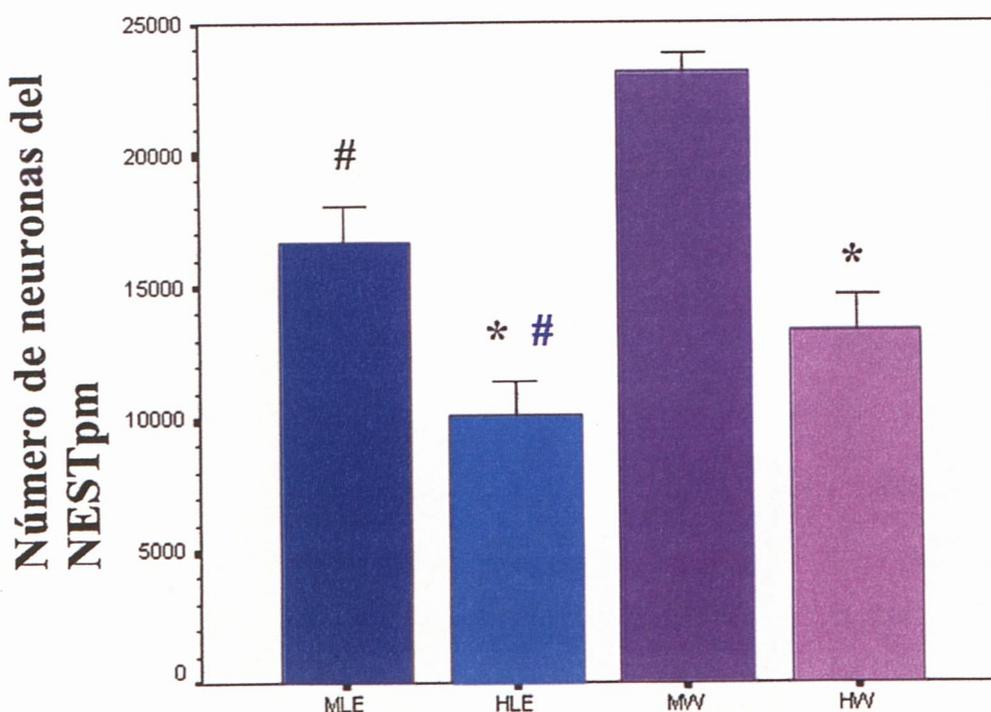


Figura 6.4. Representación gráfica del número de neuronas del NESTpm en los grupos (MLE: macho Long Evans; HLE: hembra Long Evans; MW: macho Wistar; HW: hembra Wistar). Ambas razas conservan el dimorfismo sexual, siendo en ambos casos los valores del macho superior a las hembras y además, los machos y hembras Long Evans difieren significativamente de los MW.

#: $p < 0,01$ respecto al grupo MW.
#: $p < 0,01$ respecto al grupo MLE.
*: $p < 0,001$ respecto al grupo MW.

6.3. DISCUSIÓN.

Los resultados comentados ponen en evidencia la existencia de dimorfismo sexual en ratas de raza Wistar en las subdivisiones NEST_{ma}, NEST_{la}, ambos en la dirección de hembra mayor que macho y en la subdivisión NEST_{pm}, en la dirección de macho mayor que hembra. Estas diferencias son las que se habían encontrado previamente en los estudios anteriores (Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Guillamón y cols., 1988b), con la salvedad de que en nuestro caso, no encontramos diferencias sexuales en cuanto al volumen del NEST_{ma}. Esto pudo deberse a que, en primer lugar, la metodología usada en la estimación del volumen del NEST fueron distintas, empleándose en este caso técnicas estereológicas. Sin embargo, a pesar de haber usado técnicas de medición distintas, los resultados son prácticamente idénticos, replicando, en este caso, casi en su totalidad lo que ya se obtuvo en los experimentos previos de morfología del NEST. Por otro lado, en la consideración del volumen están influyendo otras variables, aparte del número de neuronas que haya en esa estructura, como por ejemplo, la distribución de las células en el núcleo en cuestión que pueden estar más o menos compactadas. Por ello, en la estimación del volumen del NEST_{ma}, pudo haber estado influyendo alguna variable ajena al número de neuronas que, medido a través de las técnicas estereológicas, diesen como resultado una anulación de la diferencia entre sexos.

Por su parte en las ratas Long Evans se dio dimorfismo sexual sólo en una de las subdivisiones analizadas, la NEST_{pm}. En esta, tanto el número de neuronas como el volumen de la estructura son mayores en los machos (figuras 6.1. y 6.4). Sin embargo, las subdivisiones NEST_{ma} y NEST_{la}, que en la raza Wistar son sexualmente dimorfas (Del Abril y cols., 1987; Guillamón y cols., 1988b) en ratas de raza Long Evans son sexualmente isomorfas (figuras 6.2. y 6.3.). Por lo tanto, comprobamos que el proceso de diferenciación sexual no es idéntico para todas las razas y que la conservación de la diferencia entre géneros en cuanto a la morfología de las estructuras cerebrales podría estar dependiendo de la región en cuestión. Prueba de esto es que todos los animales, independientemente de su raza, analizados morfológicamente en esta Tesis Doctoral, han presentado dimorfismo sexual en cuanto al volumen y al número de neuronas del

NESTpm. Los machos de la misma raza (MMR) del experimento 1, que como se comentó con anterioridad, son el resultado de cruces de diferentes razas, han mostrado igualmente un superior volumen y número de neuronas en el NESTpm respecto a las hembras de la misma raza (HMR) (figura 4.15. y 4.16.). Esto estaría indicando lo que ya se sugirió en el experimento 1, que la relevancia funcional del NESTpm y de su dimorfismo es tan importante, que se conserva entre distintas especies. Puesto que esta región ha sido relacionada con la conducta copulatoria del macho (Claro, Tesis Doctoral, 1992; Claro y cols., 1995), sería razonable pensar que el establecimiento del patrón sexodimorfo de esta región fuese menos flexible y estuviese en menor medida influido por variables cambiantes (raza o mezcla de éstas), ya que de ésta dependería la consecución óptima de la conducta sexual masculina, de la que dependería, asimismo, el éxito evolutivo de la especie. Por lo tanto, la relevancia en el establecimiento del dimorfismo sexual dependería de la repercusión que determinadas regiones cerebrales pudieran tener para la supervivencia de la especie, dependiendo del ambiente hormonal y/o de la carga genética del individuo. Esta dependencia podría estar supeditada a la flexibilidad a la que pudiera atenerse cada una de las regiones para la diferenciación sexual en una dirección u otra, según la importancia que tenga esta diferenciación sexual. La subdivisión NESTpm es muy importante para que la conducta sexual masculina se lleve a cabo y por ello, su diferenciación sexual podría depender más directamente de la carga genética del individuo, aunque el ambiente hormonal y los esteroides gonadales también puedan estar incidiendo en la diferenciación de esta región.

Por otro lado, y referente a la importancia que ha demostrado tener el dimorfismo sexual de la subdivisión NESTpm a través de las razas, podríamos establecer la predicción de que las regiones cerebrales que envían y reciben proyecciones al NESTpm, como el BOA y el APM (De Olmos y cols., 1985), la Me (Swanson y Petrovich, 1998; Dong y cols., 2001), el AVPV y el área preóptica (Hutton y cols., 1998) podrían estar conservando igualmente el dimorfismo sexual a través de las razas, siendo para estas regiones el componente genético muy relevante, como ha demostrado serlo para el NESTpm. Para confirmar o refutar esta predicción, es necesario más investigación.

El hecho de no haber encontrado los mismos patrones de diferenciación sexual del NEST en los MMR y las HMR que los que habían sido encontrados en ratas de raza

Wistar nos resultó sorprendente. Pero este hecho, nos hizo plantearnos la posibilidad de que la mezcla de razas pudiera ser una variable relevante en cuanto al establecimiento de los patrones sexodimorfos y los resultados obtenidos en el experimento 3, confirmaron nuestra hipótesis. La pertenencia a una raza u otra, debido al polimorfismo genético que esto conlleva, supone la posibilidad de que la diferenciación del cerebro sea distinta. Este hecho es de enorme relevancia, ya que apunta la posibilidad de que la selección sexual que ocurre en la naturaleza de manera habitual, podría estar determinando que la elección de una rata hembra por un macho de su propia raza o de otra raza para que la fecunde, pueda estar determinando la morfología cerebral de las crías que de esta cópula resulten. Esta morfología cerebral, posteriormente podría traducirse en conductas diferentes. De hecho, tal y como se expuso con anterioridad, existen diferencias conductuales y de otras clases en cuanto a las razas Long Evans y Wistar, que podrían estar debidos a los diferentes patrones morfológicos cerebrales de las regiones responsables de estas conductas.

Los diferentes patrones de diferenciación sexual del NEST_{ma} y NEST_{la} en ratas Wistar y Long Evans podrían interpretarse, de varias maneras. En primer lugar, podría ser que el proceso de desarrollo y diferenciación cerebral para estas regiones fuese diferente entre las razas, por motivo de la información puntual genética distinta que pudiera existir. Sustentando esta explicación estarían todos los datos referentes a los efectos diferenciales que diversos fármacos y sustancias han ejercido en ratas WI y LE. Esta capacidad diferente de respuesta podría estar reflejando una actuación distinta de las sustancias endógenas de cada organismo, que dirigen el proceso de formación y diferenciación del SVN entre razas. Sin embargo, lo determinante en el proceso de diferenciación sexual del sistema nervioso, tal y como comentamos en el Capítulo 1, son los esteroides gonadales en períodos críticos del desarrollo del organismo. A este respecto, el único trabajo, que conozcamos, que analiza las diferencias en la manipulación de hormonas androgénicas prenatal y postnatalmente en ratas LE y WI con vinclozolina concluye que, en ambas razas, el efecto y las consecuencias de la administración de este antiandrógeno son similares (Hellwig y cols., 2000). Podríamos suponer, entonces, que los esteroides gonadales durante el proceso de diferenciación actúan de manera equivalente entre las razas, pero respecto a este supuesto, es necesaria más investigación.

Otra manera de interpretar estas diferencias entre razas en cuanto a la morfología del NEST_{ma} y NEST_{la}, vendría dada por las habilidades sensoriales distintas en cada especie. Existen evidencias en la literatura de que las ratas de raza Wistar perciben peor visualmente a como lo hacen las ratas de raza Long Evans (Dyer y Swartzwelder, 1978; Hort y cols., 2000; Wasowicz y cols., 2002), aunque pueden distinguir los sabores y su valencia positiva y negativa de manera más precisa (Sorensen y cols., 2001). Las ratas Wistar, además, no reaccionan de manera tan eficaz ante situaciones potencialmente peligrosas a como lo hacen las ratas Long Evans (Abel, 1992; Abel, 1993). Estos datos estarían indicando que la capacidad sensorial de las razas es diferente, de manera que una de ellas pudiera tener más desarrollado un sistema perceptual que la otra. En las ratas Wistar, dado que ven peor y que esto les hace llevar a cabo defectuosamente algunos test conductuales, como la piscina de Morris (Andrews y cols., 1995; Gleason y cols., 1999; Hort y cols., 2000), podría suponerse que tuviesen más desarrollada la habilidad perceptual del olfato. El hecho de que en las subdivisiones NEST_{ma} y NEST_{la} los animales machos y hembras de razas Long Evans y de la raza mezcla de King-Holtzman con Long Evans y Wistar (experimento 1, figuras 4.12 y 4.14.), no difieran significativamente entre ellos, está revelando que el dimorfismo sexual no se mantiene en estos casos posiblemente debido a que su conservación no resulta tan relevante a como lo sería el dimorfismo del NEST_{pm}. Además, el hecho de que tras mezclar las razas King-Holtzman con Long Evans y Wistar, en los animales de la misma raza machos y hembras del experimento 1, el patrón sexodimorfo que prevalezca sea el de las ratas de raza Long Evans, que no es sexodimorfo, y no el de las Wistar, que sí es sexodimorfo, vuelve a indicar la fragilidad en la conservación del dimorfismo en estas regiones a través de las razas y de la mezcla de éstas.

Estas diferencias morfológicas cerebrales entre razas podrían tener reflejo conductual. En el experimento 2 de conducta maternal, sugerimos que el superior número de neuronas en el NEST_{la} de las hembras *Tfm* podría estar repercutiendo en que llevasen a cabo con mayor efectividad la conducta maternal, comparadas con las hembras de la misma raza (HMR) (experimento 2 de esta Tesis Doctoral). El hecho de que machos y hembras de la raza Long Evans tengan significativamente menos neuronas en el NEST_{la} que los animales de raza Wistar (figura 6.3.) podría estar repercutiendo en que estos animales se comportasen de manera distinta en la conducta maternal. De hecho, existen evidencias en la literatura que ponen de manifiesto que los machos de

raza Long Evans son manifiestamente agresivos hacia las crías propias y ajenas y practican con notable frecuencia el infanticidio con ellas (Miley y cols., 1982; Brown, 1986). A este respecto existe una investigación en la que se pone de manifiesto la relevancia del canibalismo filial en peces, ya que se demuestra que los peces machos canibalizan sólo las crías que no son suyas, pudiendo detectar de alguna manera, el parentesco genético de éstas (DeWoody y cols., 2001). Por lo tanto, podría ser que el componente genético diferente de las ratas Long Evans o la diferente configuración de su morfología cerebral que pudiera afectar a su sensibilidad olfativa, desencadenasen con mayor probabilidad estas conductas agresivas de infanticidio hacia las crías. A este respecto sería muy interesante una mayor investigación.

Esta diferente morfología cerebral entre razas, podría, por lo tanto, estar expresando diferentes habilidades olfativas entre razas, puesto que la región analizada en este experimento y que ha resultado ser diferente entre razas es el NEST, que pertenece parte al SVN (la región NESTpm) y parte al SOP (la región NESTla) (De Olmos y cols., 1985; Del Abril y cols., 1987; Del Abril, Tesis Doctoral, 1988; Segovia y cols., 1993). Podría ser, por lo tanto, y dado que los animales Wistar difieren significativamente de los Long Evans en el número de neuronas del NESTma (figura 6.2.) y del NESTla (figura 6.3.), que los animales Wistar percibiesen mejor olfativamente que los Long Evans. Pero una aparente contradicción a este supuesto la aportaría el trabajo de Sachs de 1996, en el que se pone de manifiesto que los machos Wistar no presentan respuestas reflejas de erección cuando se les expone a una hembra inaccesible en estro, pero a la que pueden oler, y sí lo hacen los machos Long Evans (Sachs, 1996). Sin embargo, para que esta respuesta de erección refleja se produzca, parece ser determinante el sentido de la vista, ya que esta respuesta se daba con mucha más probabilidad en los animales que eran separados de la hembra en estro con un cristal translúcido que con un cristal opaco. Por lo tanto, la ausencia en la expresión de esta respuesta en los machos Wistar podría estar reflejando sólo su conocido déficit visual, ya que los machos Wistar y los Long Evans mostraron la misma motivación por el acercamiento a la hembra en estro, cuantificado por las veces que se toparon con el cristal que los separaba de la hembra al querer atravesarlo (Sachs, 1996). Esto estaría indicando que, como mínimo, ambos animales percibían olfativamente a la hembra de la misma manera. Por otro lado, otra posible variable que pudo influir en la respuesta diferencial de los machos Long Evans y Wistar ante la hembra en estro pudo ser la propia raza de la hembra. Éstas fueron

hembras Long-Evans y Sprague-Dawley, no se empleándose hembras Wistar. Los machos Wistar pudieron no haber detectado tan eficazmente el estado en estro de la hembra Long-Evans o Sprague-Dawley, ya que se ha demostrado que existe especificidad olfativa entre especies, puesto que en hembras Wistar las neuronas del epitelio que responden ante orina de la propia especie se localizan en una región concreta (posición apical del epitelio) y las que respondían a orina de otras especies se localizaban en otro lugar distinto (posición basal del epitelio) (Inamura y cols., 1999), pudiendo, por ello los machos Wistar, no haber detectado con la misma intensidad el estado de las hembras en estro a como lo hicieron los machos Long Evans. Se requiere más investigación al respecto para poder concluir el motivo de estas aparentes diferencias conductuales entre razas.

Capítulo 7

Discusión General

El tránsito que un mamífero sigue desde que es concebido, hasta que adquiere sus pautas adultas de comportamiento, conlleva múltiples interacciones genéticas, celulares y hormonales, todas ellas tan abundantes y complejas que aún estamos muy lejos de poder comprenderlas en su totalidad. Estas interacciones se dan secuenciadas en el tiempo del desarrollo ontogenético del individuo, produciéndose, tal y como se detalló en el Capítulo 1, primero la determinación genética, luego la determinación gonadal, posteriormente la diferenciación sexual del sistema nervioso y por último la diferenciación conductual. Sin embargo, todas estas escalas en el desarrollo del individuo no son escalas aisladas, en la medida en que las anteriores influyen en las posteriores, estableciéndose una red de interacciones entre ellas que acompañarán y definirán al individuo en todo su proceso vital. A lo largo del Capítulo 1, hemos podido recoger numerosos ejemplos de estas interacciones de niveles en el desarrollo normal.

Referidas a las interacciones genéticas, hemos podido comprobar en esta Tesis cómo la información genética que los individuos posean puede estar repercutiendo en los niveles posteriores del desarrollo. Por un lado, en los experimentos 1 y 2 pudimos comprobar cómo la posesión de una mutación genética puntual en el receptor de andrógenos está influyendo en el desarrollo gonadal, en el peso corporal, en la

morfología cerebral y en los patrones conductuales maternos que estos animales expresan. Por otro lado, en el experimento 3, comprobamos cómo la pertenencia a una raza u otra y las diferencias genéticas que esto conlleve, están incidiendo en la morfología cerebral de los animales.

En la determinación gonadal, pudimos comprobar cómo la posesión de la mutación en el gen del receptor de andrógenos en los animales *Tfm* estaba repercutiendo claramente en el desarrollo de los genitales que los machos *Tfm* poseían, ya que los testículos que éstos presentaban eran rudimentarios y carecían del resto de componentes del aparato urogenital, como la próstata, el epidídimo y la vesícula seminal. Este hecho pone de manifiesto lo relevante que es la actuación correcta de los andrógenos sobre sus receptores para que el desarrollo gonadal masculino se lleve a cabo de manera normal (figuras 4.8. y 4.9.).

Existen otros ejemplos en la literatura en los que se pone de manifiesto lo frágil que puede llegar a ser el desarrollo gonadal normal. El déficit de la enzima 5 α reductasa en humanos supone que, debido a una mutación de carácter autosómica recesiva en el gen responsable de la codificación de la enzima Aromatasa tipo 2, las personas que lo padecen no desarrollan completamente su aparato urogenital hasta que llegan a la pubertad (Wilson y cols., 1993; Wilson, 1999). El motivo de este déficit es que no existe suficiente DHT que lleve a cabo la masculinización de los genitales externos, aunque los receptores de andrógenos sean perfectamente funcionales (Lecqoc, 1986; Wilson y cols., 1993; Poletti y cols., 1998a; Wilson, 1999; Levine y cols., 2001). Otro ejemplo sería el resultado de la mutación en el gen responsable de la codificación de la enzima Aromatasa. En este caso, las niñas que lo padecen sufren una masculinización de sus genitales, parecida a la que se da en la hiperplasia adrenal congénita, ya que poseen en plasma unos niveles anormalmente elevados de testosterona, androstenediona y 17-hidroxiprogesterona, además de unos niveles bajos de estradiol (Morishima y cols., 1995; Bulun, 1996).

Por otro lado la mutación en el receptor de andrógenos también estaría repercutiendo en el peso corporal que los animales machos *Tfm* poseen, respecto a los otros dos grupos de machos. En las hembras portadoras o mosaicos, la mutación no afectó para el establecimiento de sus pesos corporales, al presentar el mismo peso que el

resto de las hembras (figura 4.7.). En este caso, la mutación en el receptor de andrógenos en los machos estaría incidiendo sobre el eje de retroalimentación hipotálamo-hipófisis anterior-hormona de crecimiento (GH) (Vandershueren y cols., 1992; Müller y cols., 1999; Pazos y cols., 2000).

Es importante destacar que los valores morfométricos cerebrales de estos animales han sido absolutamente independientes de los pesos corporales que presentaron. Las hembras *Tfm*, que no difirieron significativamente del resto de las hembras respecto a su peso corporal, han presentado un número de neuronas superior a las hembras control de la misma raza para el NEST en todas sus subdivisiones. Las hembras hermanas, que pesaron también lo mismo que el resto de las hembras, han diferido significativamente de las hembras control de la misma raza en el número de neuronas del NESTma y del NESTpm. Por su parte, en los machos *Tfm*, que difirieron significativamente en el peso corporal de los machos hermanos, en el NEST estos dos grupos de machos no difirieron significativamente en ninguna de sus subdivisiones. Quizás el caso más llamativo a este respecto es el que se produce en el número de neuronas del NESTpm, en el que los machos *Tfm* presentan valores perfectamente masculinizados, a pesar de tener un peso corporal y unas gónadas ambos cercanos a los femeninos. Estas discrepancias entre los diferentes niveles de desarrollo de los individuos pone de manifiesto que el proceso de diferenciación sexual del sistema nervioso es harto complejo, en el que las equiparaciones simplistas, por ejemplo entre el peso corporal y los parámetros morfológicos cerebrales, no tienen cabida.

En el nivel de desarrollo y formación del sistema nervioso central, pudimos comprobar que la presencia de la mutación en los animales estaba repercutiendo sobre los parámetros morfológicos de volumen y número de neuronas del Núcleo de la Estría Terminal a través de dos formas o niveles de actuación: uno, a través de las madres portadoras, que provocaba que los andrógenos con los que contasen los animales *Tfm* y hermanos estuviesen incrementados por motivo de la alteración endocrina que presentaron sus madres portadoras de la mutación y otro, a través de la propia posesión de la mutación en los individuos.

El primero de los niveles de repercusión de la mutación lo intuimos por la enorme similitud que presentaban en los parámetros morfológicos los animales *Tfm* y los hermanos, tanto machos como hembras y también por la similitud conductual que exhibieron las hembras *Tfm* y hermanas en la conducta maternal natural. Esta similitud tenía que deberse a alguna característica que compartiesen estos animales *Tfm* y hermanos y que excluyese al grupo control de la misma raza y esta característica supusimos que era el ambiente hormonal materno. Avalando esta suposición, estaban los trabajos de Morishima y Mahendroo (Morishima y cols., 1995; Mahendroo y cols., 1997), en los que se ponía de manifiesto que durante la gestación, podían producirse intercambios de niveles hormonales alterados por causa de mutaciones. Por lo tanto, pensamos que era factible suponer que en las hembras *Tfm*, ya que eran portadoras de la mutación en el receptor de andrógenos, esta afectación podía estar incidiendo en que los niveles de andrógenos en plasma fueran superiores a lo normal, bien por la dificultad de actuación de éstos, que supondría mayor cantidad de andrógeno libre en plasma, bien por un efecto de regulación al alza en la liberación de andrógenos. Esta última posibilidad de regulación en la liberación de andrógenos por su imposibilidad de actuación podría estar respaldada con lo que se ha demostrado que sucede en los cuadros clínicos de depresión mayor (Klimek y cols., 1997; Stahl, 1998; Bergado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000). Al ser superiores estos niveles de andrógenos en plasma de las madres *Tfm*, influiría sobre los niveles hormonales de las crías y les afectaría al desarrollo de todas aquellas estructuras sensibles a los esteroides gonadales, como, por ejemplo, las pertenecientes al sistema nervioso central que han demostrado variabilidad en su desarrollo ante manipulaciones hormonales.

Esta repercusión de la mutación a nivel de madre portadora se puso de manifiesto en el número de neuronas del NESTma (figura 4.12), tanto en machos como en hembras, en el número de neuronas del NESTla (figura 4.14), también en machos y en hembras y, por último, en el número de neuronas de las hembras en el NESTpm (figura 4.16). Respecto a la conducta maternal, esta similitud entre hembras hermanas y *Tfm* se puso de manifiesto en todos los parámetros conductuales en los que se detectaron diferencias significativas entre algún grupo: en la calidad de la construcción del nido (figura 5.2.), en el tiempo empleado para llevar a cabo el acarreo completo el primer y tercer día de registro (figuras 5.3. y 5.4.), en el porcentaje de animales por grupo que realizaron el acarreo completo cada día de registro (figura 5.5.), en el tiempo (figura 5.6.) y

frecuencia (figura 5.7.) con la que practicaron el acicalamiento hacia las crías, en el tiempo de contactos hacia las crías (figura 5.8.) y en la frecuencia de adquisición de la postura de amamantamiento (figura 5.9.). Esta similitud entre hermanas y *Tfm* podría deberse al incremento en los niveles de estradiol en estos grupos, por motivo del incremento en la testosterona circulante, potencialmente aromatizada, debido al ambiente hormonal de la madre mutada.

Estos datos están indicando una clara afectación del ambiente hormonal alterado de la madre con el receptor de andrógenos mutado sobre sus crías, a nivel morfológico cerebral y a nivel conductual. Esta posibilidad resulta absolutamente novedosa, en la medida en la que no había sido detectada en investigaciones previas ya que nadie antes había comparado los grupos experimentales *Tfm*, hermanos y control de la misma raza. En nuestro caso, la utilización de estos grupos nos ha permitido detectar este nuevo nivel de afectación de la mutación, que sin duda, supone nuevas preguntas que plantear respecto a otros posibles ámbitos de influencia de la mutación sobre el organismo y la vez, aporta nuevas claves al entendimiento del proceso de desarrollo y diferenciación sexual y conductual.

Por otro lado, y refiriéndonos ahora a la repercusión de la mutación a nivel individual, detectamos, tras comparar lo que sucedía en los otros grupos sin mutación, que la mutación estaba incidiendo directamente en los casos de los machos *Tfm* para el número de neuronas del NESTma (figura 4.12) y en las hembras *Tfm* para el número de neuronas del NESTla (figura 4.14). En la conducta maternal natural, la afectación a nivel individual de la mutación en las hembras *Tfm* se puso de manifiesto en los casos en los que sólo éstas diferían significativamente de las hembras control de la misma raza. Estos casos fueron en los parámetros conductuales del tiempo empleado en el acarreo completo de las crías en el tercer día de registro (figura 5.4.), el tiempo y la frecuencia de acicalamiento (figura 5.6. y 5.7.) y la frecuencia en la adquisición de la postura de amamantamiento (figura 5.9.). En estos casos la insensibilidad total o parcial en los receptores de andrógenos estaría repercutiendo en estas variables, por lo tanto, podríamos sugerir que los andrógenos y su actuación sobre sus receptores resulta ser muy importante para estas variables morfológicas cerebrales y conductuales.

Pero esta importancia no va siempre en la misma dirección, ya que en la subdivisión del NEST_{ma}, la insensibilidad total de los receptores de andrógenos en los machos *Tfm* provoca una disminución del número de neuronas en ellos, mientras que la insensibilidad parcial en las hembras conlleva a un aumento del número de neuronas del NEST_{la}, así como a una mejora en la ejecución de los parámetros conductuales maternos comentados previamente. Esta discrepancia podría deberse, en primer lugar, al diferente grado de insensibilidad a los andrógenos en machos y hembras y en segundo lugar, aunque no excluyendo al primero, a un efecto diferencial del andrógeno sobre los sexos, debido a una programación genética diferente en cuanto a la capacidad de respuesta al andrógenos o a la cascada de acontecimientos que éste derive. Podría ser que la programación genética preparada en cada caso para responder a los esteroides, posterior a la unión del ligando a su receptor, difiriese entre los sexos en algún ligero matiz, que fuese suficiente para generar cambios distintos en estructuras cerebrales comunes entre machos y hembras. Ya que la configuración genética del individuo ha demostrado tener tanta repercusión en los diferentes niveles de desarrollo del individuo, no es desatinado suponer que los genes estén también determinando en alguna medida, la capacidad de respuesta de las células a los esteroides. De alguna manera este podría ser un reflejo de la postura integrativa a la que hicimos referencia a tenor de la disyuntiva entre determinantes genéticos y hormonales en la diferenciación sexual cerebral, y es que, como planteó el Profesor Alfred E. Mirsky, la expresión genética podría estar regulando diferencialmente el cerebro, influyendo en su desarrollo y muy probablemente siendo alterada por el ambiente hormonal durante el transcurso de la vida (McEwen y Finch, 1992).

Otro asunto llamativo es el referido a la masculinización del núcleo cerebral del NEST_{pm} en los machos *Tfm*. Éstos tienen, en esta subdivisión del NEST_{pm}, prácticamente el mismo número de neuronas que los que tenían los machos hermanos y los de la misma raza. Resulta sorprendente comprobar que en estos animales, que poseen unos genitales externos desarrollados de manera incompleta y parcialmente feminizados y un peso corporal cercano al que presentan las hembras, el núcleo cerebral del NEST_{pm}, que se ha demostrado que es muy relevante para la consecución óptima de la conducta sexual masculina (Claro, Tesis Doctoral, 1992; Claro y cols., 1995), tenga el mismo desarrollo en cuanto a número de neuronas que el que se da en los otros machos, con fenotipos masculinos. Esta aparente discrepancia entre los centros neuronales

responsables de la conducta sexual en los machos (NESTpm) y el desarrollo gonadal masculino podría estar indicando que la conservación del superior número de neuronas del NESTpm en los machos tuviese otra implicación funcional, además de la ejecución de la conducta sexual. El NEST en la raza Wistar ha resultado estar implicado en tareas de aprendizaje motor (Schulz y Canbeyli, 2000) y en conductas agresivas (Albert y cols., 1989b). Podría, por lo tanto, conservarse el superior número de neuronas a pesar de no poder llevar a cabo con normalidad la conducta sexual masculina, precisamente porque el NESTpm también esté mediando otras funciones que incidan en la conducta, como por ejemplo, y avalado por la conexión bidireccional que mantiene con la amígdala (Swanson y Petrovich, 1998; Dong y cols., 2001), la asignación de valencia positiva o negativa a las experiencias para conservarlas en la memoria posteriormente. Apoyando este supuesto, están los datos referidos a las lesiones específicas del NESTpm en ratas macho Wistar, con los que se puso de manifiesto que esta lesión afectaba a la conducta sexual masculina sólo y exclusivamente cuando no se había producido experiencia sexual previa alguna, pero no cuando sí se había producido (Claro, Tesis Doctoral, 1992; Claro y cols., 1995). Este supuesto, además, no contradice la relevancia que esta región ha demostrado tener a través de todas las especies analizadas en esta investigación, en las que se conserva el dimorfismo sexual del NESTpm.

Por su parte, en las hembras *Tfm* y hermanas, el NESTpm estaba masculinizado y diferían significativamente de las hembras control de la misma raza. Puede que esta masculinización en las hembras afectadas por el ambiente hormonal de la madre portadora de la mutación tuviera reflejo en la conducta sexual de estas hembras y llevasen a cabo con mayor probabilidad la conducta copulatoria masculina de monta que otras hembras o por otro lado, el número superior de neuronas en el NESTpm de estas hembras inhibiese la conducta sexual femenina de lordosis, según la teoría funcional de los diferentes patrones de diferenciación sexual (Segovia y Guillamón, 1993). Para comprobarlo, es necesario más investigación al respecto.

Podría ser, por lo tanto, que las personas con el síndrome de insensibilidad a los andrógenos por mutación en el lugar equivalente al que se da en estas ratas (Arg⁷⁵² → Gln; R752Q) (Brown, 1995; Langley y cols., 1998) tuviesen igualmente esta región cerebral, u otras, masculinizadas, comparadas con mujeres sin mutación. Esta posibilidad podría estar repercutiendo en algún aspecto conductual de estas personas. En

una revisión de 1968 se describe a las pacientes que padecen este síndrome como personas con inteligencia normal, activas, ambiciosas y con la libido aumentada (Valentine, 1968). Sin embargo, no existe ningún análisis, que conozcamos, conductual minucioso que pudiera poner de manifiesto la existencia de diferentes habilidades en las mujeres con el síndrome de insensibilidad, comparadas con hombres y mujeres sin mutación, debidas a la masculinización que hubiera podido provocarse en algunos núcleos de sus cerebros.

También resulta llamativo, a pesar de la supuesta masculinización normal que se produciría en las regiones cerebrales de estas pacientes, que estas mujeres tengan una identidad de género absolutamente definida, sintiéndose mujeres en sus fenotipos, anatomías, hormonas, derechos legales y entornos sociales (Ahlquist, 1994). Sin duda, la mutación en el gen del receptor de andrógenos supone un interesante marco de estudio, proporcionado por un azar de la naturaleza, para entender la vinculación entre el sexo genético, el sexo gonadal y el sexo conductual.

En relación con los supuestos mecanismo que estarían incidiendo en el desarrollo de las diferentes estructuras del NEST hemos sugerido diferentes mecanismos de actuación de los esteroides en machos y hembras. En el NEST_{ma}, para el establecimiento definitivo del número de neuronas de los machos, estaría incidiendo la testosterona y en las hembras, podría ser la testosterona o el estradiol aromatizado de ésta o ambas. En el número de neuronas del NEST_{la} en los machos, estaría afectando el estradiol aromatizado de la testosterona y en las hembras una conjunción entre el estradiol aromatizado y la inhibición en el desarrollo por parte de la DHT. Finalmente, para el número de neuronas del NEST_{pm}, en los machos estaría influyendo el estradiol aromatizado y en las hembras, una combinación de la testosterona y/o el estradiol aromatizado. Con estos supuestos se amplía el conocimiento referido al desarrollo y diferenciación del NEST, en sus diferentes subdivisiones, y a la vez, se pone de manifiesto la imposibilidad de achacar todo el fenómeno de diferenciación cerebral a un único mecanismo. Además de las explicaciones hormonales aportadas, podemos afirmar que la variable raza podría estar influyendo en la diferenciación del NEST en estos animales como pudimos comprobar en el experimento 3. La influencia exacta de la raza en estos animales no puede ser determinada, pero en la medida en que los grupos de la misma raza, machos y hembras, poseen la misma mezcla racial que los otros grupos,

éstos proporcionan un marco de referencia respecto a lo que hubiera sucedido en el NEST sin mutación y posibilita la extracción de los mecanismos de actuación hormonales que se han sugerido.

Pasando ahora a tratar la influencia de las razas sobre el dimorfismo sexual, diremos que esta investigación es la primera en la que se ha puesto de manifiesto el hecho de que los patrones de diferenciación sexual puedan ser diferentes entre las razas de ratas Long Evans y Wistar. Este hecho supone añadir una nueva variable a considerar en cuanto al estudio de la diferenciación sexual. Las ratas de raza Long Evans poseían como única subdivisión sexodimorfa de las analizadas el NESTpm, tanto en volumen como en número de neuronas. Esta subdivisión ha resultado ser mayor en los machos que en las hembras en todas las razas analizadas en esta investigación, dándose este dimorfismo además en otras razas y especies (Hines y cols., 1992; Hines y cols., 1985; Allen y Gorski 1990; Zhou y cols., 1995; Kruijver y cols., 2000; Chung y cols., 2000).

En este caso la información genética podría estar desempeñando una función importante a este respecto, dirigiendo la carga genética el dimorfismo de algunas de las regiones cerebrales que necesariamente han de ser sexodimorfas, como podría ser para el NESTpm. Tal es el caso de la región del *séptum* lateral y de la densidad de las fibras inmunorreactivas a la vasopresina que éste contiene, puesto que el patrón genético XY con o sin testículos resultó tener siempre la mayor cantidad de fibras inmunorreactivas (De Vries y cols., 2002; Markham y cols., 2003). Probablemente la relevancia de esta cantidad superior de vasopresina que haya en el *septum* lateral del macho sea muy importante y por ello, la posesión de gónadas masculinas o femeninas no incida o no incida demasiado en el designio genético que la combinación XY haya determinado para la cantidad de esta vasopresina del *septum* lateral de los machos XY. Probablemente haya otras estructuras cerebrales en las que la diferenciación sexual sea más independiente del ambiente hormonal que en otras. Para determinarlas habrá que llevar a cabo una investigación más amplia al respecto.

Por otro lado, nos resultó llamativo el hecho de que en las subdivisiones del NEST en ratas Wistar que eran sexualmente dimorfas, el sexo que despuntaba difería tanto de su grupo homólogo del sexo opuesto, como de los machos y hembras de la raza

Long Evans. Estas diferencias significativas podrían deberse a las distintas habilidades sensoriales que existen o podrían existir en los animales Wistar y Long Evans. Las ratas Wistar, dado que ven peor que las Long Evans, podría ser que percibiesen olfativamente mejor, y que esta percepción se tradujese en el mayor número de neuronas que presentan en el NEST, que es una región cerebral implicada en la olfacción. Esta diferencia podría estar repercutiendo en las conductas que estuviesen asociadas a estas regiones. Para comprobar esta suposición, así como para corroborar la diferencia perceptual olfativa entre razas Wistar y Long Evans, es necesario más investigación.

Por otro lado, con los experimentos 1 y 3, se pone de manifiesto el hecho de que la pertenencia a una raza u otra, así como la mezcla entre razas, está determinando la morfología cerebral. Ya que los animales de la misma raza (MMR y HMR) del experimento 1 no han replicado los patrones sexodimorfos encontrados en la raza Wistar, podría suponerse que en otras regiones cerebrales pertenecientes al SVN en las que se ha dado dimorfismo sexual en la raza Wistar no se dieran en animales Long Evans o de otra raza combinada con Long Evans. Esto supone que las variaciones en la configuración genética de los individuos por combinaciones de razas estarían repercutiendo en que la morfología cerebral fuese de una manera u otra, pudiendo influir de esta manera en la disposición de circuitos cerebrales que se han demostrado que están implicados en conductas reproductoras, como el caso del SVN. Por esto, con toda probabilidad, si los patrones de diferenciación en los circuitos cerebrales implicados en conductas reproductoras no son idénticos entre razas, se darían asimismo diferencias en conductas relacionadas con la reproducción. Además, dado que la reproducción en la naturaleza se produce atendiendo al rigor de la selección sexual, podría simularse, en pequeña medida, los efectos de esta selección sexual mediante la selección doméstica, determinando en qué medida la mezcla de razas pudiera estar incidiendo en la morfología cerebral y con ello en la conducta. Igualmente, podrían encontrarse regiones cerebrales que por su relevancia funcional, conserven el dimorfismo, como ha sucedido en el NESTpm y de esta manera, podrían establecerse regiones cerebrales en las que no hubiese tanta flexibilidad en la diferenciación porque la carga genética fuese determinante para el establecimiento del patrón de diferenciación definitivo. Para todos estos propósitos, es necesaria más investigación.

Capítulo 8

Conclusiones

1. Los machos que poseen una mutación en el receptor de andrógenos (*MTfm*), presentan un desarrollo gonadal incompleto, al tener unos testículos significativamente más pequeños que los que poseen los machos sin mutación y carecer de próstata, epidídimo y vesícula seminal.
2. El peso corporal de estos machos *Tfm* a la edad de 90 días alcanza un valor intermedio entre los machos y hembras sin mutación. Sin embargo, en las hembras portadoras de la mutación o mosaicos (*Tfm*), esta afectación parcial en sus receptores de andrógenos no repercute en su crecimiento corporal, al no diferir significativamente en su peso corporal a los 90 días de edad con otras hembras que no portan la mutación mencionada.
3. Los animales de raza King-Holtzman, cruzados con Long Evans y con Wistar, presentan dimorfismo sexual sólo en la subdivisión NESTpm, siendo superiores los valores que los machos presentaban en los parámetros morfológicos de volumen y número de neuronas que las hembras. Con este resultado se demuestra por primera vez, que en esta raza se da dimorfismo sexual en la subdivisión NESTpm.

4. Las subdivisiones NESTma y NESTla han resultado ser sexualmente isomorfas en los animales de raza King-Holtzman, cruzados con Long Evans y Wistar.
5. La mutación en la madre *Tfm* gestante está afectando los niveles hormonales de sus crías, influyéndoles en el desarrollo de las estructuras cerebrales sensibles a los esteroides gonadales. Esta incidencia se pondría de manifiesto por la similitud que existe en los parámetros morfológicos registrados entre los grupos de animales portadores de la mutación y los animales no portadores de la mutación pero compañeros de camada, concretamente para los machos en el número de neuronas del NESTma y del NESTla y para las hembras en el número de neuronas del NESTma, NESTla y NESTpm.
6. La mutación en el receptor de andrógenos individualmente estaría incidiendo en la morfología definitiva del NEST, en los machos *Tfm* para el número de neuronas del NESTma y en las hembras portadoras de la mutación o mosaicos para el número de neuronas del NESTla. En ambos casos, y comparativamente con los otros grupos, la insensibilidad en el receptor de andrógenos provoca una reducción del número de neuronas (machos en el NESTma) o un incremento en el número de éstas (hembras en el NESTla).
7. Los mecanismos que se proponen para el desarrollo y diferenciación de las subdivisiones del NEST son distintos para regiones y para sexos. En la subdivisión NESTma de los machos, los andrógenos serían los responsables de su desarrollo, mientras que para las hembras, lo relevante podrían ser los andrógenos, el estradiol o ambos. En la subdivisión del NESTla de los machos, el mecanismo que subyace para el establecimiento del número de neuronas definitivos podría ser el estradiol aromatizado de la testosterona y sin embargo en las hembras, además del estradiol, podría estar dándose un efecto inhibitorio del desarrollo por parte de los andrógenos. Y finalmente en la subdivisión del NESTpm, en los machos lo relevante sería el estradiol mientras que en las hembras podrían ser o los andrógenos o el estradiol o ambos.
8. Respecto a la conducta maternal, las hembras portadoras de la mutación (*HTfm*) no difirieron significativamente del grupo de hembras hermanas (HH) en ningún

- parámetro conductual, dejando constancia de nuevo de la posible afectación común de ambos grupos de hembras por haber compartido un ambiente hormonal alterado, expresado esta vez a nivel conductual.
9. En la conducta maternal existieron diferencias significativas entre las hembras *Tfm* (*HTfm*) y las hembras control de la misma raza (HMR) en cuanto a la calidad del nido, el tiempo empleado para realizar el acarreo completo en el tercer día de registro, el porcentaje de animales que realizaron el acarreo completo en el primer y tercer día de registro, el tiempo medio y la frecuencia de acicalamiento a las crías, el tiempo de contacto a las crías y la frecuencia con la que adoptó la postura de amamantamiento.
 10. Por su parte, las hembras hermanas de camada (HH) difirieron significativamente de las hembras control de la misma raza (HMR) en el tiempo empleado para el acarreo completo el primer día de registro, en el porcentaje de animales que realizaron el acarreo completo el primer y tercer día de registro y en el tiempo de contacto dedicados a las crías, dejando entrever que la posesión de la mutación en el receptor de andrógenos a nivel individual podría ser importante para el despliegue del cuidado maternal, ya que las hembras *Tfm* difieren significativamente en más parámetros conductuales maternas de las hembras control de la misma raza que las hembras hermanas sin mutación.
 11. El NESTma y NESTla de ratas Wistar son sexualmente dimorfos, teniendo las hembras mayor número de neuronas en el NESTma y el NESTla que los machos y el NESTpm de ratas Wistar también es sexodimorfo, superando esta vez los machos a las hembras en el número de neuronas y el volumen.
 12. En la raza de ratas Long Evans la subdivisión NESTpm es sexodimorfa, siendo mayor en los machos, mientras que las subdivisiones NESTma y NESTla son sexualmente isomorfas. Estas regiones no habían sido analizadas previamente en esta raza de ratas.

Capítulo 9

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abdelgadir, S. L., Resko, J. R., Ojeda, S. R., Lephart, E. D., McPhaul, M. J. and Roselli, C. E. (1994): Androgens regulate aromatase cytochrome P450 Messenger Ribonucleic Acid in rat brain. *Endocrinology*. Vol. 135, No 1, pp. 395-401.
- Abel, E. L. (1992): Response to alarm substance in different rat strains. *Physiology and Behavior*. Vol. 51, February, No 2, pp. 345-347.
- Abel, E. L. (1993): Strain differences in convulsions induced by alarm substance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* Vol. 45, No 3, pp. 561-563.
- Achermann, J. C., Meeks, J. J. and Jameson, J. L. (2001): Phenotypic spectrum of Mutation in *DAX-1* and *SF-1*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 185, pp. 17-25.
- Ahlquist, J. A. O. (1994): Gender identity in testicular feminization. Phenotypically, anatomically, legally and socially female. *BMJ*. Vol. 308, April 16, pp. 1041-1042.
- Ahmed, S. F. and Hughes, C. I. A. (1999): Assesment of the gonadotrophin-gonadal axis in androgen insensitivity syndrome. *Arch. Dis. Child*. Vol. 80, pp. 324-329.
- Al-Attar, L., Noël, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M. G., Burgoyne, P. S., Josso, N. and Rey, R. (1997): Hormonal and cellular regulation of sertoli cell Anti-Müllerian Hormone production in the postnatal mouse. *J. Clin. Invest*. Vol. 100, No 6, September, pp. 1335-1343.
- Albert, D. J., Dyson, E. M., Walsh, M. L. and Petrovic, D. M. (1988): Cohabitation with

- a female activates testosterone-dependent social aggression in male rats independently of changes in serum testosterone concentration. *Physiology and Behavior*. Vol. 44, January 1, No 6, pp. 735-740.
- Albert, D. J., Petrovic, D. M. and Walsh, M. L. (1989a): Competitive experience activates testosterone-dependent social aggression toward unfamiliar males. *Physiology and Behavior*. Vol. 45, April 1, No 4, pp. 723-727.
- Albert, D. J., Petrovic, D. M., Walsh, M. L. and Jonik, R. H. (1989b): Medial *accumbens* lesions attenuate testosterone-dependent aggression in male rats. *Physiol. Behav.* Vol. 46, pp. 625-631.
- Albert, D. J., Jonik, R. H., Walsh, M. L. and Petrovic, D. M. (1989c): Testosterone supports hormone-dependent aggression in female rats. *Physiology and Behavior*. Vol. 46, August 1, No 2, pp. 185-189.
- Albert, D. J., Jonik, R. H. and Walsh, M. L. (1991): Hormone-dependent aggression in male and female rats: experiential, hormonal and neural foundations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* Vol 16, November 1, No 2, pp. 177-192.
- Albert, D. J., Jonik, R. H. and Walsh, M. L. (1992): Interaction of estradiol, testosterone and progesterone in the modulation of hormone-dependent aggression in the female rat. *Physiology and Behavior*, Vol. 52, October 1, No 4, pp. 773-779.
- Alberts, J. R., and Gubernick, D. J. (1990): Functional organization of dyadic and triadic parent-offspring systems. In *Mammalian Parenting*, Krasnegor, N. A. and Bridges, R. S. (Eds.) Oxford University Press, Oxford, pp. 416-440.
- Allard, S., Adin, P., Gouédard, L., di Clemente, N., Josso, N., Orgebin-Crist, M. C., Picard, J. Y. and Xavier, F. (2000): Molecular mechanism of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of β -catenin. *Development*. Vol. 127, pp. 3349-3360.
- Allen, L. S., Hines, M., Shryne, J. E. and Gorski, R. A. (1989): Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *Journal of Neuroscience*. Vol. 9, pp. 497-506.
- Allen, L. S. and Gorski, R. A. (1990): Sex differences in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis of the human brain. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 302, pp. 697-706.
- Allen, L. S. and Gorski, R. A. (1991): Sexual dimorphism of the anterior commissure and massa intermedia of the human brain. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 312, No 1, October 1, pp. 97-104.
- Allen, L. S., Richey, M. F., Chai, Y. M. and Gorski, R. A. (1991): Sex differences in the corpus callosum of the living human being. *Journal of Neuroscience*, Vol. 11, pp. 933-942.
- Allen, L. S. and Gorski, R. A. (1992): Sexual orientation and the size of the Anterior

- Commissure in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89, August, pp. 7199-7202.
- Alonso, W. J. and Schuck-Paim, C. (2002): Sex-ratio conflicts, kin selection and the evolution of altruism. *PNAS*, Vol. 99, May 14, No 10, pp 6843-6847.
- Andres, M. E., Forray, M. I., Barria, C. G. and Gysling, K. (1993): Studies of cholecystokinin in the rat Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 45, June 9, No 11, pp. 2283-2288.
- Andrews, J. S., Jansen, J. H. M., Linders, S., Princen, A. and Broekkamp, C. L. E. (1995): Performance in four different rat strains in the autoshaping, two-object discrimination and swim maze test of learning and memory. *Physiology and Behavior*. Vol. 57, April, No 4, pp. 785-790.
- Arai, Y., Nishizuko, M., Murakami, S., Miyakama, M., Machida, M., Takeuchi, H. and Sumida, H. (1993): Morphological correlates of neuronal plasticity to gonadal steroid: Sexual differentiation of the Preoptic Area. In *The development of sex differences and similarities in behavior*, Hang, M., Whalen, R. E. Aron, C., Olsen, K. L. (Eds.). Amsterdam, 1993, Kluwer Academic. pp. 311-323.
- Arai, Y., Murakami, S. and Nishizuka, M. (1994): Androgen enhances neuronal degeneration in the developing Preoptic Area: apoptosis in the Anteroventral Perivenricular Nucleus (AVPvN-POA). *Hormones and Behavior*. Vol. 38, pp. 313-319.
- Aranda, A. and Pascual, A. (2001): Nuclear hormone receptor and gene expression. *Physiological Reviews*. Vol. 81, No 3, July, pp. 1269-1304.
- Arnold, A. P. and Breedlove, S. M. (1985): Organizational and activational effects of sex steroid hormones on vertebrate brain and behavior: a re-analysis. *Hormones and Behavior* Vol. 19, pp. 469-498.
- Arnold, A. P., and Gorski, A. R. (1984): Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* Vol. 7, pp. 413-442.
- Arnold, A. P. (1996): Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior. *Hormones and Behavior*. Vol. 30, No 4, December, 495-505.
- Aston-Jones, G., Delfs, J. M., Druhan, J. and Zhu, Y. (1999): The Bed Nucleus of the Stria Terminalis: a target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 877, pp. 486-498.
- Attardi, B., Geller, L. N. and Ohno, S. (1972): Androgen and estrogen receptors in brain cytosol from male, female and testicular feminized (tfm/y hermaphrodite) mice. *Steroids*. Vol. 27, February, No 2, pp. 167- 185.
- Auger, A. P., Tetel, M. J. and McCarthy, M. M. (2000): Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and

behavior. *PNAS*. Vol. 97, No 13, June 20, pp. 7551-7555.

Auger, A. P., Perrot-Sinal, T. and McCarthy, M. (2001): Excitatory versus inhibitory GABA as a divergence point in steroid-mediated sexual differentiation of the brain. *PNAS*. Vol. 98, No 14, July 3, pp. 8059-8064.

Ávila, D. M., Zoppi, S. and McPhaul, M. J. (2001): The Androgen Receptor (AR) in syndromes of androgen insensitivity and in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 76, pp. 135-142.

Axel, R. (1995): Biología Molecular de la Olfacción. *Investigación y Ciencia*, diciembre 1995, pp 50-55.

B

Babstock, D., Malsbury, C. W. and Harley, C. W. (1997): The dorsal *Locus Coeruleus* is larger in male than in female Sprague-Dawley rats. *Neuroscience Letters*. Vol. 224, pp. 157-160.

Bach, F., Flugge, G., Wuttke, W. (1992): GABAergic influences on the development of the Sexually Dimorphic Nucleus in male and female rat. *Brain Research*, Vol. 573, pp. 341-344.

Bading, H. (2000): Transcription-dependent neuronal plasticity. The nuclear calcium hypothesis. *Eur. J. Biochem*. Vol. 267, pp. 5280-5283.

Balducci, R., Ghirri, P., Brown, T. R., Bradford, S., Boldrini, A., Boscherini, B., Sciarra, F., and Toscano, V. (1996): A clinical look at androgen resistance. *Steroids*, Vol. 61, April, pp. 205-211.

Balthazart, J. and Ball, G. E. (1998): New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *TINS*. Vol. 21, No 6, pp. 243-249.

Baker, L. M. and Hutson, J. M. (1993): Serum levels of Mullerian Inhibiting Substance in boys throughout puberty and in the first two years of life. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 76, n° 1, pp. 245-247.

Bakker, J., Pool, C. W., Sonnemans, M., Van Leeuwen, F. W. and Slob, A. K. (1997): Quantitative estimation of Estrogen and Androgen Receptor-Immunoreactive cells in the forebrain of neonatally estrogen-deprived male rats. *Neuroscience*. Vol. 77, No 3, pp. 911-919.

Bale, T. L. and Dorsa, D. M. (1995): Sex differences in and effects of Estrogen on Oxytocin Receptor Messenger ribonucleic acid expression in the Ventromedial Hypothalamus. *Endocrinology*. Vol. 136, No 1, pp. 27-32.

Bardin, C. W., Bullock, L., Blackburn, W. R., Sherins, R. J. and Vanha-Perttula, T. (1971): Testosterone metabolism in the androgen-insensitivity rat: a model for

- testicular feminization. *Birth Defects Origin. Artic. Ser.* Vol. 7, No 6, May 1, pp. 185-192.
- Barrio, R., y Ezquieta, B. (2001): Mecanismo genéticos de la diferenciación sexual: sus alteraciones. En: *Gónadas. Actualizaciones en Endocrinología*. Diéguez, C. y Yturriaga, R. (Eds.) McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2001, pp. 199-228.
- Baston, J. M., Krieg, R. J., Martha, P. M. and Evans, W. S. (1989): Growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone by perfused pituitary cells from male, female and testicular feminized rats. *Endocrinology*. Vol. 124, January, pp. 444-448.
- Baulieu, E. F. (1998): Neurosteroid: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*. Vol. 23, No 8, pp. 963-987.
- Baum, M. J. (1979): Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol. 3, pp. 265-284.
- Baum, M. J. and Keverne, E. B. (2002): Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from males and estrous female mouse urine. *Hormones and Behavior*, Vol. 41, pp. 213-219.
- Beach, F. A. and Buehler, M. G. (1977): Male rats with inherited insensitivity to androgen show reduced sexual behavior. *Endocrinology*. Vol. 100, pp. 197-200.
- Beato, M. (1989): Gene Regulation by Steroid Hormones. *Cell*. Vol. 56, February 10, pp. 335-344.
- Beauchamp, G. K., Curran, M. and Yamazaki, K. (2000): MHC-mediated fetal odourtypes expressed by pregnant females influence male associative behaviour. *Animal Behaviour*. Vol. 60, pp. 289-295.
- Begega, A., Miranda, R., Rubio, S., Santín, L. J., Cuesta, M. and Arias, J. L. (1998): Aplicaciones de la Esterología en Psicobiología. *Revista Electrónica de Metodología Aplicada*. Vol 3, No 1, pp. 30-40.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J, and Holsboer, F. (1997): Neuroprotection against oxidative stress Estrogens: structure-activity relationship. *Molecular Pharmacology*. Vol. 51, pp. 535-541.
- Behl, C. (2002): Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 3, June, pp. 433-442.
- Bellringer, J. F., Pratt, H. P. M., and Keverne, E. B. (1980): Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. *J. Reprod. Fertil.* Vol. 59, pp. 223-228.
- Benes, F. M. and Lange, N. (2001a): Two- dimensional versus three dimensional cell counting: a practical perspective. *TRENDS in Neuroscience*. Vol. 24, No 1, pp. 11-17.

- Benes, F. M. and Lange, N. (2001b): Benes and Lange respond: reconciling theory and practice in cell counting. *TRENDS in Neuroscience*. Vol. 24, No 7, July, pp. 378-380.
- Bennett, D., Boyse, E. A., Lyon, M. F., Mathienson, B. J., Schied, M., Yanagisawa, K. (1975): Expression of H-Y (male) antigen in phenotypically female *Tfm/Y* mice. *Nature*, Vol. 257, pp. 236-238.
- Bergado-Rosado, J. A., Almaguer-Melian, W. (2000): Mecanismo celulares de la Neuroplasticidad. *Revista de Neurología*, Vol. 11, No 31, pp. 1074-1095.
- Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair, A. H. et al. (1990): Genetic Evidence Equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, Vol. 348, pp 448-450.
- Bevan, Ch. L., Brown, B. B., Davis, H. R., Evans, B. A. J., Hughes, I. A. and Patterson, M. N. (1996): Functional analysis of six Androgen Receptor mutations identified in patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Human Molecular Genetics*. Vol. 5, No 2, pp. 265-273.
- Bevan, Ch. L., Hughes, I. A. and Patterson, M. N. (1997): Wide variation in *Androgen Receptor* dysfunction in Complete Androgen Insensitivity Syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 61, No 1/2. pp. 19-26.
- Beyer, C., Feder, H. H. (1987): Sex steroids and afferent input: their role in brain differentiation. *Ann. Rev. Physiol.* Vol. 49, pp. 349-364.
- Beyer, C., González-Mariscal G. (1986): Elevation in Hypothalamic Cyclic AMP as a common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Ann. New York Acad. Sci. USA*. Vol. 270, pp. 270-281.
- Beyer, C., Green, S. J. and Hutchison, J. B. (1994): Androgens influence sexual differentiation of embryonic mouse Hypothalamic aromatase neurons *in vitro*. *Endocrinology*. Vol. 135, No 3, pp. 1220-1226.
- Bloch, G. J. and Gorski, R. A. (1988): Cytoarchitectonic analysis of the SDN-POA of the intact and gonadectomized rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 275, pp. 604-612.
- Boccia, M. L. and Pedersen, C. A. (2001): Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationship with adult maternal behavior and lactating levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. Vol. 26, pp. 657-672.
- Boehmer, A. L. M., Brüggewirth, H. B., Assendelft, C. V., Otten, B. J., Verleun-Mooijman, M. C. T., Niermeijer, M. F., Brunner, H. G., Rouwé, C. W., Waelkens, J. J., Oostdijk, W., Kleijer, W. J., Van der Kwast, T. H., de Vroede, M. and Drop, S. L. S. (2001): Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 86, No 9, pp. 4151-4160.

- Borski, R. J. (2000): Nongenomic Membrane Actions of Glucocorticoids in Vertebrates. *TEM*, Vol. 11, No. 10, pp. 427-436
- Boudon, C., Lumbroso, S., Lobaccaro, J. M., Szarras-Czapnik, M., Romer, T. E., Garandeau, P., Mpontoya, P and Sultan, Ch. (1995): Molecular study of the 5 α -reductase type 2 gene in three european families with 5 α -reductase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol., 80, No 7, pp. 2149-2153.
- Bouvattier, C., Carel, J-C-. Lecoindre, C., David, A., Sultan, C., Bertradn, A-M-. Morel, Y. and Chaussain, J-L- (2002): Postnatal changes of T, LH and FSH in 46, XY infants with mutation in the *AR* gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 87, No 1, pp. 29-32.
- Breedlove, S. M. and Arnold, A. P. (1981): Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: response to adult hormon manipulation, absence in androgen-insensitive rat. *Brain Research*. Vol. 225, November 30, No 2, pp. 297-307.
- Breedlove, S. M., Jacobson, C. D., Gorski, R. A. and Arnold, A. P. (1982): Maculinization of the female rat spinal cord following a single neonatal injection of testosterone propionate but not estradiol benzoate. *Brain Research*. Vol. 237, pp. 173-181.
- Breedlove, S. M. and Arnold, A. P. (1983a): Hormonal control of developing muscular system I. Complete desmasculization of the Spinal Nucleus of the Bulbocavernosus in male rats using the antiandrogen flutamide. *Journal of Neuroscience*. Vol. 3, No 2, pp. 417-423.
- Breedlove, S. M. and Arnold, A. P. (1983b): Hormonal control of developing muscular system II: Sensitive periods for the androgen induced masculinization of the rat Spinal Nucleus of the Bulbocavernosus. *Journal of Neuroscience*. Vol. 3, No 2, pp. 424-432.
- Breedlove, S. M. (1997): Sex on the brain. *Nature*. Vol. 389, No 23, October, p. 801.
- Breedlove, S. M. and Jordan, C. L. (2001): The increasingly plastic, hormones-reponsive adult brain. *PNAS*. Vol. 98, No 6, pp. 2956-2957.
- Brennan, P., Kaba, H. and Keverne, E. B. (1990): Olfactory recognition: a simple memory system. *Science*, November, No 30, vol. 250, pp. 1223-1226.
- Bridges, R. S., Numan, M., Ronsheim, P. M., Mann, P. E. and Lupini, C. E. (1990): Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, October, pp. 8003-8007.
- Brinkmann, A. O., Jensater, G., Ris- Stalpers, C., van der Korput, J. A. G. M., Brüggewrith, H. T., Boehmer, A. L. M., and Trapman, J. (1995): Androgen Receptor mutations. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 53, No 1-6, pp. 443-448.

- Brinkmann, A. O. (2001): Molecular basis of androgen insensibility. *Molecular and Cellular Endocrinology* Vol. 179, pp. 105-109.
- Brown, R. E. (1986): Social and hormonal factors influencing infanticide and its suppression in adult male Long-Evans rats (*Rattus Norvergicus*). *Journal of Comparative Psychology*. Vol. 100, No 2, pp. 155-161.
- Brown, T. R. (1995): Androgen Receptor dysfunction in human androgen insensitivity. *TEM*. Vol. 6, No 5, pp. 170-175.
- Brownstein, M. J. and Palkovits, M.(1998): Catecholamines, serotonin, acetyl-choline, and g-aminobutyric acid in the rat brain: Biochemical studies. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*. Bjoörklund, A.; Hökfelt, T., (Eds.), vol. 2, part I. Amsterdam, Elsevier; 1984, pp. 23-54.
- Bruce, H. M. (1969): An exteroceptive block of pregnancy in the mouse. *Nature*. Vol. 184, p. 105.
- Bulun, S. E. (1996): Aromatase deficiency in women and men: would you have predicted the phenotypes? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 81, No 3, pp. 867-871.
- Bullejos Martín, M. (1998): Estudio del Gen *SRY*: Aspectos Funcionales y Evolutivos. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias, Departamento de Genética. Universidad de Granada.
- Bush, Ch., Braak, H., Bohl, J., Ohm, T. g. (1995): The human nucleus *coeruleus* in aging-A stereological analysis of females and males. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21, 1565 (Abstract)
- Bush, C., Bohl, J. and Ohm, T. G. (1997): Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiology of Aging*. Vol. 18, No 4, pp. 401-406.

C

- Cai, L-Q., Zhu, Y-S., Katz, M. D., Herrera, C., Báez, J., DeFillo-Ricart, M., Shackleton, C. H. L. and Imperato-McGinley, J. (1996): 5 α -Reductase-2 gene mutations in the Dominican Republic. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 81, No 5, pp. 1730-1735.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M. and Meaney, M. J. (1998): Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, April, pp. 5335-5340.
- Callado, L. F. and Stamford, J. A. (2000): Spatiotemporal interaction of α_2 autoreceptor

- and Noradrenaline transporters in the rat *Locus Coeruleus*: implications for volume transmission. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 74, No 6, 2350-2358.
- Caminero, A. (1989): Efecto de los esteroides gonadales sobre las células mitrales del bulbo olfatorio accesorio de la rata. *Tesis Doctoral*. UNED, Madrid.
- Caminero, A., Segovia, S. and Guillamón, A. (1991): Sexual dimorphism in Accessory Olfactory Bulb mitral cells: a quantitative golgi study. *Neuroscience*, Vol. 45, No 3, pp. 663-670.
- Canning, A., C., and Lovell-Badge, R. (2002): *Sry* and sex determination: how lazy can it be? *TRENDS in Genetics*, Vol. 18, No 3, March, pp. 111-113.
- Cañete, R., Jiménez, L. (2001): Ontogenia y diferenciación gonadal. En *Actualizaciones en Endocrinología: Gónadas*. Diéguez, C. y Yturriaga, R. (Eds.) McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2001, pp. 1-19.
- Capel, B., Albrecht, K. H., Washburn, L. L., Eicher, E. M. (1999): Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on *Sry*. *Mechanism of Development* Vol. 84, pp. 127-131.
- Capel, B. (2000): The battle of sexes. *Mechanism of Development*. Vol. 92, pp. 82-193.
- Carboni, E., Silvagni, A., Rolando, M. T. P. and Di Chiara, G. (2000): Stimulation of *in vivo* Dopamine transmission in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis by reinforcing drugs. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 20, RC 102, pp. 1-5.
- Carlson, N. R. (1994): Fisiología de la Conducta. Morgado, I., Coll, M., Martí, M., Portell, I. y Segura, T. (Eds. edición española). Ariel Psicología, Barcelona, 1ª reimpresión, pp. 374-398.
- Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W. (1990): Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Reviews*. Vol. 11, No 2, pp. 201-220.
- Carreau, S. (2001): Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology* Vol. 178, pp. 65-72.
- Carruth, L. L., Reisert, I. and Arnold, A. P. (2002): Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. *Nature Neuroscience*. Vol. 5, No 10, October, pp. 933-934.
- Cassell, M. R., Freedman, L. J. and Shi, Ch. (1999): The intrinsic organization of the Central extended Amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 877, pp. 217-241.
- Casey, R. W. and Wilson, J. D. (1984): Antiestrogenic action of dihydrotestosterone in mouse breast. Competition with estradiol for binding to the estrogen receptor. *Journal of Clinical Investigation*. December 1, Vol. 74, No 6, pp. 2272-2278.
- Celotti, F., Melcangi, R. C. and Martini, L. (1992): The 5 α -reductase in the brain:

- molecular aspects and relation to brain function. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Vol. 13, No 2, pp. 163-215.
- Celotti, F., Negri-Cesi, P., Poletti, A., (1997): Steroid metabolism in the mammalian brain: 5 α -reduction and aromatization. *Brain Research Bulletin*. Vol. 44, No 4, pp. 365-375.
- Ciocca, D. R. and Roig, L. M. V. (1995): Estrogen Receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Reviews*. Vol. 16, No 1, pp. 35-62.
- Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G. and Rombauts, W. (2001): Selective DNA binding by the Androgen Receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 76, pp. 23-30.
- Clarkson, M. J., and Harley, V. R. (2002): Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol. 13, No 3, April, pp. 106-111.
- Claro Izaguirre, F. (1992): El Núcleo de la Estría Terminal: funciones en el control de la conducta sexual masculina en la rata. *Tesis Doctoral*. Facultad de Psicología. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid.
- Claro, F., Segovia, S., Guillamón, A. and Del Abril, A. (1995): Lesions in the Medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced males rats. *Brain Research Bulletin*. Vol. 36, No 1, pp. 1-10.
- Claro, F., Pérez-Izquierdo, M. A., Del Abril, A., Segovia, S., Guillamón, A. and Del Cerro, M. C. R. (1994): MBR: a computer program to record and analyze paternal behavior in rodents. *Physiology and Behavior*. Vol. 56, No 5 , pp. 1069-1073.
- Clemens, L. G., Glaude, B. A. and Coniglio, L. P. (1978): Prenatal endogenous androgenetic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. *Hormones and Behavior* Vol. 10, No 1, February, pp. 40-53.
- Coggeshall, R. E. (1992): A consideration of neural counting methods. *TINS*. Vol 15, No 1, pp. 9-13.
- Coggeshall, R. E. and Lekan, H. A. (1996): Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 364, pp. 364-366.
- Collado, P., Guillamón, A., Valencia, A., Segovia, S. (1990): Sexual dimorphism in the Bed Nucleus of the Accessory Olfactory Tract in the rat. *Developmental Brain Research*, Vol. 56, pp. 263-268.
- Collado, P., Segovia, S., Calés, J.M., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., Guillamón,

- A., Valencia, A. (1992): Female's DHT controls sex differences in the rat Bed Nucleus of the Accessory Olfactory Tract. *NeuroReport*, Vol. 3, pp 327-329.
- Collado, P., Valencia, A., Del Abril, A., Rodríguez-Zafra, M., Pérez-Laso, C., Segovia, S., Guillamón, A. (1993): Effects of estradiol on the development of sexual dimorphism in the Bed Nucleus of the Accessory Olfactory Tract in the rat. *Developmental Brain Research*, Vol. 75, pp. 285-287.
- Collado, P., Segovia, S., Guillamón, A. (1998a): Development of sex differences in the Bed Nucleus of the Accessory Olfactory Tract in the rat. *Developmental Brain Research*. Vol. 109, pp. 99-108.
- Collado, P. (1998b): Nuevas perspectivas del proceso de diferenciación sexual del sistema nervioso y de la conducta. Bases Neurobiológicas y Ecológicas de la Conducta. Ed. UAT, UAM, UV, UNAM, México.
- Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P. N. And Levell-Badge, R. (1996): A comparison of the properties of *Sox-3* with *Sry* and two related genes, *Sox-1* and *Sox-2*. *Development*, Vol. 122, pp. 509-520.
- Compton, M. M. (1992): A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Review*, Vol. 11., pp. 105-119.
- Conrad, L. C. A. and Pfaff, D. W. (1976a): Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus and hypothalamus in the rat. I. An autorradiographic study of the medial preoptic area. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 169, pp. 185-220.
- Conrad, L. C. A. and Pfaff, D. W. (1976b): Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus and hypothalamus in the rat. II. An autorradiographic study of the anterior hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 169, pp. 221-262.
- Cooke, B. M., Tabibnia, G. and Breddlove, S. M. (1999): A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, June, pp. 7538-7540.
- Couse, J. F. and Korach, K. S. (1999): Estrogen Receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews*. Vol. 20, No 3, pp. 358-417.
- Cowan, W. M., Raisman, G. and Powell, T. P. (1965): The connections of the amygdala. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, Vol. 28, pp. 137-151.
- Crews, D. (1993): The Organizational Concept and Vertebrates without Sex Chromosome. *Brain Behavior Evolution*, Vol. 42, pp 202-214.
- Crews, D., and Moore, M.C. (1986): Evolution of Mechanisms Controlling Mating

Behavior. *Science*, Vol. 231, pp 121-125.

Crocoll, A., Zhu, Ch. C. Cato, A. C. B., and Blum, M. (1998): Expression of androgen receptor mRNA during mouse embryogenesis. *Mechanism of Development*. Vol. 72, pp. 175-178.

Ch

Chan, J. R., Rodríguez-Waitkus, P. M., Ng, B. K., Liang, P. and Glaser, M. (2000): Progesterone synthesized by Schwann cells during myelin formation regulates neuronal gene expression. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 11, July, pp. 2283-2295.

Chapman, M. S., Askew, D. J., Kuscuoglu, U. and Miesfeld, R. L. (1996): Transcriptional control of steroid-regulated apoptosis in murine thymoma cells. *Molecular Endocrinology*. Vol. 10, pp. 967-978.

Chen, Ch-P., Chen, S-R., Wang, T-Y., Wang, W. and Hwu, Y-M. (1999): A frame shift mutation in the DNA-binding domain of the Androgen Receptor gene associated with complete androgen insensitivity, persistent müllerian structures and germ cell tumors in dysgenetic gonads. *Fertility and Sterility*. Vol. 72, No 1, July, pp. 170-173.

Chen, Ch-P., Chern, S-R., Chen, B-F., Wang, W. and Hwu, Y-M. (2000): Hamartoma in a puberal patient with complete androgen insensitivity syndrome and R831X mutation of the Androgen Receptor gene. *Fertility and Sterility*. Vol. 74, No 1, July, pp. 182-183.

Christensen, S. E., Breedlove, S. M. and Jordan, C. L. (1999): Sexual differentiation of a neuromuscular system. In *Sexual Differentiation of the Brain*. Matsumoto, A. (Ed). CRC Press LLC, 1999. Boca Raton, Florida. p. 149-173.

Chung, K. W., Chan, W. Y., Dressler, J. B., Allison, J. E. and Rennert, O. M. (1983): Androgen Receptor in the brain of neonatal normal male and androgen insensitivity rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. Vol. 111, No 2, March, pp. 717-722.

Chung, W. C. J., Swaab, D. F. and De Vries, G. J. (2000): Apoptosis during sexual differentiation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Journal of Neurobiology*. Vol. 43, pp. 234-243.

Chung, W. C. J., De Vries, G. J. and Swaab, D. F. (2002): Sexual differentiation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in humans extend into adulthood. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 22, February 1, No 3, pp. 1027-1033.

D

- Darwin, Ch. (1859): *El Origen de las Especies*. EDAF. Madrid, 1970, p. 176.
- Davis, E. C., Popper, P. and Gorski, R. A. (1996): The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area. *Brain Research*. Vol. 734, Sep. 23, No 1-2, pp. 10-18.
- De Blas, M. R., Segovia, S. and Guillamón, A. (1990): Effect of postpuberal gonadectomy on cell population of the *Locus Coeruleus* in the rat. *Med. Sci. Res.* Vol. 18, pp. 355-356.
- Denenberg, V. H. (1999): Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy?. *Developmental Psychobiology*. Vol. 34, pp. 1-3.
- De Olmos, J. S. and Ingram, W. R. (1972): The projection field of the Stria Terminalis in the rat brain. An experimental study. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 146, pp. 303-334.
- De Olmos, J. S., Alheid, G. F., and Beltramino, C. A. (1985): Amygdala. In *The Rat Nervous System. Forebrain and Midbrain*. Vol. I. Paxinos, G. (ed.). Academic Press, Sydney, 1985, pp. 223-334.
- De Santa Bárbara, P., Bonneaud, N., Boize, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Schere, G., Poulat, F. and Berta, P. (1998): Direct Interaction of Sry-Related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human Anti-Müllerian Hormone Gene. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 18, November, No 11, p. 6653-6665.
- De Vries, G. J. and Boyle, P. A. (1998): Double duty for sex differences in the brain. *Behavioural Brain Research*, Vol. 92, pp. 205-213.
- De Vries, G. L., Rissman, E. F., Simerly, R. B., Yang, L-Y., Scordalakes, E. M. Auger, C. J., Lovell-Badge, R., Burgoyne, P. S and Arnold, A. P. (2002): A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavior traits. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 22, No 20, October 15, pp. 9005-9014.
- Del Abril, A., Segovia, S., Guillamón, A. (1987): The Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the rat: regional sex differences controlled by gonadal steroid early after birth. *Developmental Brain Research*. Vol. 32, pp. 295-300.
- Del Abril, A. (1988): Efecto de los esteroides gonadales en el desarrollo y diferenciación del Núcleo de la Estría Terminal en la rata. *Tesis Doctoral*. Facultad de Psicología. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid.
- Del Abril, A., Segovia, S., y Guillamón, A. (1990): Sexual dimorphism in the Parastrial Nucleus of the rat Preoptic Area. *Developmental Brain Research*, Vol. 52, pp. 11-15.

- Del Abril, A., Ambosio, E., de Blas, M. R., Caminero, A., García, C., de Pablo, J. M. y Sandoval, E. (2001): Fundamentos Biológicos de la Conducta. Ed. Sanz y Torres, Madrid, pp. 1043-1091.
- Del Cerro, M.C., P. Izquierdo, M. A., Collado, P., Segovia, S., Guillamón, A. (1991): Bilateral lesions of the Bed Nucleus of the Accessory Olfactory Tract facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Physiol. Behav.* Vol. 50, No 1, pp. 67-71.
- Del Cerro, M. C. (1998): Role of of the Vomeronasal input in maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology*, Vol. 23, No. 8, pp. 905-926.
- DeWoody, J. A., Fletcher, D. E., Wilkins, S. D. and Avise, J. C. (2001): Genetic documentation of filial cannibalism in nature. *PNAS*. Vol. 98, No 9, pp. 590-592.
- Diamond, M. C. (1987): Sex differences in the rat forebrain. *Brain Research Reviews*. Vol. 12, pp. 235-240.
- Di Clemente, N., Goxe, B., Rémy, J. J., Cate, R. L., Josso, N., Vigier, B. and Salesse, R. (1994a): Effects of AMH upon Aromatase Activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine*, Vol. 2. pp 553-558.
- Di Clemente, N., Wilson, Ch., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J-Y., Vigier, B., Josso, N., and Cate, R. (1994b): Cloning, Expression, and Alternative Splicing of the Receptor for Anti-Müllerian Hormone. *Molecular Endocrinology*. Vol. 8, No 8, pp. 1006-1020.
- Di Croce, L., Okret, S., Kersten, S., Gustafsson, J. A., Parker, M., Wahli, W. and Beato, M. (1999): Steroid and nuclear receptors. Villefranche-sur-Mer, France, May 25-27, 1999. *The EMBO Journal*. Vol. 18, No 22, pp. 6201-6210.
- Didriksen, M. and Christensen, A. V. (1993): Differences in performance in three strains of rats in a 5-choice serial reaction time task. *Pharmacol. Toxicol.* Vol. 72, January, No 1, pp. 66-68
- Dodson, R. E., Shryne, J. E. and Gorski, R. A. (1988): Hormonal modification of the number of total and late arising neurons in the central part of the medial preoptic nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 275, pp. 623-629.
- Döhler, K. D. Hines, M., Coquelin, A., Davis, F., Shryne, J. E. and Gorski, R. A. (1982): Pre and postnatal influence of diethylstilbestrol on differentiation of sexually dimorphic nucleus in the Preoptic Area of the female rat brain. *Neuroendocrinol. Lett.*, Vol. 4, pp. 361-365.
- Döhler, K. D., Coquelin, A., Hines, M., Davis, F., Shryne, J. E., and Gorski, R. A. (1983): Hormonal influences on sexual differentiation of rat brain anatomy. In *Higher Vertebrates*. Balthazart, J., Prove, E., and Gilles, R. (Eds.) Berlin.. pp. 195-203.
- Döhler, K. D., Hancke, J. L., Srivastava, S. S., Hofmann, C., Shryne, J. E., and Gorski,

- R. A. (1984): Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. *Progress in Brain Research* Vol. 61, pp. 99-117.
- Döhler, K. D. Coquelin, A. Davis, F., Hines, M., ShryneSickmoller, P. M., Jarzab, B. and Gorski, R. A. (1986): Pre and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in male and female rats. *Neuroendocrinology*. Vol., 42, pp. 443-448.
- Dong, H. W., G.D. Petrovich, G. D. and Swanson, L. W. (2000): Organization of projections from the juxtacapsular nucleus of the BST: a PHAL study in the rat. *Brain Research*. Vol. 859, pp. 1-14.
- Dong, H. W., Petrovich, G. D. and Swanson, L. W. (2001): Topography of projections from amygdala to Bed Nuclei of the Stria Terminalis. *Brain Research Reviews*. Vol. 38, pp. 192-246.
- Dörner, G. (1976): *Hormones and Brain Differentiation*, Amsterdam, Elsevier, pp. 1-272.
- Dörner, G. and Staudt, J. (1968): Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat, following neonatal castration and androgen substitution. *Neuroendocrinology*. Vol. 3, January 1, No 3, pp. 136-140.
- Doty, R. L., Applebaum, S., Zusho, H. and Settle, G. (1985): Sex differences in odor identification ability a cross-cultural analysis. *Neuropsychologia*. Vol. 23, No 5, pp. 667-672.
- Døving, K. B. and Trotier, D. (1998): Review: structure and fuction of the vomeronasal organ. *The Journal of Experimental Biology*, Vol. 201, pp. 2913-2925.
- Dubin, R. A. and Ostrer, H. (1994): Sry is a transcriptional activator. *Molecular Endocrinology*. Vol. 8, No 9, pp. 1182-1192.
- Duenas, M., Torres-Alleman, I., Naftolis, F., García Segura, L. M. (1996): Interaction of Insuline-like growth factor I and estradiol signaling pathways on Hypothalami neuronal differentiation. *Neuroscience*. Vol. 74, September, No 2, pp. 531-539.
- Dutertre, M., Rey, R., Porteu, A., Josso, N., Picard, J-Y. (1997): A mouse Sertoli cell line expressing anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 136, pp. 57-65.
- Dyer, R. S. and Swartzwelder, H. S. (1978): Sex and strain differences in the visual evoked potentials of albino and hooded rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* Vol. 9, No 3, pp. 301-306.

E

- Eichwald, E. J., and Silmsler, C. R. (1955): Untitled communication: *Transplantation Bulletin*, Vol. 2, pp. 148-149.
- Eisen, H. N. (1983): Inmunología. En *Tratado de Microbiología*. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, W. B. and McCarty, M. (Eds.). Salvat Editores, 2ª Edición, 1983, pp. 365-647.
- Emery, D. E. and Sachs, B. D. (1976): Copulatory behavior in male rats with lesions in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Physiology and Behavior*. Vol. 17, pp. 803-806.
- Erb, S. and Stewart, J. (1999): A role for the Bed Nucleus of the Stria Terminalis, but not the Amygdala, in the effects of Corticotropin-Releasing factor on stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 19, RC 35, pp. 1-6.

F

- Falkenstein, E., Tillmann, H- C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. (2000a): Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews*. Vol. 52, No 4, pp. 513-555.
- Falkenstein, E., Norman, A. and Wehling, M. (2000b): Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 85, No 5, pp. 2072-2075.
- Fannon, S. A., Vidaver, R. M. and Marts, Sh. A. (2002): Sex, cells and signals in developing brain. *TRENDS in Neuroscience*. Vol. 25, No 7, pp. 334-335.
- Fernández, R., Collado, P., García-Doval, S., García-Falgueras, A., Guillamón, A. and Pásaro, E. (2003): A molecular method for classifying the genotypes obtained in a breeding colony from testicular feminized (Tfm) rats. *Hormone and Metabolic Research*. Vol. 35, pp. 197-200.
- Ficher, C. R., Graves, K. H., Parlow, A. F. and Simpson, E. R. (1998): Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because targeted disruption of *cyp19* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, June, pp. 6965-6970.
- Fishman, R. B., Chism, L., Firestone, G. L. and Breedlove, S. M. (1990): Evidence for androgen receptors in sexually dimorphic perineal muscles of neonatal male rats: Absence of androgen accumulation by the perineal motoneurons. *J Neurobiol*. Vol. 21, pp. 694-705.
- Fishman, R. B. and Breedlove, S. M. (1992): Local perineal implants of antiandrogen block masculinization of the Spinal Nucleus of the Bulbocavernosus. *Developmental Brain Research*. Vol. 70, pp. 283-286.

- Fleming, A. Vaccarino, F. Tambosso, L. and Chee, P. H. (1979): Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in rat. *Science*. Vol. 203, pp. 372-374.
- Fleming, A., Vaccarino, F. and Luebke, C. (1980): Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiol. Behav.* Vol. 25, pp. 731-743.
- Fontanillo Merino, E., Benayas del Álamo, J., Bueno Álvarez, J. M., Martínez González, M. B. y Martín Sánchez, A. (1985): Diccionario de Biología. Ediciones Generales Anaya, Madrid.
- Ford, C. E., Jones, K. W., Polani, P. E., de Almeida, J. C. (1959): A sex-chromosome anomaly in case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet*, Vol. 1, pp. 711-713.
- Forger, N. G. and Breedlove, S. M. (1986): Sexual dimorphism in human and canine spinal cord: role of early androgen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 83, pp. 7527-7531
- Forray, M. I., Gysling, K., Andrés, M. E., Bustos G. and Araneda S. (2000): Medullary noradrenergic neurons projecting to the Bed Nucleus of the Stria Terminalis express mRNA for the NMDA-NR1 receptor. *Brain Research Bulletin*, Vol. 52, No. 3, pp. 163-169.
- Fraccaro, M., Kaijser, K., and Frank, F. (1960): A child with 49 chromosomes. *Lancet*. Vol. 2, pp. 899-902.
- Frankfurt, M. and McEwen, B. S. (1991): 5, 7-Dihydroxytryptamine and gonadal steroid manipulation alter spine density in ventromedial hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*, Vol. 54, No 6, pp. 653-657.
- Franklin, J. L. and Johnson, E. M. (1992): Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *TINS*, Vol. 15, No 12, pp. 501-507.
- Frederikse, M. E., Lu, A., Aylward, E., Barta, P. and Pearlson, G. (1999): Sex differences in the inferior parietal lobule. *Cerebral Cortex*, Vol. 9, December, No 8, pp. 896-901.
- Freedman, L. P. (1999): Multimeric coactivator complexes for steroid/nuclear receptors. *TEM*. Vol. 10, No 10, pp. 403-407.
- Freeman, L. M., Padgett, B. A., Prins, G. S. and Breedlove, S. M. (1995): Distribution of androgen receptor-immunoreactivity in the spinal cord of Wild-type, androgen-insensitive and gonadectomized male rats. *J. Neurobiol.* Vol. 27 (May), pp. 51-59.
- Freeman, L. M., Watson, N. V. and Breedlove, S. M. (1996): Androgen spares androgen-insensitive motoneurons from apoptosis in the Spinal Nucleus of the

Bulbocavernosus in Rats. *Hormones and Behavior*. Vol. 30, pp. 424-433.

Fuentealba, J. A., Forray, M. I. and Gysling, K. (2000): Chronic morphine treatment and withdrawal increase extracellular levels of Norepinephrine in the rat Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 75, pp. 741-748.

G

Gabant, P., Forrester, L., Nichols, J., Reeth, T. V., De Mees, C., Pajack, B., Watt, A., Smitz, J., Alexandre, H., Szpirer, C. and Szpirer, J. (2002): Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 99, October 1, No 20, pp. 12865-12870.

Gao, C. Q., Dhooge, W. S., Kaufman, J. M., Weyne, J. J. and Eechaute, W. P (2002): Hypothalamic 5 α -reductase and 3 α -oxidoreductase activity in the male rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 80, pp. 91-98.

García-Segura, L. M., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rofríguez, J. R., Hutchison, R. E. and Hutchison, J. B. (1998a): Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*. Vol. 89, No 2, pp. 567-578.

García Segura, L. M., Cardona-Gómez, Naftolin, F. and Chowen, J. A. (1998b): estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *NeuroReport*, Vol. 9, No 4, March 9, pp. 593-597.

García-Segura, L. M., Azcoitia, I. and DonCarlos, L. L. (2001): Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*. Vol. 63, pp. 29-60.

Gaspar, M-L., Meo, T., Bourgarel, P., Guenet, J-L. and Tosi, M. (1991): A single base deletion in the *Tfm* androgen receptor gene creates a short-lived messenger RNA that directs interanl translation initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 88, pp. 8606-8610.

Gatti, S., Jean-François Ferveur and Jean-René Martin (2000): Genetic identification of neurons controlling a sexually dimorphic behaviour. *Current Biology* Vol. 10, pp. 667-670.

Gauvin, D. V., Moore, K. R. and Holloway, F. A. (1993): Do rat strain differences in ethanol consumption reflect differences in ethanol sensitivity or the preparedness to learn? *Alcohol*. Vol. 10, No 1, pp. 37-43.

Gazzaley, A. H., Weiland, N. G., McEwen, B. S. and Morrison, J. H. (1996): Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 16, No 21, November 1, pp. 6830-6838.

Georget, V., Lobaccaro, J. M., Teouanne, B., Mangeat, P., Nicolas, J. C. and Sultan, C.

- (1997): Trafficking of the Androgen Receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 129, pp. 17-26.
- Gerardin, D. C. C. and Pereira, O. C. M. (2002): Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Vol. 71, pp. 309-313.
- Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (2001): The Oxitocin Receptor system: structure, function and regulation. *Physiological Reviews*. Vol. 81, No 2, April, pp. 629-683.
- Giorgi, D., Friedman, C., Trask, B. J. and Rouquier, S. (2000): Characterization of Nonfintional VIR-like Pheromone Receptor Sequences in Human. *Genome Research*. Vol. 10, pp. 1979-1985.
- Glazewski, S., Barth, A. L., Wallace, H., McKenna, M., Silva, A. and Fox, K. (1999): Impaired experience-dependent plasticity in barrel cortex of mice lacking the alpha and delta isoforms of CREB. *Cerebral Cortex*. Vol. 9, April, pp. 249-256.
- Gleason, T. C., Dreiling, J. L. and Crawley, J. N. (1999): Rat strain differences in response to galanin on the Morris water test. *Neuropeptides*. Vol. 33, No 4, pp. 265-270.
- Glowa, J. R. and Hansen, C. T. (1994): Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rat strain. *Behav. Genet.* Vol. 24, No 1, pp. 79-84.
- Goble, F. C. and Konopka, E. A. (1973): Sex as a factor in infectious diseases. *Trans NY Acad. Sci.* Vol. 35, pp. 325-346.
- Goldstein, L. A. and Sengelaub, D. R. (1990): Hormonal control of neuron number in sexually dimorphic spinal nuclei of the rat: IV. Masculinization of the Spinal Nucleus of the Bulbocavernosus with Testosterone metabolites. *Journal of Neurobiology*. Vol. 21, No 5, pp. 719-730.
- González-Mariscal, G. and Poindrom, P. (2002): Parental care in mammals: immediate internal and sensory factors of control. In *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrenbach, S. E. and Rubin, R. T. (Eds.). Vol. 1, Cap. 3, pp. 215-298.
- Goodwin, S. F. (1999): Molecular neurogenetics of sexual differentiation and behavior. *Current Opinion in Neurobiology*. No 9, pp. 759-765.
- Goodwin, F. L. W., Campisi, M., Babinska, I. and Amit, Z. (2001): Effects of naltrexone on the intake of ethanol and flavored solutions in rats. *Alcohol*, Vol. 25, pp. 9-19.
- Goos, L. M. and Silverman, I. (2001): The influence of genomic imprinting on brain development and behavior. *Evolution and Human Behavior*. Vol. 22, pp. 385-407.

- Gorski, R. A., Gordon, J., Shyne, J., Southam, A. (1978): Evidence for a morphological sex difference within the Medial Preoptic Area of the rat brain. *Brain Research*. Vol. 148, pp. 333-345.
- Gorski, R. A., Harlan, R., Jacobson, C., Shryne, J., Southam, A. (1980): Evidence for the existence of a Sexually Dimorphic Nucleus in the Preoptic Area of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 193, pp. 529-539.
- Gorski, R. A., Csernus, V. J. and Jacobson, C. D. (1981): Sexual dimorphism in the Preoptic Area. In *Advances in Physiological Science. Reproduction and Development*. Vol. 15. Flerko, B., Setalo, G. and Tima, L. (Eds.). Pergamon Press and Akadamiál Kiado. Budapest, pp. 121-130.
- Gorski, R. A. (1984): Critical role for the Medial Preoptic Area in the sexual differentiation of the brain. *Progress in Brain Research*. Vol. 61, pp. 129-147.
- Gottlieb, B., Lehvaslaiho, H., Beitel, L. K., Lumbroso, R., Pinsky, L., and Trifiro, M. (1998): The Androgen Receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Research*, Vol. 26, No. 1, pp. 234-238.
- Gottlieb, B., Pinsky, L., Beitel, L. K. and Trifiro, M. (1999): Androgen Insensitivity. *American Journal of Medical Genetics (Sem. Med. Genet.)*. Vol. 89, pp. 210-217.
- Gottlieb, B., Beitel, L. K. and Trifiro, M. A. (2001a): Variable expressivity and mutation databases: the Androgen Receptor gene mutation database. *Human Mutation*. Vol. 17, pp. 382-388.
- Gottlieb, B., Beitel, L. K., Trifiro, M. A. (2001b): Some mosaicism and variable expressivity. *Trends in Genetics*, Vol. 17, No 2 , pp 79-82.
- Graves, J. A. M. (1998a): Evolution of the Mammalian Y Chromosome and Sex-Determining Genes. *J. Exp. Zool.* Vol. 281, August 1, pp. 5472-5481.
- Graves, J. A. M. (1998b): Interactions Between SRY and SOX genes in Mammalian Sex Determination. *BioEssay*, Vol. 20, No 3, pp. 264-269.
- Graves, J. A. M. (2000): Human Y Chromosome Sex Determination, and Spermatogenesis - A Feminist View. *Biology of Reproduction*. Vol. 63, pp. 667-676.
- Green, R. (2002): Sexual identity and sexual orientation. In *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. and Rubin, R. T. (Eds.). Vol. 4, cap. 71, pp. 463-485.
- Grisham, W., Kerchner, M. and Ward, I. I. (1991): Prenatal stress alters sexually dimorphic nuclei in the spinal cord of male rats. *Brain Research*, Vol. 551, pp. 126-131.

- Grumbach, M. M. and Auchus, R. J. (1999): Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 84, No 12, pp. 4677-4694.
- Gumbreck, L. G., Stanley, A. J., Allison, J. E. and Peeples, E. E. (1984): Ectopic testes in the Norway rat. *J. Exp. Zool.* Vol. 230, No 1, April 1, pp. 151-154.
- Gu, G., Rojo, A. A., Zee, M. C., Yu, J. and Simerly, R. B. (1996): Hormonal regulation of CREB Phosphorylation in the Anteroventral Periventricular Nucleus. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 16, No 9, May 1, pp. 3035-3044.
- Gu, G. B. and Simerly, R. B. (1997): Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 384, pp. 142-164.
- Gu, G., Varoquaux, F. and Simerly, R. B. (1999): Hormonal regulation of Glutamate Receptor gene expression in the Anteroventral Periventricular Nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 19, April, No 8, pp. 3213-3222.
- Gu, Q. and Moos, R. L. (1996): 17β -estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 16, No 11, June 1, pp. 3620-3629.
- Guillamón A., De Blas M. R. and Segovia, S. (1988a): Effects of sex steroids on the development of the *Locus Coeruleus* in the rat. *Developmental Brain Research*. Vol. 40, pp. 306-310.
- Guillamón, A., Segovia, S., Del Abril, A. (1988b): Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the Medial Posterior region and the Lateral division of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the rat. *Developmental Brain Research*. Vol. 44, pp. 281-290.
- Guillamón, A., Claro, F., Del Abril, A., Del Cerro, M. C. R., Izquiero, M. A. P., Calés, J. M. y Segovia, S. (1993): Metodología para el estudio de las conductas reproductoras. En *Bases experimentales para el estudio del sistema nervioso*. Armagegol, J. A., Butró de Mujica, F. J., Sánchez, M. (Eds.). Editores. Universidad de Sevilla, pp. 633-669.
- Guillamón, A. and Segovia, S. (1993): Sexual Dimorphism in the Accessory Olfactory System. In *The Development of Sex Differences and Similarities in Behavior*. M Haug et al (eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 363-376.
- Guillamón, A. and Segovia, S. (1996): Sexual dimorphism in the CNS and the role of steroids. In *CNS neurotransmitters and neuro-modulators: Neuroactive steroids*. Stone, T. W., (Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press; 1996, pp. 127-152.
- Guillamón, A. and Segovia, S. (1997): Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Research Bulletin*. Vol. 44, No 4, pp. 377-382.

- Guillery, R. W. and Herrup, K. (1997): Quantification without pontification: choosing a method for counting objects in sectioned tissues. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 386, pp. 2-7.
- Gundersen, H. J., (1977): Notes of the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of Microscopy*. Vol. 111, pp. 219-223.
- Gundersen, H.J.G. and Østerby, R. (1981): Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!', *Journal of Microscopy*. Vol. 121, pp. 65-73.
- Gundersen, H. J. G. (1986): Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some ones, in memory of Willaim R. Thompson. *Journal of Microscopy*. Vol 143, pp. 3-45.
- Gundersen, H. J. G. and Jensen, E. B. (1987): The efficiency of systematic sampling in Stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*. Vol 147, Pt3, September, pp. 229-263.
- Gundersen, H. J. G., Bendtsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B., Vesterby, A. and West, M. J. (1988a): Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological reserach and diagnosis. *APMIS*. Vol. 96, pp. 379-394.
- Gundersen, H. J. G., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A. Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B., Vesterby, A. and West, A. (1988b): The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sample intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. Vol. 96, pp. 857-881.
- Gustafson, M. L. and Donahoe, P. K. (1994): Mülleria-Inhibiting substance: Critical roles in sexual differentiation. In: *Molecular Genetics of Sex Determination*, Stephen S. Watchel (Ed.), California, Academic Press Inc, 1994, pp. 457-497.

H

- Haavisto, T., Nurmela, K., Pohjanvirta, R., Huuskonen, H., El-Gehani, F. and Paranko, J. (2001): Prenatal testosterone and luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 178, pp. 169-179.
- Habert R., Lejeune, H., Saez, J. M. (2001): Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 179, pp. 47-74.
- Haig, D. (1997): Parental antagonism, relatedness asymmetries, and genomic imprinting. *Proc. R. Soc. Lond. B*. Vol. 264, pp. 1657-1662.
- Haig, D. (1999): Multiple paternity and genomic imprinting. *Genetics*, Vol. 151, pp. 1229-1331.

- Hall, J. M., Couse, J. F. and Korach, K. S. (2001): The multifaceted mechanism of estradiol and Estrogen Receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276, No 40, October 5, pp. 36869-36872.
- Halpern, M. (1987): The Organization and Function of the Vomeronasal System. *Ann. Rev. Neurosci.*, Vol. 10, pp. 325-362.
- Hampson, E. (1999): Sexual Differentiation of Spatial Functions in Humans. In *Sexual Differentiation of the Brain*. Matsumoto, A. (Ed.) CRC Press LLC, 1999. Boca Raton, Florida, pp. 279-300.
- Han, T. M. and De Vries, G. J. (2003): Organizational effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on vasopressin mRNA expression in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Journal of Neurobiology*, Vol. 54, pp. 502-510.
- Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., Ball, S. G., Strachan, L., Salas-Cortés, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., Wilson, D. I. (2000): *SRY*, *SOX9* and *DAX1* expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanism of Development*. Vol. 91, pp. 403-407.
- Haqq, C. M., King, C-Y., Dahoe, P. K. and Weiss, M. (1993): SRY recognizes conserved ADN sites in sex-specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90, February 1993, pp. 1097-1101.
- Haqq, C. M., King, C-Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Haqq, T. N., Donahoe, P. K., Weiss, M. A. (1994): Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Müllerian Inhibiting substance gene expression by SRY. *Science*, Vol. 266, pp. 1494 - 1500.
- Haqq, C. M. and Donahoe, P. K. (1998): Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiological Review*, Vol. 78, No. 1, pp. 1-33.
- Harms, C., Lautenschlager, M., Bergk, A., Katchanov, J., Freyer, D., Kapinya, K., Herwig, U., Dirnagl, U., Weber, J. R. and Hörtnagl, H. (2001): Differential mechanism of neuroprotection by 17 β -estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 21, No 8, April 15, pp. 2600-2609.
- Haseltine, F. P., and Ohno, S. (1981): Mechanism of gonadal differentiation. *Science*, Vol. 211, pp. 1272-78.
- Hatton, G. I., Modney, B. K. and Salm, A. K. (1992): Increases in dendritic bundling and dye coupling of supraoptic neurons after the induction of maternal behavior. *Annals of the New York Academic of Science*. Vol. 652, pp. 142-155.
- Haywood, S. A., Simonian, S. X., Van der Beek, E. M., Bicknell, R. J. and Herbison, A. E. (1999): Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology*. Vol. 140, No 7, pp. 3255-3263.

- Heimer, L. (1972): The olfactory connections of the diencephalon in the rat. *Brain Behav. Evol.*, Vol 6, pp. 484, 523.
- Hellwig, J., Ravenzwaay, B., Mayer, M. and Gembardt, C. (2000): Pre and postnatal oral toxicity of viclozolin in Wistar and Long-Evans rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Vol. 32, pp. 42-50.
- Hellwinkel, O. J. C., Bull, K., Holterhus, P. M., Homburg, N., Struve D., Hiort, O. (1999): Complete androgen insensitivity caused by a splice donor site mutation in intron 2 of the human androgen receptor gene resulting in an exon 2-lacking transcript with premature stop-codon and reduced expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 68, pp. 1-9.
- Hiipakka Richard A. and Shutsung Liao (1998): Molecular mechanism of androgen action. *TEM*. Vol. 9, No 8, pp. 317-324.
- Hines, M., Davis, F., Coquelin, A., Goy, R. W. and Gorski, R. A. (1985): Sexually dimorphic regions in the Medial Preoptic and the Bed Nucleus of the Stria Terminalis of the guinea pig: a description and an investigation of their relationship to gonadal steroids in adulthood. *Journal of Neurosciece*, Vol. 5, pp. 40-47.
- Hines, M., Allen, L. S. and Gorski, R. A. (1992): Sex differences in subregions of the Medial nucleus of the Amygdala and the Bed Nucleus of the Stria Terminalis of the rat. *Brain Research*, May 8, 1992; Vol. 579, No 2, pp. 321-326.
- Hines, M. (2002): Sexual differentiation of human brain and behavior. In *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrback, S. E. and Rubin, R. T. (Eds.). Vol. 4, cap. 70, pp. 425-462.
- Hiort, O., Sinnecker, G. H., Holtherhus, P. M., Nitsche, E. M. and Kruse, K. (1998): Inherited and *de novo* androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *The Journal of Pediatric*. Vol. 132, No 6, June 1, pp. 939-943.
- Hiort, O. and Holterhus, P-M. (2000): The molecular basis of male sexual differentiation. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 142, pp. 101-110.
- Hirobe, S., He, W-W., Lee, M. M. and Donahoe, P. K. (1992): Müllerian Inhibing Substance Messenger Ribonucleic Acid expression in granulosa and sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*. Vol. 131, No 2, pp. 854-862.
- Hofman, M. A., and Swaab, D. F. (1989): The Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in the human brain: a comparative morphometric study. *Journal of Anatomy*, Vol. 164, 55-72.
- Hölscher, C. (2002): Different strain of rats show different sensitivity to block of long-term potentiation by nitric oxide synthase inhibitors. *European Journal of Phasmacology*. Vol. 457, pp. 99-106.

- Holtherhus, P. M., Brüggewirth, H. T., Hiort, O., Kleinkauf-Houcken, A., Kruse, K., Sinnecker, H. G. and Brinkmann, A. O. (1997): Mosaicism due to a somatic mutation of the androgen receptor Gene determines phenotype in androgen insensitivity syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Vol. 82, No 11, pp. 3584-3589.
- Holtherhus, P. M., Sinnecker, G. H., Wollmann, H. A., Struve, D., Homburg, N., Kruse, K. and Hiort, O. (1999a): Expression of two functionally different androgen receptors in a patient with androgen insensitivity. *Eur. J. Pediatr.* Vol. 158, No 9, September 1, pp. 702-706.
- Holtherhus, P. M., Wiebel, J., Sinnecker, G. H., Brüggewirth, H. T., Sippell, W. G., Brinkmann, A. O. Kruse, K. and Hiort, O. (1999b): Clinical and molecular spectrum of somatic mosaicism in androgen insensitivity syndrome. *Pediatric Research.* Vol. 46, pp. 684-689.
- Hort, J., Brozek, G., Komarek, V., Langmeier, M. and Mares, P. (2000): Interstrain differences in cognitive functions in rats in relation to status epilepticus. *Behavioral Brain Research*, Vol. 112, pp. 77-83.
- Houssain, A. and Saunders, G. F. (2001): The human sex-determining gene *Sry* is a direct target of *WT1*. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 276, No 20 (18), May, pp. 16817-16823.
- Howard, C. V. and Reed, M. G. (1998): *Unbiased Stereology: Three-dimensional measurement in microscopy.* Springer. New York.
- Hughes, I. A. (2001): Minireview: sex differentiation. *Endocrinology.* Vol. 142, No 8, pp. 3281-3287.
- Hurst, L. D. and Randerson, J. P. (1999): An eXceptional chromosome. *TIG*, Vol. 15, October, No 10, pp. 383-385.
- Hutton, L.A., Gu, G., Simerly, R. S. . (1998): Development of a sexually dimorphic projection from the Bed Nucleus of the Stria Terminalis to the Anteroventral Periventricular Nucleus in the rat. *The Journal of Neuroscience.* Vol. 18, April 15, No 8, pp. 3003-3013.

I

- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (1999): cDNA cloning of a novel Androgen subtype. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 274, No 36, September 3, pp. 25205-25209.
- Imasaki, K., Okabe, T., Murakami, H., Tanaka, Y., Haji, M., Takayanagi, R. and Nawata, H. (1996): Androgen insensitivity syndrome due to new mutation in the DNA-binding domain of the Androgen Receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology.* Vol. 120, pp. 15-24.

- Inamura, K., Matsumoto, Y., Kashiwayanagi, M. and Kurihara, K. (1999): Laminar distribution of pheromone-receptive neurones in rat vomeronasal epithelium. *Journal of Physiology*, Vol. 517, No 3, pp. 731-739.
- Insel, T. R. (1992): Oxytocin. A neuropeptide for affiliation: Evidence from behavioral, receptor autoradiographic and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology*. Vol. 17, No 1, pp. 3-35.
- Insel, T. R., Gingrich, B. S. and Young, L. J. (2001): Oxitocin: who needs it?. In *Progress in Brain Research*. Vol. 133, Cap. 4, pp. 59-82.
- Ibanez, M. A., Gu, G. and Simerly, R. B. (2001): Target-dependet sexual differentiation of a limbic-hypothalamic neural pathway. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 21, August, No 15, pp. 5652-5659.
- Imperato-McGinley, J. and Zhu, Y-S. (2002): Gender and behavior in subjects with genetic defects in male sexual differentiation. In *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. and Rubin, R. T. (Eds.). Vol. 5, cap. 92, pp. 303-345.
- Isles, A. R. and Wilkinson, L. S. (2000): Imprinted genes, cognition and behavior. *Trends in Cognitive Sciences*. Vol. 4, No 8, August, pp. 309-318
- Iwasa, Y. and Pomiankowski, A. (1999): Sex specific X chromosome expression caused by genomic imprinting. *J. theor. Biol.* Vol. 197, pp. 487-495.
- Izquierdo, M. A. P. (1991): Función del Núcleo del Tracto olfatorio Accesorio en la inducción de conducta maternal en la rata. *Tesis Doctoral*. Facultad de Psicología. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid.
- Izquierdo, M. A. P., Collado, P., Segovia, S., Guillamón, A., Del Cerro, M. C. (1992): Maternal behavior induced in male rats by bilateral lesions of the Bed Nucleus of the Accesory Olfactory Tract. *Physiol. Beh.*, Vol. 4, No 52, pp. 707-712.
- J**
- Jacobs, L. F., Gaulin, S. J. C., Sherry, D. F. and Hoffman, G. E. (1990): Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 87, pp. 6349-6352, August, 1990.
- Jacobs, P.A. y Strong, J. A. (1959): A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature*, Vol. 183, pp. 302-303.
- Jacobson, C. D. and Gorski, R. A. (1981): Neurogenesis of the Sexual Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 196, pp. 519-529.

- Jacobson, C. D., Csernus, V. J. and Gorski, R. A. (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. *Journal of Neuroscience*, Vol. 1, No 10, October, pp. 1142-1147.
- Jacobson, C. D., Davis, F. C., and Gorski, R. A. (1985): Formation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area: neuronal growth, migration and changes in cell number. *Developmental Brain Research*. Vol., 21, pp. 7-18.
- Jacobson, H. I., Bennett, J. A. and Mizejewski, G. J. (1990): Inhibition of estrogen-dependent breast cancer growth by a reaction product of alpha-fetoprotein and estradiol. *Cancer Research*. Vol. 50, No 2, pp. 415-420.
- Jeanine I.H. Keuker, Gesa K. Vollmann-Honsdorf, Eberhard Fuchs (2001): Protocol. How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Research Protocols* Vol. 7, pp. 211-221.
- Johns, M. A., Feder, H. M., Komisaruk, B. R. and Mayer, A. D. (1978): Urine-induced reflex ovulation in anovulatory rats may be a vomeronasal effect. *Nature*. Vol. 272, pp. 446-448.
- Johnston, J. B. (1923): Further contribution to the study of the evolution of the forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 35, No 5, pp. 337-481.
- Johnston, R. E. (1983): Chemical signals and reproductive behavior. In *Pheromone and Reproduction in Mammals*. Vandenbergh, J. G. (Ed.). Academic Press. pp. 3- 37.
- Johnston, R. E. and Peng, M. (2000): The vomeronasal organ is involved in discrimination of individuals odors by males but not by females in golden hamsters. *Physiology and Behavior*, Vol. 70, pp 537-549.
- Jordan, C. L., Watamura, S. and Arnold, A. P. (1995): Androgenic, not estrogenic, steroids alter neuromuscular synapse elimination in the rat levator ani. *Developmental Brain Research*. Vol. 84, February 16, No 2, pp, 215-224.
- Jordan, C. L., Padgett, B. A., Hershey, J., Prins, G. and Arnold, A. P. (1997): Ontogeny of Androgen Receptor Immunoreactivity in lumbar motoneurons and in the sexually dimorphic *levator ani* muscle of male rats. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 379, pp. 88-98.
- Josso, N., Clemente, N., Gouédard, L. (2001): Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 179, pp. 25-32
- Jost, A (1953): Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Progress in Hormone Research*, Vol. 8, pp. 379-418.
- Jost, A., Perchellet, J., Prepin, J., Vigier, B. (1975). The prenatal development of bovine freemartins. In: *Symposium Intersexuality*, Reinvoorn, R. (Ed.), Springer, Berlin, pp. 392-406.

Ju G., and Swanson, L. W. (1989): Studies on the cellular architecture of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the rat: I Cytoarchitecture. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 280, pp. 587-602.

Juraska, J. M. (1991): Sex differences in "cognitive" regions of the rat brain. *Psychoneuroendocrinology*. Vol. 13, No 1-3, pp. 105-119.

K

Kalinichev, M., Rosenblatt, J. S., Nakabeppu, Y. and Morrell, J. I. (2000): Induction of *c-fos*-like and *FosB*-like immunoreactivity reveals forebrain neuronal population involved differentially in pub-mediated maternal behavior in juvenile and adults rats. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 416, pp. 45-78.

Katz, M. D., Cai, L-Q., Zhu, Y-S., Herrera, C., DeFillo-Ricart, M., Shackleton, C. H. L. and Imperato-McGinley, J. (1995): The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 α -Reductase-2 deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 80, No 11, pp. 3160-3167.

Kawata, M., Matsuda, K., Nishi, M., Ogawa, H. and Ochiai, I. (2001): Intracellular dynamics of steroids hormone receptor. *Neuroscience Research*. Vol. 40, pp. 197-203.

Keefer, D. A., Dordai, N., Mallonga, R., Ziegler, K., Shughrue, P. and Ramirez, P. (1987): Dihydrotestosterone induces a sexual dimorphism in estrogen uptake by specific anterior pituitary cell types in vivo. *Cell Tissue Research*. Vol. 249, August 1, No 2, pp. 477-479.

Kelche, C. and Aron, C. (1984): Olfactory cues and Accessory Olfactory Bulb lesion: effects on sexual behavior in the cyclic female rat. *Physiol. Behav.* pp. 45-48.

Keller, E. T., Ershler, W. B. and Chang, Ch. (1996): The Androgen Receptor: a mediator of diverse responses. *Frontiers in Bioscience*. Vol. 1, March 1, pp. 59-71.

Kelly, S. J., Ostrowski, N. L. and Wilson, M. A. (1999): Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Vol. 64, No 4, pp. 655-664.

Kendrick, K. M., Keverne, E. B., Hinton, M. R. and Goode, J. A. (1992): Oxitocin, amino acid and monoamine release in the region of the Medial Preoptic Area and Bed Nucleus of the Stria Terminalis of the sheep during parturition and suckling. *Brain Research*. Vol. 13, January, No 2, pp. 199-209.

Kendrick, K. M., Da Costra, A. P., Broad, K. D., Ohkura, S. Guevara, Lévy, F. and Keverne, B. (1997): Neural control of maternal behavior and olfactory recognition of offspring. *Brain Research Bulletin*. Vol. 44, No 4, pp. 383-395.

Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H. and Koopman, P. (1996): A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, Vol. 122, pp. 2813-2822.

- Kerchner, M. and Ward, L. L. (1992): SDN-MPOA volume in male rats is decreased by prenatal stress, but is not related to ejaculatory behavior. *Brain Research*. Vol. 581, pp. 244-251.
- Kerchner, M., Malsbury, C. W., Ward, O. B. and Ward, I. I. (1995): Sexually dimorphic areas in the rat medial amygdala: resistance to the demasculinizing effect of prenatal stress. *Brain Research*. Vol. 672, pp. 251-260.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. Vol. 26, pp. 239-257.
- Keuker, J. I. H., Vollmann-Honsdorf, G. K. and Fuchs, E. (2001): How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Research Protocols*. Vol 7, pp. 211-221.
- Keverne, E. B. and De la Riva, C. (1982): Pheromones in mice: reciprocal interaction between the nose and brain. *Nature*. Vol. 296, pp. 148-150.
- Keverne, E. B. (1983): Pheromonal influences on the endocrine regulation of reproduction. *TINS*. Vol. 66, pp. 381-384.
- Keverne, E. B. (1995): Olfactory learning. *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 5, pp. 482-488.
- Keverne, E. B. (1999): The Vomeronasal Organ. *Science*. Vol. 286, pp. 716-720.
- Keverne, E. B. (2001): Genomic imprinting and the maternal brain. In *Progress in Brain Research*. Vol. 133, Cap. 20. pp. 279-285.
- Kevetter, C. A. and Winans, S. (1981): Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 197, pp. 81-98.
- Kierszenbaum, A. L. (1994): Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocrine Reviews*, Vol.15, No 1, pp. 116- 134.
- Kim, J., Prawitt, D., Bardeesy, N., Torban, E., Vicaner, C., Goodyer, P., Zabel, B., and Pelletiers, J. (1999): The Wilms' Tumor Suppressor Gene (*wt1*) Product Regulates *Dax-1* Gene Expression during Gonadal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 19, No 3, Mar 1999, pp. 2289-2299.
- Kirsch, A. H., Mahmood, A. A., Endres, J., Bohra, L., Bonish, B., Weber, K. and Fox, D. A. (1996): Apoptosis of human T-cells: induction by glucocorticoids or surface receptor ligation *in vitro* and *ex vivo*. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. Vol. 13, April 1, No 2, pp. 80-89.

- Klein, S. L. (2000): The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol. 24, pp. 627-638.
- Klimek, V., Stockmeier, C., Overholser, J., Meltzer, H. Y., Kalka, S., Dilley, G. and Ordway, G. A. (1997): Reduced levels of Norepinefrine transporters in the *Locus Coeruleus* in major depression. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 17, November 1, No 2, pp, 8451-8458.
- Klinge, C. M. (2001): Estrogen Receptor interaction with Estrogen Response Elements. *Nucleic Acids Research*. Vol. 29, No 14, pp. 2905-2919.
- Kloet, E. R (2000): Stress in the brain. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 405, pp. 187-198.
- Komisaruk, B. R., Rosenblatt, J. S., Barona, M. L., Chinapen, S. Nissanov, J., O'Bannon, R. T., Johnson, B. M. and Del Cerro, M. C. R. (2000): Combined *c-fos* and ¹⁴C-2-deoxyglucose method to differentiate site-specific excitation from disinhibition: analysis of maternal behavior in the rat. *Brain Research*. Vol. 859, pp. 262-272.
- Kondo, Y., Sachs, B. D. and Sakuma, Y. (1997): Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. *Behavioural Brain Research*, Vol. 88, pp. 153-160.
- Koo, G. C., Wachtel, S. S., Krupen-Brown, K. and Mittl, L. R (1977): Mapping the Locus of the *H-Y* Gene on the human Y chromosome. *Science*, Vol. 198, pp. 940-942.
- Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990): Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature (London)*, Vol. 348, pp. 450-452.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P, and Lovell-Badge, R. (1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, Vol. 351, May, pp. 117-121.
- Kordower, J. H. (2000): Making the counts count: the stereology revolution. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 20, pp. 1-2.
- Krettek, J. E. and Price, J. L. (1978): Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 178, pp. 225-254.
- Krey, L. C., Lieberburg, I., MacLusky, N. J., Davis, P. G. and Robbins, R. (1982): Testosterone increases cell nuclear estrogen receptor levels in the brain of the Stanley-Gumbreck pseudohermaphrodite male rat: implications for testosterone modulation of neuroendocrine activity. *Endocrinology*. Vol. 110, June, pp. 2168-2176.

- Krieg, R. J., Batson, J. M., Martha, P. M., Matt, D. W., Salisbury, R. L. and Evans, W. S. (1990): Gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone secretion by perfused pituitary cells from normal, gonadectomized and testicular feminized rats. *Endocrinology*. Vol. 126, pp. 3022-3027.
- Krishtalka, L., Stucky, R. K., Beard, K. Ch. (1990): The earliest fossil evidence for the sexual dimorphism in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 87, pp. 5223-5226. July 1990.
- Kruijver, F. M. P., Zhou, J-N., Pool, C. W., Hofman, M. A., Gooren, L. J. G. and Swaab, D. F. (2000): Male-to-Female transsexuals have female neuron number in a limbic nucleus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 85, No 5, pp. 2034-2041.
- Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (1997): Comparison of the Ligand Binding specificity and transcript tissue distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology*. Vol. 138, No 3, pp. 863-870.
- Kumar, A., Dudley, C. A. and Moss, R. L. (1999): Functional Dichotomy within the Vomeronasal System: Distinct Zones of Neuronal Activity in the Accessory Olfactory Bulb Correlate with Sex-Specific Behaviors. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 19, pp. 1- 6.
- Küppers, E., Ivanova, T., Karolczak, M., Lazarov, N., Föhr, K. and Beyer, C. (2001): Classical and nonclassical Estrogen action in the developing midbrain. *Hormones and Behavior*. Vol. 40, pp. 196-202.
- Kurz, E. M., Sengelaub, D. R. and Arnold, A. P. (1986): Androgens regulate the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood. *Science*. Vol. 232, pp. 395-398.
- Kubinova, L. and Janacek, J. (2001): Confocal microscopy and Stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. *Microscopy Research and Technique*. Vol. 53, pp. 425-435.
- L**
- Lackey, B. R., Gray, S. L. and Henricks, D. M. (2001): Crosstalk and considerations in endocrine disruptor research. *Medical Hypotheses*. Vol. 56, No 6, pp. 644-647.
- Ladd, C. O., Owens, M. J. and Nemeroff, C. B. (1996): Persistent changes in Corticotropin-Releasing Factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology*. Vol. 137, No 4, pp. 1212-1218.
- Langley, E., Kempainen, J. A. and Wilson, E. M. (1998): Intermolecular NH₂-Carboxyl-terminal interactions in Androgen Receptor dimerization revealed by mutation that cause androgen insensitivity. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 273, No 1, January 2, pp. 92-101.

- Larriva- Sahd, J., Rondán, A., Orozco-Estévez, H. and Sánchez-Robles, M. R. (1993): Evidence of a direct projection of the vomeronasal organ to the medial preoptic nucleus and hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, Vol. 163, November, No. 1, pp. 45-49.
- Lauber, M. and Lichtensteiger, W. (1994): Pre- and postnatal ontogeny of Aromatase cytochrome P450 Messenger Ribonucleic Acid expression in the male rat studied by *in situ* hybridization. Vol. 156, No 4, pp. 1661-1668.
- Lauber, M. E. and Lichtensteiger, W. (1996): Ontogeny of 5 α -reductase (type 1) Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Brain: Early Presence in Germinal Zones. *Endocrinology*. Vol. 137, No 7, pp. 2718-2730.
- Lauber, M. E., Sarasin, A. and Lichtensteiger, W. (1997): Sex differences and Androgen-dependent regulation of Aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* Vol. 61, No 3-6, pp. 359-354.
- Leckin, A. and Tuomisto, L. (1995): Fluid balance in rats of three different strains after inhibition of histamine catabolism. *Physiology and Behavior*. Vol. 58, November, No 5, pp. 861-867.
- Lecqoc, A. L. (1986): Cambio de Sexo en Santo Domingo. *Mundo Científico*, Vol. 63, pp 1134-1136.
- Lee, Y. and Davis, M. (1997): Role of the Hippocampus, the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and the Amygdala in the excitatory effect of Corticotropin-Releasing Hormone on the acoustic startle reflex. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 17, August 15, No 16, pp. 6434-6446.
- Lee, M. M., and Donahoe, P. K. (1993): Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Review*, Vol. 14, No 2, 152-164.
- Lee, M. M., Donahoe, P. K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G. B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R. A., Shoenfeld, D., and MacLaughlin, D. T. (1996): Mullerian -Inhibiting Substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 81, No 2, pp. 571-576.
- Lee, M. M., Donahoe, P. K., Silverman, B. L., Hasegawa, T., Hasegawa, Y., Gustafson, M. L., Chang, Y. C., MacLaughlin, D. T. (1997): Measurements of serum mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med*, Vol. 336, May 22, No 21, pp. 1480-1486.
- Lee, S., and Boot, L. M. (1955): Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta Physiol. Pharmac. Neerl.* Vol. 4, pp. 442-443

- Lee, Y. and Davis, M. (1997): Role of the Hippocampus, the Bed Nucleus of the Stria Terminalis, and the Amygdala in the excitatory effects of Corticotropin-Releasing hormone on the acoustic startle reflex. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 17, August 15, No 16, pp. 6434-6446.
- Lehman, M. N., Winans, S. S. and Powers, J. B. (1980): Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science* Vol. 210, pp. 557-560.
- Lehman, M. N., and Winans, S. S. (1982): Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: Autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Research*. Vol. 240. pp, 27-41.
- Leonard, C. M. and Scott, J. W. (1971): Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental neuroanatomical study. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 141, pp. 313-330.
- Lephart, E. D., Lund, T. and Horvath, T. L. (2001): Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Research Reviews*. Vol. 37, pp. 25-37.
- LeVay, S. (1991): A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science*, Vol. 253, August 30, No 5023, pp. 1034-1037.
- LeVay, S. (1995): *Cerebro Sexual*. Alianza Editorial. Madrid, pp. 1- 245.
- Levine, A. C., Wang, J-P., Ren, M., Eliashvili, E., Russell, D. W. and Kirschenbaum, A. (1996): Immunohistochemical localization of steroid 5 α -reductase 2 in the human male fetal reproductive tract and adult prostate. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 81, No 1, pp. 384-389.
- Li, L. L., Keverne, E. B., Aparicio, S. A., Ishino, F., Barton, S. C. and Surani, M. A. (1999): Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed *Peg3*. *Science*. Vol. 284, April 9, pp. 330-333.
- Lisciotto, C. A. and Morrell, J. L. (1994): Sex differences in the distribution and projections of testosterone targets neurons in the Medial Preoptic Area and the Bed Nucleus of the Stria Terminalis of rats. *Hormones and Behavior*, Vol. 24, December 1, No 4, pp. 492-502.
- Lobaccaro, J. M., Poujol, N., Chiche, L., Lumbroso, S., Brown, T. R. and Sultan, Ch. (1996): Molecular modeling and in vitro investigation of the human Androgen Receptor DNA-binding domain: application for the study of two mutations. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 116, pp. 137-147.
- Lomas, D. E. and Keveren, E. B. (1982): Role of vomeronasal organ and prolactin in acceleration of puberty in female mice. *J. Reprod. Fert.*. Vol. 66, pp. 287-302

- Lonstein, J. S. and Stern, J. M. (1997): Role of the midbrain Periaqueductal Gray in maternal nurturance and aggression: *c-fos* and electrolytic lesion studies in lactating rats. *The Journal of Comparative Neuroscience*. Vol. 17, May 1, No 9, pp. 3364-3378.
- Lonstein, J. S. and Stern, J. M. (1998): Site and behavioral specificity of Periaqueductal Gray lesions on postpartum sexual, maternal and aggressive behavior in rats. *Brain Research*. Vol. 804, pp. 21-35.
- Lonstein, J. S. and De Vries, G. J. (2000): Maternal behaviour in lactating rats stimulates *c-fos* in Glutamate Descarboxylase-Synthesizing neurons of the Medial Preoptic Area, Ventral Bed Nucleus of the Stria Terminalis, and Ventrocaudal Periaqueductal Gray. *Neuroscience*. Vol. 100, No 3, pp. 557-568.
- Lonstein, J. S., Gréco, B., De Vries, G. J., Stern, J. M. and Blaunstein, J. D. (2000): Maternal behavior stimulates *c-fos* activity within Estrogen Receptor alpha-containing neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology*. Vol. 72, pp. 91-101.
- Lopez, H. S. and Carrer, H. F. (1982): Investigation of peripeduncular-hypothalamic pathways: involved in the control of lordosis in the rat. *Brain Research*. Vol. 16, No 1-2, pp. 287-302.
- Lopez, H. S. and Carrer, H. F. (1985): Further studies on peripeduncula-hypothalamic pathways involved in sexual behavior in the female rat. *Exp. Neurol*. Vol. 88, No 2, pp. 241-252.
- Lovell-Badge, R., Robertson, E., (1990). XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine primary testis determining gene, *Tdy*. *Development*. Vol. 109, pp. 635-646.
- Lovell-Badge, R. (1993): Sex determining gene expression during embryogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. London B*. Vol. 335, pp. 159-164.
- Lovic, V., Gonzalez, A. and Fleming, A. S. (2001): Maternally separated rats show deficits in maternal care in adulthood. *Developmental Psychobiology*. Vol. 39, pp. 19-33.
- Lucas, B. K., Ormandy, C. J., Binart, N., Bridges, R. S. and Kelly, P. A. (1998): Null mutation of the Prolactin Receptor Gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*. Vol. 139, No 10, pp. 4102-4197.
- Luque, J. M., De Blas, M. R., Segovia, S. and Guillamón, A. (1992): Sexual dimorphism of the dopamine- β -hydroxylase-immoreactive neurons in the rat *Locus Coeruleus*. *Developmental Brain Research*. Vol. 67, pp. 211-215.
- Lund, T. D., West, T. W., Fleming, D. E., Setchell, K. D. R. and Lephart, E. D. (2000): Dietary phytoestrogens enhance visual spatial memory (VSM) in females (but inhibit VSM in males), *Soc. Neurosci. Abstr.* 26 (2000) 1745, # 651.12.

M

- MacLean, H. E., Warne, G. L. and Zajac, J. D. (1997): General Review. Localization of functional domains in the Androgen Receptor. *J. Steroid Biochem. Biol.* Vol. 62, No 4, pp. 233-242.
- Madeira, M. D., Sousa, N., Cadete-Leite, A., Lieberman, A. R. and Paula-Barbosa, M. (1993): The supraoptic nucleus of the adult rat hypothalamus displays marked sexual dimorphism which is depend on body weight. *Neuroscience*, Vol., 52, No 3, pp. 497-513.
- Mahendroo, M. S., Cala, K. M., and Russell, D. W. (1997): Fetal death in mice lacking α -reductase type 1 caused by estrogen excess. *Mol. Endocrinol.* Vol. 11, pp. 917-927.
- Majdic, G., Millar, M. R. Saunders, P. T. K. (1995): Immunolocalization of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. *J. Endocrinology.* Vol. 147, pp 285-293.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., Paul, S. M., (1986): Steroids hormones metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, Vol. 232, pp. 1004-1007.
- Malsbury, C. W. (1993): DHT blocks estrogen-induced masculinization of the medial amigadala. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 19 (1993), 882.
- Malsbury, C. W. and McKay, K. (1994): Neurotrophic effects of testosterone on the Medial Nucleus of the amygdala in adult male rats. *Journal of Neuroendocrinology.* Vol. 6, pp. 57-69.
- Manaye, K. F., McIntire, D. D., Mann, D. M. and German, D. C. (1995): *Locus coeruleus* cell loss in the aging human brain: a non-random process. *Journal of Comparative Neurology.* Vol. 358, July 17, No 1, pp. 79-87.
- Marcus, R., Leary, D., Schneider, D., Shane, E., Favus, M. and Quigley, C. A. (2000): The contribution of testosterone to skeletal development and maintenance: lesson from the Androgen Insensitivity Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* Vol. 85, No 3, pp. 1032-1037.
- Marjoleen, J. M. Croiset, G., Diamant, M., De Wield, D., Wiegant, V. M. (2001): CRH signalling in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activartion in conscious rat. *Neuropsychopharmacology*, Vol. 24, pp. 1-10.
- Markham, J. A., Jurgens, H. A., Augerm C. J., De Vries, G. J., Arnold, A. P. and Juraska, J. M. (2003): Sex differences in mouse cortical thickness are independent of the complement of sex chromosomes. *Neuroscience*, Vol. 116, pp. 71-75.

- Martha, P. M., Krieg, R. J., Batson, J. M., Rogol, A. D. and Evans, W. S. (1989): Growth hormone secretion by individual somatotopes of the testicular feminized rat. *Endocrinology*. Vol. 124, March, pp. 1124-1130.
- Martin, J. T. (2000): Sexual dimorphism in immune function: the role of prenatal exposure to androgens and estrogens. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 405, pp. 251-261.
- Martin, L. J., Powers, R. E., Dellovade, T. L. and Price, D. L. (1991): The Bed nucleus-Amygdala continuum in human and monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 309, No 4, July 22, pp. 445-485.
- Mastumoto, A. and Arai, Y. (1986): Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinology*, Vol. 42, No 3, pp. 232-236.
- Mathieson, W. B., Taylor, S. W., Marshall, M. and Neumann, P. E. (2000): Strain and sex differences in the morphology of the Medial Preoptic Nucleus of mice. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 428, pp. 254-265.
- Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K. and Kato, S. (2002): Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 α -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Research*. Vol. 30, No 6, pp. 1387-1393.
- Matsumoto, A., Micevych, P. E., and Arnold, P. A. (1988): Androgen regulates synaptic input to motoneurons of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* Vol. 8, pp. 4168-4176.
- Matsumoto, A., Arai, Y., and Hyodo, S. (1993): Androgenic regulation of expression of beta-tubulin messenger ribonucleic acid in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J. Neuroendocrinol.* Vol. 5, August, pp. 357-363.
- Matsumoto, A., Arai, Y., Urano, A. and Hyodo, S. (1994): Androgen regulates gene expression of cytoskeletal proteins in adult rat motoneurons. *Hormones and Behavior*. Vol. 28, December, pp. 357-366.
- Matsumoto, A. (1998): Synaptic changes in the perineal motoneurons of aged rats. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 400, p 103-109.
- Matsumoto, A. (2002): Age-related changes in nuclear receptor coactivator immunoreactivity in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus of male rats. *Brain Research*. Vol. 943, pp. 202-205.
- McAbee, M. D. and DonCarlos, L. L. (1998): Ontogeny of region-specific sex differences in Androgen Receptor Messenger ribonucleic acid expression in the rat forebrain. *Endocrinology*. Vol. 139, No 4, pp. 1738-1745.

- McAbee, M. D. and DonCarlos, L. L. (1999a): Regulation of Androgen Receptor Messenger ribonucleic acid expression in the developing rat forebrain. *Endocrinology*. Vol. 140, No 4, pp. 1807-1814.
- McAbee, M. D. and DonCarlos, L. L. (1999b): Estrogen, but not androgens, regulates Androgen Receptor Messenger Ribonucleic Acid expression in the developing male rat forebrain. *Endocrinology*. Vol. 140, No. 8, pp. 3674-3681.
- McCarthy, M., Davis, A. M. and Mong, J. A. (1997): Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Research Bulletin*. Vol. 44, No 4, pp. 487-495.
- McCarthy, M. M., Auger, A. P. and Perrot-Sinal, T. S. (2002): Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *TRENDS in Neuroscience*. Vol. 25, No 6, pp. 307-312.
- McClintock, M. K. (2000): Human Pheromones: primers, releaser, signalers and modulators? In Wallen K., Scheider, J. E. (Eds.). *Reproduction in context, 2000*; pp. 345-420.
- McDonald, A. J. (1983): Neurons of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis: A golgy study in the rat. *Brain Research Bulletin*. Vol. 10, pp. 111-120.
- McEwen, B. S. (1978): Sexual maturation and differentiation: the role of the gonadal steroids. *Progress in Brain Research*. Vol. 48, January, pp. 291-308.
- McEwen, B. S (1988): Action of sex hormones on the brain: "organization" and "activation" in relation to funcional teratology. *Progress in Brain Research*. Vol. 73, pp. 121-134.
- McEwen, B. S. (1991a): Non-genomic and genomic effect of steroids on neural activity. *TIPS*, Vol. 12, April, pp. 141-147.
- McEwen, B. S. (1991b): Our changing ideas about steroid effects on an ever changing brain. *Seminars in the Neurosciences*. Vol. 3, pp. 497-507.
- McEwen, B. S. and Finch, C (1992): Alfred E. Mirsky and the foundations of molecular Biology and Neuroendocrinology. *Endocrinology*. Vol. 130, No 1. pp. 6-7.
- McEwen, B. S. (1999a): Permanence of brain sex differences and structural plasticity of the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, June, pp. 7128-7130.
- McEwen, B. S. (1999b): The molecular and neuroanatomical basis for Estrogen effects in the Central Nervous System. *The Journal of Clinical Endocrinology ad Metabolism*. Vol. 84, No 6, pp. 1790-1797.
- McEwen, B. S. and Alves, S. E. (1999): Estrogen actions in the Central Nervous System. *Endocrine Reviews*. Vol. 20, N° 3. pp 279-307.

- McEwen, B. S. (2001): Comentario: The Ever-Changing Brain. *Neuropsychopharmacology*. Vol. 25, N°6, pp. 797-798.
- McGinnis, M. Y., Davis, P. G., Meaney, M. J., Singer, M. and McEwen, B. S. (1983): *In vitro* measurement of cytosol and cell nuclear Androgen Receptor in male rat brain and pituitary. *Brain Research*. Vol. 275, No 1, September 19, pp. 75-82.
- McGinnis, M. Y., Marcelli, M. and Lamb, D. L. (2002): Consequences of mutation in Androgen Receptor genes: molecular biology and behavior. In : *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. and Rubin, R. T. (Eds.). Vol. 5, Cap. 93, pp. 347-379.
- McIndoe, J. H. and Etre, L. A. (1981): An antiestrogenic action of androgens in human breast cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. October, Vol. 53, No 4, pp. 836-842.
- McLaren, A (2000): Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 163, pp. 3-9.
- McLean, J. H., Shipley, M. T., Nickell, W. T., Aston-Jones, G. and Reyher, C. R. H. (1989): Chemoanatomical organization of the Noradrenergic input from *Locus Coeruleus* to the Olfactory Bulb of the adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 285, pp. 339-349.
- McPhaul, M. J., Marcelli, M., Zoppi, S., Griffin, J. E. and Wilson, J. D. (1993): Genetic basis of endocrine disease 4. The Spectrum of mutations in the *Androgen Receptor* gene causes androgen resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 76, No 1, pp. 17-23
- McPhaul, M. J. and Griffin, J. E. (1999): Male pseudohermaphroditism caused by mutation of the human *Androgen Receptor*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 84, No 10, pp. 3435-3441.
- McPhaul, M. J. (1999): Molecular defects of the Androgen Receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 69, pp. 315-322.
- McPhaul, M. J. (2002): Molecular defects of the Androgen Receptor. *The Endocrine Society*. pp. 181-194.
- McPhaul, M. J. and Griffin, J. E. (1999): Comentario: Male pseudohermaphroditism caused by mutations of the human Androgen Receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 84, No 10, pp. 3435-3441.
- Melcangi, R. C., Celotti, F., Ballabio, M., Castano, P., Poletti, A., Milani, S. and Martini, L. (1988): Ontogenetic development of the 5 α -reductase in the rat brain: cerebral cortex, hypothalamus, purified myelin and isolated oligodendrocytes. *Developmental Brain Research*, Vol. 44, pp. 181-188.

- Mellon, S. H. (1994): Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 75, No 5, pp. 1003-1007.
- Menella, J. A. and Moltz, H. (1988a): Infanticide in rats: male strategy and female counter-strategy. *Physiol. Behav.* Vol. 42, pp. 19-28.
- Menella, J. A. and Moltz, H. (1988b): Infanticide in the male rat: the role of vomeronasal organ. *Physiol. Behav.* Vol. 42, pp. 303-306.
- Mensah-Nyagan, A., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletiers, G. and Vaudry, H. (1999): Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the Central Nervous System. *Pharmacological Reviews*. Vol. 51, No 1, pp. 63- 81
- Merchant-Larios, H. and Moreno-Mendoza, N. (2001): Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells. *Archives of Medical Research*, Vol. 32, pp. 553-558.
- Meredith, M. (1983): Sensory physiology of pheromone communication. Pheromones and reproduction in mammals. Ed. Academic Press.
- Meredith, M. (1991): Sensory processing in the Main and Accessory Olfactory Systems: comparisons and contrast. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* Vol. 39, No 48, pp. 601-614.
- Meredith, J. M., Bennett, C. and Scallet, A. C. (2001): A practical three-dimensional reconstruction method to measure the volume of the sexually-dimorphic central nucleus of the medial preoptic area (MPOC) of the rat hypothalamus. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 104, pp. 113-121.
- Mercier, G., Turque, N. and Schumacher, M. (2001): Early activation of transcription factor expression in Schwann cells by progesterone. *Molecular Brain Research*. Vol. 97, pp. 137-148.
- Meyer, T. E., Waebbers, G., Lin, J., Beckmann, W. and Habeners, J. F. (1993): The promoter of the gene encoding 3', 5' - cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Response Element Binding protein contains cAMP Response Elements: evidence for positive autoregulation of gene transcription. *Endocrinology*. Vol. 132, No 2, pp. 760-780.
- Micevych, P. E., Park, S. S., Akesson, T. R. and Elde, R. (1987): Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rats. I. Hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 255, pp. 124-136.
- Middleton, G., Piñón, L. G., Wyatt, S. and Davies, A. M. (1998): Bcl-2 accelerates the maturation of early sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 18, No 9, May 1, pp. 3344-3350.

- Miley, W. M., Blunstein, J. and Kennedy, K. (1982): Prenatal stimulation and postnatal testosterone affects infanticide in female rats. *Physiology and Behavior*. Vol. 28, April, No 4, pp. 627-629.
- Miller, M. A., De Vries, G. J., al-Shamma, H. A. and Dorsa, D. M. (1992): Decline of vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Journal of Neuroscience*, Vol. 12, pp. 2881-2887.
- Miranda, R. C., Sohrabji, F. and Torand-Allerand, D. C. (1993): Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing Central Nervous System suggests a potential for autocrine interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, pp. 6439-6443.
- Mishina, Y., Whithworth, D. J., Racine, Ch., and Behringer, R. R. (1999): High specificity of Müllerian-Inhibiting Substance signaling *in vivo*. *Endocrinology*. Vol. 140, No 5, pp. 2084-2088.
- Mizukami, S., Nishizuka, M., and Arai, Y. (1983): Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp. Neurol.*, Vol. 79, pp. 569-575.
- Moga, M. M., Saper, C. B., y Gray, T. (1989): Bed Nucleus of the Stria Terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the Parabrachial Nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 283, pp. 315-332.
- Mogil, J. S. (1999): The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 7744-7751.
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M. and Sternberg, W. F. (2000): Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol. 24, pp. 375-389.
- Moltz, H. (1974): Some mechanism governing the induction, maintenance and synchrony of maternal behavior in the laboratory rat. In *Reproductive Behavior*. Adv. in Beh. Biol., Vol. 11, Montagna, W. (Ed.). pp. 77-96.
- Monks, D. A., Vanston, C. M. and Watson, N. V. (1999): Direct androgenic regulation of Calcitonin Gene Related Peptide expression in motoneurons of rats with mosaic Androgen Insensitivity. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 19, July 1., No 3, pp. 5597-5601.
- Monks, D. A. and Watson, N. V. (2001): N-Cadherin expression in motoneurons is directly regulated by androgens: a genetic mosaic analysis in rats. *Brain Research*. Vol. 895, pp. 73-79.
- Moore, A. N., Waxham, M. N. and Dash, P. K. (1996): Neuronal activity increases the phosphorylation of the transcription factor cAMP Response Element-Binding protein (CREB) in rat hippocampus and cortex. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, No 24, June 14, pp. 14214-14220.

- Moore, C. L. (1984): Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental Psychobiology*. Vol. 17, July, No 4, pp. 347-356.
- Moore, C. L., Chadwick-Dias, A. M. (1986): Behavioral responses of infant rats to maternal licking: variations with age and sex. *Developmental Psychobiology*. Vol. 19, September, No 5, pp. 427-438.
- Moore, C. L., Dou, H. and Juraska, J. M. (1992): Maternal stimulation affects the number of motor neurons in a sexually dimorphic nucleus of the lumbar spinal cord. *Brain Research*. Vol., 572, February 14, No 1-2, pp. 52-56.
- Moore, C. L. and Power, K. L. (1992): Variation in maternal care and individual differences in play, exploration and grooming of juvenile Norway rat offspring. *Developmental Psychobiology*, Vol. 25, April, No 3, pp. 165-182.
- Mora, O. A., Sánchez-Criado, J. E. and Guisado, S. (1985): Role of vomeronasal organ on the estral cycle reduction by pheromones in the rat. *Rev. Española Fisiol*. Vol. 41, pp. 305-310.
- Morgan, M. A. and Pfaff, D. W. (2002): Estrogen's effects on activity, anxiety, and fear in two mouse strains. *Behavioral Brain Research*. Vol. 132, pp. 85-93.
- Morishima, A., Grumbach, M. M., Simpson, E. R., Fisher, C. and Qin, K. (1995): Aromatase efficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 80, No 12, 3689-3698.
- Moss, R. L., Flynn, R. E., Shen, X-M., Dudley, C., Shi, J. and Novotny, M. (1997): Urine-Derived Compound Evokes Membrane Responses in Mouse Vomeronasal Receptor Neurons. *J. Neurophysiol*. Vol. 77, pp. 2856-2862.
- Müller, E. E., Locatelli, V. and Cocchi, D. (1999): Neuroendocrine control of Growth hormone. *Physiological Reviews*. Vol. 79, No 2, pp. 511-607.
- Murakami, S. and Arai, Y. (1989): Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neurosci. Lett*. Vol. 102, July 31, No 2-3, pp. 185-190.
- Murkies, A. L., Wilcox, G. and Davis, S. (1998): Phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 83, No 2, pp. 297-303.
- Murphy, D. D. and Segal, M. (1997): Morphological plasticity of dendritic spines in Central Nervous is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 94, February, pp. 1482-1487.
- Murphy, L., Jeffcoate, I. A. and O'Shaughnessy, P. J. (1994): Abnormal Leydig cell development at puberty in the androgen-resistant Tfm mouse. *Endocrinology*. Vol. 136, No 4, pp. 1372-1377.

N

- Naess, O., Haug, E., Attramadal, A., Aakvaag, A., Hansson, V. and French, F. (1976): Androgen Receptors in the anterior pituitary and central nervous system of the androgen "insensitivity" (*Tfm*) rat: correlation between receptor binding and effects of androgens on gonadotropin secretion. *Endocrinology*. Vol. 99, No 5, November, pp. 1295-1303.
- Naftolin, F. and MacLusky, N. J. (1982): Aromatase in the central nervous system. *Cancer Research*. Vol. 42, August, No 8 suppl. pp. 3274s-3276s.
- Naftolin, F. (1994): Brain aromatization of androgen. *J. Reprod. Med.* Vol. 39, April, No 4, pp. 257-261.
- Nagai, K. (2001): Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene*. Vol. 270, pp. 161-169.
- Nef, S., and Parada, L. F. (2000): Hormones in male sexual development. *Genes and Development*. Vol. 14, pp. 3075-3086.
- Negri-Cesi, P. Poletti, A., Martini, L. and Piva, F. (2000): Steroid metabolism in the brain: role in sexual differentiation. In *Sexual Differentiation of the Brain*. Matsumoto, A. (Ed.). CRC Press LLC, 1999. Boca Ratón, Florida. pp. 33-58.
- Negri-Cesi, P., A. Colciago, M. Motta, L. Martini, F. Celotti. (2001): Aromatase expression and activity in male and female cultured rat hypothalamic neurons: effect of androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 178, pp 1-10
- Nelson, R. J. (1996): Psicoendocrinología. Las Bases Hormonales de la Conducta. Ed. Ariel, Barcelona.
- Nelson, R. J. (1997): The use of genetic "knock out" mice in behavioral endocrinology research. *Hormones and Behavior*. Vol. 31, pp. 188-196.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. and Gustaffsson, J. (2001): Mechanism of Estrogen action. *Physiological Reviews*. Vol. 81, No 4, October, pp. 1535-1565.
- Nishi, S., Matsue, H., Yoshida, H., Yamaoto, R. and Sakai, M. (1991): Localization of the estrogen-binding site of α -fetoprotein in the chimeric human-rat proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 88, April, pp. 3102-3105.
- Nishimori, K., Young, L. J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T. R. and Matzuk, M. M. (1996): Oxitocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, October, pp. 11699-11704.
- Nishizuka, M. and Arai, Y. (1981): Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala its dependence neonatal hormone environment. *Brain Research*, Vol. 212, pp 31-38.

- Noonan, M., Smith, M. A., Kelleher, K. and Sanfilippo, M. A. (1998): Sex differences in Anterior Commissure size in the rat. *Brain Research Bulletin*. Vol. 45, No 1, pp. 101-104.
- Nordeen, E. J., Nordeen, K. W., Sengelaub, D. R. and Arnold, A. P. (1985): Androgen prevent normally occurring cell death in a sexually Dimorphic Spinal Nucleus. *Science* Vol. 229, No 16 August, pp. 671-673.
- Normington, K. and Russell, D. W. (1992): Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isoenzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267, No 25, September, pp. 19548-19554.
- Numan, M., Rosenblatt, J. S. and Komisaruk, B. R. (1977): Medial Preoptic Area and onset of maternal behavior in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* Vol. 91, February, No 1, pp. 146-164.
- Numan, M. (1988): Neural basis of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology*. Vol. 13, No 1-2, pp. 47-62.
- Numan, M. (1994a): Maternal Behavior. In *The Physiology of Reproduction*. Second Edition. Knobil, E. and Neill, J. D. (Eds.). Raven Press, New York, pp. 221-302.
- Numan, M. (1994b): A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. *Acta Paediatr. Suppl.* Vol. 397, June, pp. 19-28.
- Numan, M. and Numan M. (1996): A lesion and neuroanatomical tract-tracing of the role of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in retrieval behavior and other aspects of maternal responsiveness in rats. *Developmental Psychobiology*. Vol. 29, No 1, pp. 23-51.
- Numan, M. and Sheehan, T. P. (1997): Neuroanatomical circuitry for mammalian maternal behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 807, pp. 101-127.
- Numan, M., Numan, M. J., Marzella, S. R. and Palumbo, A. (1998): Expression of *c-fos*, *fos B*, and *egr-1* in the Medial Preoptic Area and Bed Nucleus of the Stria Terminalis during maternal behavior in rats. *Brain Research*. Vol. 792, pp. 348-352.
- O**
- O'Connell, R. J. and Meredith, M (1984): Effects of volatile and non volatile chemical signals on male sex behavior mediated by the main and accessory olfactory system. *Behav. Neurosci.* pp. 1083-1093.
- Ohm, T. G., Bush, C. and Bohl, J. (1997): Unbiased estimation of neuronal number in the human nucleus *Coeruleus* during aging. *Neurobiology of Aging*. Vol. 18, No 4, pp. 393-399.

- Olefsky, J. M. (2001): Nuclear receptor minireview series. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276, No 40, October 5, pp. 36863-36864.
- Olsen, K. L. (1979): Induction of male mating behavior in Androgen-Insensitivity (Tfm) and normal (King-Holtzman) male rats: effect of Testosterone Propionate, Estradiol Benzoate and Dihydrotestosterone. *Hormones and Behavior*. Vol. 13, pp. 66-84.
- Olsen, K. L. and Whalen, R. E. (1982): Estrogen binds to hypothalamic nuclei of androgen-insensitive (tfm) rats. *Experientia*. Vol. 38, January, No 1, pp. 139-140.
- Olsen, K. L. (1985): Genetic determinants of sexual differentiation. In *Hormones and Behavior in Higher Vertebrates*, Balthart, J., Pröve, E. and Gilles, R. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin 1985, pp. 138-155.
- Olsen, K. L. (1992): Genetic influences on sexual behavior differentiation. In *Sexual Differentiation*. Gerall, A. A., Moltz and H., Ward, I. L. (Eds.). Cap. 1, New York, Plenum Press. pp. 1-40.
- Olsen, N. J. and Kovacs, W. J. (1989): Increased thymic size and thymocyte interleukin 2 production in androgen-resistant mice. *Scand. J. Immunol.* Vol. 29, pp. 733-738.
- Olsen N. J. and Kovacs, W. J. (1996): Gonadal steroids and immunity. *Endocrinology Reviews*. Vol. 17, No 4, pp. 369-384.
- Olsen, N. J., Viselli, S. M., Fan, J. and Kovacs, W. J. (1998): Androgens accelerate thymocyte apoptosis. *Endocrinology*. Vol. 139, No 2, pp. 748-752.
- Onaivi, E. S., Maguire, P. A., Tsai, N. F., Davies, M. F. and Loew, G. H. (1992): Comparison of behavioral and central BZD binding profile in three rat lines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Vol. 43, November, No 3, pp. 825-831.
- Onaka, Tatsushi., Kinji Yagi (1998): Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in neuroendocrine and behavioral responses to fear-related stimuli in rats. *Brain Research*. Vol. 788, pp. 287-293.
- Ong, Y. C., Wonf, H. B., Adaikan, G. and Yong, E. L. (1999): Directed pharmacological therapy of ambiguous genitalia due to an androgen receptor gene mutation. *The Lancet*. Vol. 354, October 23, pp. 1444-135.
- Orikasa, C., Kondo, Y., Hayashi, S., McEwen, B. S. and Sakuma, Y. (2001): Sexually dimorphic expression of estrogen receptor β in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: Implication in luteinizing hormone surge. *PNAS*. Vol. 99, March, No 5, pp. 3306-3311.
- O'Shaughnessy, P. J., Johnston, H., Willerton, L. and Baker, P. J. (2002): Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *Journal of Cell Science*. Vol. 115, pp. 3491-3496.

Ogawa, S., Lubahn, D. B., Korach, K. S. and Pfaff, D. W. (1997): Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 94, February, pp. 1476-1481.

Oxley, G. and Fleming, A. S. (2000): The effects of Medial Preoptic Area and Amygdala lesions on maternal behavior in the juvenile rat. *Developmental Psychobiology*. Vol. 37, pp. 253-265.

P

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. J. M., Nilsson S., Gustafsson, J. A., Kushner, P. J. and Scanlan, T. S. (1997): Differential ligand activation of Estrogen Receptor α and β at AP1 sites. *Science*. Vol. 277, pp. 1508-1510.

Pakkenberg, B. and Gundersen, H. J. G. (1988): Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *Journal of Microscopy*. Vol 150, Pt 1, April, pp. 1-20.

Pfaff, D. W. and Sakuma, Y. (1979a): Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol.*, Vol. 288, pp. 189-202.

Pfaff, D. W. and Sakuma, Y. (1979b): Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol.* Vol. 288, pp. 203-210.

Parma, P., Pailhoux, E., Puissant, C. and Cotito, C. (1997): Porcine *Dax-1* gene: isolation and expression during gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 135, pp. 49-58.

Pass, D. and Freeth, G. (1993): Anzccart. *Anzccart News*. Vol. 6, No 4, pp. 1-4.

Paxinos, G. and Watson, Ch. (1998): *The Rat Brain in stereotaxis coordinates*. Academic Press, 4^o reimpression, 1-474.

Pazos, F., Sánchez-Franco, F., Balsa, J. A., Escalada, J., Palacios, N. and Cacicedo, L. (2000): Mechanism of reduced body growth in the pubertal feminized male rat: unbalanced estrogen and androgen action on the somatotropic axis. *Pediatric Research*. Vol. 48, No 1, pp. 96-103.

Pérez-Laso, C., Valencia, A., Rodríguez-Zafra, M., Calés, J. M., Guillamón, A., and Segovia, S. (1994): Perinatal administration of diazepam alters sexual dimorphism in the rat olfactory bulb. *Brain Research* Vol. 634, January 14, No 1, pp. 1-6.

Pérez-Laso, C., Segovia, S., Collado, P., Rodríguez- Zafra, M., Del Abril, A., Guillamón, A. (1996): Estradiol masculinizes the number of Accessory Olfactory Bulb mitral cells in the rat. *Brain Research Bulletin*. Vol. 42, No 3, pp. 227-230.

- Perrot-Sinal, T. S., Davis, A. M., Gregerson, K. A., Kao, J. P. Y. and McCarthy, M. M. (2001): Estradiol enhances excitatory Gammabutyric Acid-mediated Calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons. *Endocrinology*. Vol. 142, No 6, pp. 2238-3343.
- Perrot-Sinal, T. S., Auger, A. P. and McCarthy, M. M. (2003): Excitatory actions of GABA in developing brain are mediated by L-type Ca₂ channels and depend on age, sex and brain region. *Neuroscience*. Vol. 116, pp. 995-1003.
- Peterson, D. A. (1999): Quantitative histology using microscopy: implementation of unbiased Stereology procedures. *Methods*. Vol. 18, pp. 403-507.
- Pfeifer, C. A. (1936): Sexual differences of the Hypophyses and their determination by the gonads. *Am. J. Anat.* Vol. 58, pp. 195-225.
- Phoenix, Ch. H., Goy, R. W., Gerall A. A., Young W. C. (1959): Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Prenatal Androgen and Sex Behavior*. Vol. 65, September, pp. 369-382.
- Pike, C. J. (1999): Estrogen modulates neuronal Bcl-x_L expression and β -Amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 72, pp. 1552-1563.
- Pike, A. C. W., Brzozowski, A. M., Walton, J., Hubbard, R. E., Thorsell, A. G., Li, Y. L., Gustafsson, J. A. and Carlquist, M. (2001): Structural insight into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure*. Vol. 9, pp. 145-153.
- Pinel, J. P. J. (2001): Biopsicología. Prentice Hall, 4^a Edición, pp. 342-343.
- Pinos, H., Collado, P., Rodríguez-Zafra, M., Rodríguez, C., Segovia, S. and Guillamón, A. (2001): The development of sex differences in the *Locus Coeruleus* of the rat. *Brain Research Bulletin*. Vol. 56, No 1, pp. 73-78.
- Pinsky, L., Trifiro, M., Beitel, L. K., and Kaufman, M. (1994): Molecular genetic of Androgen Insensitivity Syndromes in humans. In *Molecular Genetic of Sex Determination*. Cap. 15. Wachtel, S. S. (Ed.). Academic Press, pp. 341-365.
- Pirker, S., Schwarzer, A., Wieselthaler, A. Sieghart, W. and Sperk, G. (2000): GABA_A receptor: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. Vol. 101, No 4, pp. 815-850.
- Planas, B., Kolb., P. E., Raskind, M. A. and Miller, M. A. (1994): Galanin in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and Medial Amygdala of the rat: lack of sexually dimorphism despite regulation of gene expression across puberty. *Endocrinology*. Vol. 134, No 5, pp. 1999-2004.
- Planas, B., Kolb., P. E., Raskind, M. A. and Miller, M. A. (1995): Sex differences in

- coexpression by Galanin neurons accounts for sexual dimorphism of vasopressin in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Endocrinology*. Vol. 136, No 2, pp. 727-733.
- Plassart-Shiess, E. and Baulieu, E.-E. (2001): Neurosteroids: recent findings. *Brain Research Reviews*. Vol. 37, pp. 133-140.
- Platek, S. M., Burch, R. L., Gallup, G. G. (2001): Sex differences in olfactory self-recognition. *Physiology and Behavior*, Vol. 73, pp. 635-640.
- Poletti, A., Celotti, F., Rumio, C., Rabuffetti, M., Martini, L. (1997): Identification of type 1 5 α -reductase in myelin membranes of male and female rat brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 129, pp. 181-190.
- Pohjanvirta, R., Juvonen, R., Karenlampi, S., Raunio, H. and Tuomisto, J. (1988): Hepatic Ah-receptor levels and the effect of 2-3-7-8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on hepatic microsomal monooxygenase activities in a TCDD-susceptible and -resistant rat strain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 92, pp. 131-140.
- Poletti, A., Coscarella, A., Negri-Cesi, P., Colciago, A., Celotti, F. and Martini, L. (1998a): 5 α -reductase isoenzymes in the central nervous system. *Steroids*. Vol. 63, pp. 246-251.
- Poletti, A., Negri-Cesi, P., Rabuffetti, M., Colciago, A., Celotti, F., and Martini, L. (1998b): Transient expression of the 5 α -Reductase type 2 isoenzyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. *Endocrinology*. Vol., 139, No 4, pp. 2171-2178.
- Pompolo, S., and Harley, V. R. (2001): Localization of the SRY-related HMG box protein, SOX9, in rodent brain. *Brain Research*, Vol. 906, pp. 143-148.
- Powell, T. P. S., Cowan, W. M. and Raisman, G. (1965): The central olfactory connections, *J. Anat.*, Vol. 99, pp. 791-813.
- Powers, B. and Valenstein, E. S. (1972): Sexual receptivity: facilitation by mediating sexual behavior in female rats. *Science*. Vol. 187, pp. 1003-1005.
- Prasad, B. C. and Reed, R. R. (1999): Chemosensation molecular mechanism in worms and mammals. *TIG* April, 1999, Vol. 15, No 14, pp 150-153.
- Purvis, K., Clausen, O. P. and Hansson, V. (1978): Decreased Leydig cell responsiveness in the testicular feminized male rat. *Endocrinology*. Vol. 102, April, pp. 1053-1060.

Q

- Quadros, P. S., Pfau, J. L., Goldstein, A. Y. N., De Vries, G. J. and Wagner, C. K. (2002): Sex differences in Progesterone Receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology*. Vol. 143, No. 10, pp. 3727-3739.
- Quarmby, V. E., Yarbrough, W. G., Lubahn, D. B., French, F. S. and Wilson, E. M. (1990): Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Molecular Endocrinology*. Vol. 4, pp. 22-28.
- Quigley, C. A., De Bellis, A., Marschke, K. B., El-Awady, M. K., Wilson, E. M. and French, F. S. (1995): Androgen Receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocrinology Reviews*. Vol. 16, No 3, pp. 271-321.

R

- Raab, H., Beyer, C., Wozniak, A., Hutchison, J. B., Pilgrim, C. and Reisert, I. (1995): Ontogeny of aromatase activity in the rat midbrain. *Molecular Brain Research*. Vol. 34, No 2, December 28, pp- 333-336.
- Racine, C., Rey, R., Forest, M. G. Louis F., Ferré, A., Huhtaniemi, I., Josso, N. and Di Clemente, N. (1998): Receptors for anti-Müllerian hormones on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, January, pp. 594-599.
- Rainnie, D. G. (1999): Neurons of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis (NEST): electrophysiological properties and their response to serotonin. *Annals of the New York Academy Sciences*. Vol. 877, pp. 695-699.
- Raisman, G. (1972): An experimental study of the projection of the Amygdala to the Accessory Olfactory Bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system. *Experimental Brain Research*. Vol 14, pp. 395-408.
- Raisman, G., and Field, P. M. (1973): Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Research*, Vol. 54, pp. 1-29.
- Rajendren, G. and Dominic, C. J. (1986): Effect of bilateral transection of the lateral olfactory tract on the male-induced implantation failure (the Bruce effect) in mice. *Physiol. Behav.* Vol. 36, pp. 587-590.
- Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Graem, N., Müller, J., Cate, R. L. and Skakkebaek, N. E. (1999): Expression of Anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Vol. 84, No 10, pp. 3836-3844.

- Rand, M. N. and Breedlove, S. M. (1992): Androgen locally regulates rat bulbocavernosus and Levator Ani size. *Journal of Neurobiology*. Vol. 23. No 1, pp. 17-30.
- Reburn, C. J. and Wynne-Edwards, K. E. (1999): Hormonal changes in males of naturally biparental and uniparental mammal. *Hormones and Behavior* Vol. 35, pp. 163-176.
- Reisert, I. and Pilgrim, C. (1991): Sexual differentiation of monoaminergic neurons-genetic or epigenetic?. *TINS*. Vol. 14, No 10, pp. 468-473.
- Reisert, I., Karolczak, M., Beyer, C., Just, W., Maxson, S. C. and Ahret, G. (2002): *Sry* does not fully sex-reverse female into male behavior toward pubs. *Behavior Genetics*. Vol. 32, No 2, March 1, pp. 103-111.
- Rey, R., Lordereau-Richard, I., Carel, J-C., Barbet, P., Cate, R. L., Roger, M., Chaussain, J-L., and Josso, N. (1993): Anti-Müllerian Hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious puberal development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 77, No 5, pp. 1220-1226.
- Rey, R., Mebarki, F., Forest, M. G., Mowszowicz, I., Cate, R. L., Moresl, Y., Chaussain, J-L., and Josso, N. (1994): Anti-Müllerian Hormone in children with Androgen Insensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 79, No 4, pp 960-964.
- Rey, R. (1998): Endocrine, paracrine and cellular regulation of postnatal Anti-Müllerian Hormone secretion by Sertoli cells. *TEMS*, Vol. 9, No 7, pp. 271-276.
- Rey, R., Belville, C., Nihoul-Fékété, C., Michel-Calemard, L., Forest, M. G., Lahlou, N., Jaubert, F., Mowszowicz, I., Davil, M., Saka, N., Bouvattier, C., Bertrand, A-M., Lecointre, C., Soskin, S., Cabrol, S., Crosnier, H., Léger, J., Lortat-Jacob, S., Nicolino, M., Rabl, W., Toledo, S. P. A., Bas, F., Gompel, A., Czernichow, P., Chatelain, P., Rappaport, R., Morel, Y. and Josso, N. (1999): Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum Antimüllerian Hormone measurement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 84, No 2, pp. 627- 631.
- Reynolds, J. and Keverne, E. B. (1979): The accessory olfactory system and its role in the pheromonally mediated suppression of oestrus in grouped mice. *J. Reprod. Fert.* Vol. 57, pp. 31-35.
- Rhees, R. W., Shryne, J. E. and Gorski, R. A. (1989): Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in male and female rats. *Developmental Brain Research*. Vol. 52, pp17-23.

- Rhees, R. W., Shryne, J. E. and Gorski, R. A. (1990): Onset of the hormone-sensitive perinatal period for sexual differentiation of Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in female Rats. *Journal of Neurobiology*, Vol. 21, No 5, pp. 781-786.
- Rhoda, J., Corbier, P. and Roffi, J. (1984): Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of Testosterone to 17 β -estradiol. *Endocrinology*. Vol. 114, No 5, pp. 1754-1760.
- Rissman, E. F., Wersinger, S. R., Taylor, J. A. and Lubah, D. B. (1997a): Estrogen Receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Hormones and Behavior*. Vol. 31, No 3, pp. 232-243.
- Rissman, E. F., Early, A. H., Taylor, J. A., Korach, K. S. and Dennis, B. L. (1997): Estrogen Receptors are essential for female sexual receptivity. *Endocrinology*. Vol. 138, No 1, pp.507-510.
- Ris-Stalpers, C., Kruiper, G. G. J. M., Faber, P. W., Schweikert, H. U., Van Rooij, H. C. J., Zegers, N. D., Hodgins, M. B., Degenhart, H. J., Trapman, J. and Brinkmann, A. O. (1990): Aberrant splicing of Androgen Receptor mRNA results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 87, October, pp. 7866-7870.
- Ritzen, E. M., Nayfeh, S. N., French, F. S. and Aronin, P. A. (1972): Deficient nuclear uptake of testosterone in the androgen-insensitivity (Stanley-Gumbreck) pseudohermafrodite male rat. *Endocrinology*, Vol. 91, July, pp. 116-124.
- Robertson, K. M., O'Donnell, L., Jones, M. E., Meachem, S. J., Boon, W. C., Ficher, C. R., Graves, K. H., McLachlan, R. I. and Simpson, E. R. (1999): Impair of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp19*) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, July, pp. 7986-7991.
- Rochira, V., Balestrieri, A., Madeo, B., Baraldi, E., Faustini-Fustini, M., Granata, A. R. M. and Carani, C. (2001): Congenital estrogen deficiency: in search of the estrogen role in human male reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 178, pp. 107-115.
- Rodríguez-Zafra, M., De Blas, M. R., Pérez-Laso, C., Calés, J. M., Guillamón, A. and Segovia, A. (1993): Effects of perinatal Diazepam exposure on the sexually dimorphic rat *Locus Coeruleus*. *Neurotoxicology and Teratology*. Vol. 15, pp. 139-144.
- Roselli, C. E. and Resko, J. A. (1984): Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism. *Endocrinology*, Vol. 114, pp. 2183-2189.
- Roselli, C. E., Salisbury, R. L., and Resko, J. A. (1987): Genetic evidence for androgen-dependent and independent control of Aromatase Activity in the rat brain. *Endocrinology*, Vol. 121, No 6, pp. 2205-2210.

- Roselli, C. E. (1991a): Synergistic induction of aromatase activity in the rat brain by estradiol and 5-alpha-dihydrotestosterone. *Neuroendocrinology*. Vol. 53, No 1, January 1, pp. 79-84.
- Roselli, C. E. (1991b): Sex differences in androgen receptors and aromatase activity in microdissected regions of the rat brain. *Endocrinology*. Vol. 128, pp. 1310-1316.
- Roselli, C. E. and Resko, J. A. (1993): Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* Vol. 44, No 4-6, March 44, pp. 499-508.
- Roselli, C. E., Klosterman, S. A., and Fasai, T. A. (1996): Sex differences in Androgen responsiveness in the rat brain: regional differences in the induction of Aromatase Activity. *Neuroendocrinology*. Vol. 64, pp. 139-145.
- Roselli, C. E. and Resko, J. A. (1997): Sex differences in androgen-regulated expression of Cytochrome P450 Aromatase in the rat brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* Vol. 61, No 3-6, pp. 365-374.
- Roselli, C. E., Abdelgadir, S. E., and Resko, J. A. (1997): Regulation of Aromatase gene expression in the adult rat brain. *Brain Research Bulletin*. Vol. 44, No 4, pp. 351-357.
- Roselli, C. E., and Klosterman, S. (1998): Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinology*. Vol. 139, No 7, pp. 3193-3201.
- Rosenblatt, J. S. (1967): Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science*, Vol. 156, pp. 1512-1514.
- Rosenfeld, J. M., Daley, J. D., Ohno, S. and Younglai, E. V. (1977): Central aromatization of testosterone in testicular feminized mice. *Experientia*, Vol. 33, No 10, October 15, pp. 1392-1393.
- Roos, J., Roos, M., Schaeffer, C. and Aron, C., (1988): Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 270, pp. 121.
- Roos, J., Roos, M., Schaeffer, C. and Aron, C. (1989): Prepubescent hormonal control of the development of Accessory Olfactory Bulbs in the male rat. *Brain Research Developmental Brain Research*, Vol. 47, June 1, No 2, pp. 309-312.
- Rouiller-Fabrer, V., Ca, S., Abou Merhi, R., Cate, R., Habert, R. and Vigier, B. (1998): Effect of Anti-Müllerian Hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal immature rats. *Endocrinology*. Vol. 139, No 3, pp. 1213-1220.
- Royet, J. P. (1991): Stereology: a method for analyzing images. *Progress in Neurobiology*. Vol. 37, pp. 433-474.

- Rupprecht, R. (1996): The neuropsychopharmacological potential of neuroactive steroids. *J. Psychiat. Res.* Vol. 31, No 3, pp. 297-314.
- Rupprecht, R. and Holsboer, F. (1999): Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychopharmacological perspectives. *TINS.* Vol. 22, No 9, pp. 410-416.
- Russel-Lindsay, J. (1979): Historical foundations. In: Baker, H. (Ed.). *The laboratory rat.* Accademic Press. New York, pp. 1-36.
- Russell, D. W. and Wilson, J. D. (1994): Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 63, pp. 25-61.
- Russell, J. A., Douglas, A. J. and Ingram, C. D. (2001): Brain preparation for maternity-adaptative changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Progress in Brain Research,* Vol. 133, pp. 1-38.

S

- Sachs, B. D. (1996): Penile erection in response to remote cues from females: albino rats severely impaired relative to pigmented strain. *Physiology and Behavior.* Vol. 60, September, No 30, pp. 803-808.
- Sadler, T. W. (1996): Langman: Embriología Médica. *Williams and Wilkins; Editorial Panamericana.* 7^a edición. pp. 255-292.
- Saito, T. R. and Moltz, H. (1986a): Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Physiol. Behav.* Vol. 37, pp. 507-510.
- Saito, T. R. and Moltz, H. (1986b): Sexual behavior in the female rat following removal of the vomeronasal organ. *Physiol. Behav.* Vol. 38, pp. 81-87.
- Saito, T. R. (1986): Induction of maternal behavior in sexually unexperienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Jpn. J. Vet. Sci.* Vol 48, pp. 1029-1030.
- Saito, T. R., Kamata, K., Nakamura, M. and Inaba, M. (1988): Maternal behavior in virgin females rats following removal of the vomeronasal organ. *Zool. Sci.* Vol. 5, pp. 1141-1143.
- Sánchez-Criado, J. E. (1979): Blockade of the phermonal effects in rat by central deafferentiation of the accesory olfactory system. *Rev. Española Fisiol.* Vol. 35, pp. 137-142.
- Sandler, T. W. (1995): Aparato urogenital. En *Langman, Embriología Médica.* Cap. 15, 3^a reimpresión, 1998, Panamericana, México, pp. 255-291.

- Saper, C. B., Swanson, L. W. and Cowan, W. M. (1976): The efferent connections of the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 169, pp. 409-442.
- Saper, C. B. (1996): Any way you cut it: a new journal policy for the use of unbiased counting methods. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol. 364, p. 5.
- Sastry, P. S. and Rao, K. S. (2000): Apoptosis and the Nervous System. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 74, No 1, pp. 1-20.
- Scalia, F. and Winans, S. S. (1975): The differential projections of the Olfactory Bulb and Accessory Olfactory Bulb in mammals. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 161, pp. 31-53.
- Schamhorst, V., van der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (2001): WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*, Vol. 273, pp.141-161.
- Schmidt, B. M. W., Gerdes, D., Feuring, A., Falkenstein, E., Christ, M. and Wehling, M. (2000): Rapid, nongenomic steroid actions: a new age? *Frontiers in Neuroendocrinology*. Vol. 21, pp. 57-94.
- Schulkin, J. (1999): Corticotropin-releasing hormone signals adversity in both the placenta and the brain: regulation by glucocorticoids and allostatic overload. *Journal of Endocrinology*. Vol. 161, pp. 349-356.
- Schulz, D., and Canbeyli, R. S. (2000): Lesion of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis enhances learned despair. *Brain Research Bulletin*. Vol. 52, No 2, pp. 83-87.
- Schumacher, M., Robel, P., Baulieu, E-E. (1996): Development and regeneration of the Nervous System: a role for neurosteroids. *Dev Neurosci*. Vol. 18, pp. 6-21.
- Schumacher, M., Guennoun, R., Mercier, G., Desarnaund, F., Lacor, P., Benavides, J., Ferzaz, B., Robert, F. and Baulieu, E. (2001): Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Research Reviews*. Vol. 37, pp. 343-359.
- Scott, J. W. and Leonard, C. H. (1971): The olfactory connections of the lateral hypothalamus in the rat, mouse and hamster. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 131, pp. 331-334.
- Segarra, A. C. and McEwen, B. S. (1991): Estrogen increases spine density in ventromedial hypothalamic neurons of peripuberal rats. *Neuroendocrinology*, Vol. 54, October, No 4, pp. 365-372.
- Segovia, S., Orensanz, L. M., Valencia, A., and Guillamón, A. (1984a): Effects of sex steroids on the development Accessory Olfactory Bulb in the rat: a volumetric study. *Brain Research*. Vol. 318, November 1, No 2 pp. 312-214.

- Segovia, S., Paniagua, R. Nistal, M. d Guillamón, A. (1984b): Effects of postpuberal gonadectomy on the neurosensorial epithelium of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Research*. Vol. 316, June 1, No 2, pp. 289-291.
- Segovia, S., Valencia, A., Calés, J, M. and Guillamón, S. (1986): Effects of sex steroids on the development of two granular cell subpopulation in the rat Accessory Olfactory Bulb. *Developmental Brain Research*. Vol. 30, pp. 283-286.
- Segovia, S., Valencia, A. y Guillamón, A. (1988): Diferenciación sexual del sistema nervioso. En *Psicobiología del Desarrollo*. Segovia, S. y Guillamón, A. (Eds.). Ariel. Barcelona, 4ª reimpresión, 1998, pp. 80-112.
- Segovia, S., Pérez-Laso, C., Rodríguez- Zafra, M., Calés, J.M., Del Abril, A., De Blas, R., Collado, P., Valencia, A., Guillamón, A. (1991): Early postnatal diazepam exposure alters sex differences in the rat brain. *Brain Research Bulletin*. Vol. 26, pp. 899-907.
- Segovia, S., del Cerro, M. C., Ortega, E., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., P. Izquierdo, MA. and Guillamón A. (1996): Role of GABA_A receptors in the organization of brain and behavioural sex differences. *NeuroReport*, Vol. 7, pp. 2552-2557.
- Segovia, S., Guillamón, A., Cerro, M.C., Ortega, F., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., Beyer, C. (1999): The development of brain sex differences: a multisignaling process. *Behavioural Brain Research*. Vol. 105, pp. 69-80.
- Segovia, S., y Guillamón, A. (1982): Effects of sexual steroids on the development of the Vomeronasal Organ in the rat. *Developmental Brain Research*. Vol. 5, pp. 209-212.
- Segovia, S. and Guillamón, A. (1986): Effects of sex steroids on the development of the Vomeronasal system in the rat. In *Ontogeny of olfaction. Principles of olfactory maturation in vertebrates*. Breipohl, W., Apfelbach, R., Kremer, M., Key, B. and Rauwolf, M. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 35-41
- Segovia, S. and Guillamón, A. (1993): Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Research Reviews*. Vo 18, pp. 51-74.
- Segovia, S. and Guillamón, A. (1996): Sexual dimorphism in the CNS and the role of teroids. *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators Neuroactive Steroids*. CRC Press, pp. 127-152.
- Sengelaub, D. R., Jordan, C. L., Kurz, E. M. and Arnold, A. P. (1989): Hormonal control of neuron number in sexually dimorphic spinal nuclei of the rat: II. Development of the spinal nucleus of the bulbocavernosus nucleus in androgen-insensitivity (Tfm) rats. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 280, No 4, February 22, pp. 630-636.

- Shammah-Lagnado, S. J., Beltramino, C. A., McDonald, A. J., Miselis, R. R., Yang, M., De Olmos, J., Heimer, L., Alheid, G. (2000): Supracapsular Bed Nucleus of the Stria Terminalis contains Central and Medial extended Amygdala elements: evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 422, pp. 533-555.
- Shapiro, B. H., Levine, D. C. and Adler, N. T. (1980): The testicular feminized rat: a naturally occurring model of androgen independent brain masculinization. *Science*. Vol. 209, No 4454, July 18, pp. 418-420.
- Sher, C. and Shohat, M. (1997): Congenital deficiency of AFP and Down syndrome screening. *Prenat. Diagn.* Vol. 883, pp. 884-885.
- Sherindan, P. J. (1979): The nucleus interstitialis striae terminalis and the nucleus amygdaloideus medialis: prime target for androgen in the rat forebrain. *Endocrinology*. Vol. 194, pp. 130-136.
- Shughrue, P. J., Bushnell, C. D. and Dorsa, D. M. (1992): Estrogen Receptor Messenger Ribonucleic Acid in female rat during estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology*. Vol. 131, No 1, pp. 381-388.
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Franklan, P. W. and Kida, S. (1998): CREB and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* Vol. 21, pp. 127-148.
- Simerly, R. B., Swanson, L. and Gorski, R. (1984): Demonstration of a sexual dimorphism in the distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the Medial Preoptic Nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 225, pp. 151-166.
- Simerly, R. B. and Swanson, L. W. (1986): The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 246, pp. 76-95.
- Simerly, R. B., Chang, C., Muramatsu, M. and Swanson, L. W. (1990): Distribution of Androgen and Estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 294, April, No 1, pp. 76-95.
- Simerly, R. B., Zee, M. C., Pendleton, J. W., Lubahn, D. B. and Korach, K. S. (1997): Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of the dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 94, pp. 14077-14082.
- Simerly, R. B. (1998): Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behavioural Brain Research*. Vol. 92, pp. 195-203.
- Simerly, R. B. (1999): Development of sexually dimorphic forebrain pathways. In *Sexual Differentiation of the Brain*. Matsumoto, A. (Ed.). CRC Press LLC, 1999. Boca Raton, Florida. pp. 175-202.

- Singh, M., Sétáló, G., Guan, X., Frail, D. F. and Toran-Allerand. (2000): Estrogen-induced activation of the Mitogen-activated Protein Kinase cascade in the cerebral cortex of Estrogen Receptor- α -Knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 20, No 5, March 1, pp. 1694-1700.
- Smith, C. L., Oñate, S. A., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1996): CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, August, pp. 8884-8888.
- Snell, R. S. (1994): Neuroanatomía Clínica. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, pp. 186-193.
- Sorensen, D. B., Ladewig, J. and Lawson, G. (2001): The influence of strain on demands functions for water in rats (*Rattus Norvegicus*). *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* Vol. 28, No 1, pp. 1-9.
- Spencer, H. G., Feldman, M. and Clark, A. G. (1998): Genetic conflicts, multiple paternity and the evolution of genomic imprinting. *Genetics*, Vol. 148, February, pp. 893-904.
- Sriraman, V., Niu, E., Matias, J. R., Donahoe, P. K., Maclaughlin, D. T., Hardy, M. P. and Lees, M. M. (2001): Müllerian Inhibiting Substance testosterone synthesis in adult rats. *Journal of Andrology*. Vol. 22, No 5, September/October 2001, pp. 750-758.
- Stack, E. C., Balakrishnan, R., Numan, M. J. and Numan, M. (2002): A functional neuroanatomical investigation of the role of the Medial Preoptic Area in the neural circuits regulating maternal behavior. *Behavioural Brain Research*. Vol. 131. pp. 17-36.
- Stahl, S. M. (1998): Psicofarmacología esencia. Bases neurocientíficas y aplicaciones clínicas. Ariel.Barcelona, 1ª Edición, pp. 189-243.
- Stanley, A. J., Gumbreck, K. L. G., Allison, J. E., Easley, R. B. (1973): Male pseudohermaphroditism in the laboratory norway rat. *Recent. Prog. Horm. Res.* Vol. 29, January, pp. 43-64.
- Steckelbroeck, S., Watzka, M., Reichelt, R., Hans, V. H., Stoffel-Wagner, B., Heidrich, D. D., Schramm, J., Bidlingmaier, F. and Klingmüller, D. (2001): Characterization of the 5 α -reductase-3 α -hydroxysteroid dehydrogenase complex in the human brain. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 86, No 3, pp. 1324-1331.
- Stefanova, N. , Bozhilova-Pastirova, A., and Ovtcharoff, V. (1998): Sex and age differences of the neurons expressing GABA-Immunoreactivity in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Int. J. Devl. Neuroscience*. Vol. 16 , No 6, pp. 443-448.

- Stefanova, N. and Ovtcharoff, W. (2000): Sexual dimorphism of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and the Amygdala. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*. Vol. 158, pp. 1-78.
- Sterio, D. C. (1984): The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using disector. *Journal of Microscopy*. Vol. 134, Pt2, May, pp. 127- 136.
- Stern, J. M. and Lonstein, J. S. (2001): Neural mediation of nursing and related maternal behavior. In *Progress in Brain Research*. Russell, J. A., Douglas, A. J., Windle, R. J. and Ingram, C. D. (Eds.). Cap. 19, pp. 263-278.
- Stern, K. and McClintock, M. (1998): Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature*, Vol. 392, pp. 553-560.
- Sternberg, W. F. and Mogil, J. F. (2001): Genetic and hormonal basis of pain states. *Best Practise and Research Clinical Anaesthesiology*. Vol. 15, No 2, pp. 229-245.
- Stover, E. P., Krishnan, A. V. and Feldman, D. (1987): Estrogen down-regulation of androgen receptors in cultured mammary cancer cells (MCF-7). *Endocrinology*, Vol. 120, June, No 6, pp. 2597-2603.
- Streit, W. J. and Kincaid-Colton, C. (1996): El sistema inmunitario del cerebro. *Investigación y Ciencia*, enero, pp. 16-21.
- Stricker, E. M. and Verbalis, J. G. (1991): Caloric and non caloric controls of food intake. *Brain Research Bulletin*. Vol., 27, pp. 299-303.
- Struble, R. G. and Walters, C. P. (1982): Light microscopic differentiation of two population of rat olfactory bulb granule cells. *Brain Research.*, Vol. 236, pp. 237-251.
- Swaab, D. F. and Fliers, E. (1985): A sexually dimorphic nucleus in the human brain. *Science*, Vol. 228, pp. 1112-1114.
- Swanson, L. W. and Hartman, B. K. (1975): The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine- β -hydroxylase as a marker. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 163, pp. 467-506.
- Swanson, L. W. and Cowan, W. M. (1976): Autoradiographic studies of development and connections of the septal area in the rat. In *The Septal Nuclei*. De France, J. F. (Ed.), Plenum Press, New York, pp. 37-64.
- Swanson, L. W. and Cowan, W. M. (1979): The connections of the septal region in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 186, pp. 621-656.
- Swanson, L. W. and Petrovich, G. D. (1998): What is the amygdala? *TINS*. Vol. 21, No 8, pp. 323-331.

T

- Teixeira, J., Fynn-Thompson, E., Payne, A. H. And Donahoe, P. K. (1999): Müllerian-Inhibiting Substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. *Endocrinology*, Vol. 140, No 10, pp. 4732-4738.
- Tenbaum, S. and Baniahmad, A. (1997): Review. Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Vol. 29, No 12, pp. 1325-1341.
- Teskey, G. C., Hutchinson, J. E. and Kolb, B. (1999): Sex differences in cortical plasticity and behavior following Anterior Cortical kindling in rats. *Cerebral Cortex*. Vol. 9, Oct/Nov. pp. 675-682.
- Thornton, J. W. (2001): Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral Estrogen Receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *PNAS*. Vol. 98, No 10, May 8, pp. 5671-5676.
- Tirindelli, R., Mucignat-Caretta, C. and Ryba, N. J. (1998): Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *TINS*, vol 21, No 11, pp. 482-486.
- Tobet, S. A., Baum, M. J., Tang, H. B., Shim, J. H. and Canick, J. A. (1985): Aromatase activity in the perinatal rat forebrain: effects of age, sex and intrauterine position. *Developmental Brain Research*. Vol. 23, pp. 171-178.
- Tobet, S. A. and Fox, T. O. (1992): Sex differences in neuronal morphology influenced hormonally throughout life. In *Handobook of Behavioral Neurobiology. Sexual differentiation*. Vol. 11 Gerall, A. A., Moltz, H. and Ward, I. L. (Eds.) Plenum Press. New York , 1992, pp. 41-82.
- Tobin, A. M. and Payne, A. P. (1991): Perinatal androgen administration and the maintenaince of sexually dimorphic and nondimorphic lumbosacral motor neuron groups in female albino swiss rats. *J. Anat.* Vol. 177, pp. 47-53.
- Tomboc, M., Lee, P. A., Mitwally, M. F., Schneck, F. X., Bellinger, M. and Witchel, S. F. (2000): Insuline-like 3/relaxin-like factor gene mutations are asociated with cryptorchidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 85, No 11, pp. 4013- 4019.
- Torand-Allerand, C. D. (1984): On the genesis of sexual differentiation of the Central Nervous System: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of α -fetoprotein. *Progress in Brain Research*. Vol. 61, pp. 63-79.
- Torand - Allerand, C. D. (1986): Sexual differentiation of the brain. In *Developmental NeuroPsychobiology*. Cap. 6. Academic Press, pp. 175-210.

- Torand-Allerand, C. D. (1996a): The estrogen/neurotrophin connection during neural development: is co-localization of Estrogen Receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant? *Dev. Neurosci.* Vol. 18, January 1, No 1-2, pp. 36-48.
- Torand-Allerand, C. D. (1996b): Mechanism of Estrogen action during development: mediating by interactions with the neurotrophins and their receptors? *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* Vol. 56, No 1-6, pp. 169-178.
- Traggiai, C. and Stanhope, R. (2002): Delayed puberty. *Best Practise and Research Clinical Endocrinology and Metabolism.* Vol. 16, No 1, pp. 139-151.
- Trotier, D., Eloit, C., Wassef, M., Talmain, G., Bensimon, J. L., Døving, K. B. and Ferrard, J. (2000): The Vomeronasal cavity in adult humans. *Chem. Senses.* Vol. 25, pp. 369-380.
- Truss, M. and Beato, M. (1993): Steroid hormone receptor: interaction with Deoxyribonuclei Acid and transcription factors. *Endocrine Reviews.* Vol. 14, No4, pp. 459-479.
- Tsusuo, Y., Ishimura, K., Fujita, H. and Osawa, Y. (1994): Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the brain during pre- and postnatal development. *Cell Tissue Research.* Vol. 278, No 1, October 1, pp. 29-39.
- Tsuruo, Y., Miyamoto, T., Yokoi, H., Kitagawa, K., Futaki, S. and Ishimura, K. (1996): Immunohistochemical presence of 5 α reductase rat type1-containing cells in rat brain. *Brain Research.* Vol. 722, pp. 207-211.
- Turner, R. T., Riggs, L. and Spelsberg, T. C. (1994): Skeletal effects of Estrogen. *Endocrine Review.* Vol. 15, No 3, pp. 275-300.

V

- Vaccarezza, O. L., Sepich, L. N. and Tramezzani, J. H. (1981): The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.* Vol. 132, March1, Pt 2, pp. 167-185.
- Vaiman, D. and Pailhoux, E. (2000): Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *TIG.* Vol. 16, November, No 11, p. 488-494.
- Valencia, A., Segovia, S., Guillamón, A. (1986): Effects of sex steroids on the development of the Accessory Olfactory Bulb mitral cells in the rat. *Developmental Brain Research.* Vol. 24, pp. 287-290.
- Valencia, A., Collado, P., Calés, J.M., Segovia, S., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., Guillamón, A. (1992): Postnatal administration of Dihydrotestosterone to the male rat abolishes sexual dimorphism in the Accessory Olfactory Bulb: a volumetric study. *Developmental Brain Research.* Vol. 68, pp 132-135.

- Valentine, G. H. (1968): Anomalías cromosómicas en la mujer. En: *Cromosopatías humanas: Introducción para el clínico*. Barcelona, Elicien, pp. 121-125.
- Valcourt, R. J. and Sachs, B. D. (1979): Penile reflexes and copulatory behavior in male rats following lesions in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Brain Research Bulletin*. Vol. 4, pp. 131-133.
- Vandenbergh, J. G. (1969): Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology*. Vol. 84, pp. 95-112.
- Vanderschueren, D., Van Herck, E., Suiker, A. M. H., Visser, W. J., Schot, L. P. C. and Bouillon, R. (1992): Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. *Endocrinology*. Vol. 130, No 5, pp. 2906-2916.
- Vanderschueren, D., Van Heck, E., Suiker, A. M., Visser, W. J., Schot, L. P., Chung, K., Lucas, R. S., Einhorn, T. A. and Bouillon, R. (1993): Bone and mineral metabolism in the androgen-resistant (testicular feminized) male rat. *J. Bone Miner. Res.* Vol. 8, No 7, pp. 801-809.
- Vanderschueren, D., Van Herck, E., Geusens, P., Visser, W., Chung, K. and Bouillon, R. (1994): Androgen resistance and deficiency have different effects on the growing skeleton of the rat. *Calcif. Tissue Int.* Vol. 55, No 3, September 1, pp. 198-203.
- Vankova, M., Boyer, P. A., Leviel, V. and Arluison, M. (1996): Opposite changes in the expression of Enkephalin in the Amygdala and Hypothalamus after lesion of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the rat. *Neuroscience*. Vol. 74, No 1, pp. 219-235.
- Vasudevan, N., Kow, L. M. and Pfaff, D. W. (2001): Early membrane estrogenic effects required for full expression of slower genomic actions in a nerve cell line. *PNAS*. Vol. 98, No21, October 9, pp. 12267-12271.
- Veitia, R. A., Salas-Cortés, L., Ottolenghi, C., Pailhoux, E. Cotinot, C., Fellous, M. (2001): Testis determination in mammals: more questions than answers. *Molecular and Cellular Endocrinology* Vol. 179, pp. 3-16.
- Vetulani, J., Nalepa, I. and Popik, P. (1991): Strain differences in changes in some parameters of cerebral cortical adrenergic system following chronic imipramine administration to rats. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* Vol. 43, May-June, No 3, pp. 187-195.
- Vinaders-Caerols, C., Collado, P., Segovia, S. and Guillamón, A. (2000): Estradiol masculinizes the Posteromedial Cortical nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Research Bulletin*. Vol. 53, No 3, pp. 269-273.
- Vidal, V. P., Chamboissier, M. C., de Rooij, D. G. and Scheld, A. (2001): Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet.* Vol. 28, July, pp. 216-217.
- Vigier, B., Tran, D., Legeai, L., Bézard, J. and Josso, N. (1984): Origin of anti-Müllerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J. Reprod. Fertil.* Vol. 70, pp. 473-479.

- Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D. and Josso, N. (1987): Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development*. Vol. 100, pp. 43-55.
- Vigier, B., Forest, M. G., Eychenne, B., Bezard, J., Garrigou, O., Robel, P. and Josso, N. (1989): Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc Natl Acad Sci. USA*. Vol. 86, May, No 10, pp. 3684-3688.
- Vigier, B., Tran, D., Legeai, L., Bézard, J. and Josso, N. (1994): Origin of Anti-Müllerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J. Reprod Fertil*. Vol. 70, pp. 473-479.
- Vinaders-Caerols, C., Collado, P., Segovia, S., y Guillamón, A. (1998): Sex differences in the Posteromedial Cortical Nucleus of the Amygdala in the rat. *NeuroReport*. Vol. 9, pp. 2653-2656.
- W**
- Wachtel, S. S. (1977): H-Y Antigen and the denetics of sex determination. *Science*, Vol. 198, November, pp. 797-799.
- Wagner, C. K., Nakayama, A. Y. and De Vries, G. J. (1998): Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology*. Vol. 139, No 8, pp. 3658-3661.
- Walker, J. R., Ahmed, S. H., Gracy, K. N. and Koob, G. F. (2000): Microinjections of an opiate receptor antagonist into de Bed Nucleus of the Stria Termialis supress heroin self-administration in dependent rats. *Brain Research*. Vol. 854, pp. 85-92
- Walton, M., Woodgate, A., Muravlev, A., Xu, R., During, M. J. and Dragunow, M. (1999): CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 73, No 5, pp. 1836-1843.
- Wang, L., Andersson, S., Warner, M. and Gustafsson, J. A. (2001): Morphological abnormalities in the brains of Estrogen Receptor β knock out mice. *PNAS*. Vol. 98, No 5, February 27, pp. 2792-2796.
- Ward, O. B. (1992): Prenatal flutamide alters sexually dimorphic nuclei in the spinal cord of male rats. *Brain Research*. Vol. 578, pp. 69-74.
- Wasowicz, M., Morice, C., Ferrari, P., Callebert, J. and Versaux-Botteri, C. (2002): Long-term effects on light damage on the retina of albino and pigmented rats. *IOVS*, Vol. 43, No 3, pp. 813-820.
- Watson, N. V., Freeman, L. M. and Breedlove, S. M. (2001): Neuronal size in the Spinal Nucleus of the Bulbocavernosus: direct modulation by androgen in rats with mosaic Androgen Insensitivity. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 21, Frebruary 1, No 3, pp. 1062-1066.

- Weidemann, I. P. W., Romalo, G., Knorr, D., Schweikert, H-U., Spindler, K. D. (1999): An androgen receptor mutation in the direct vicinity of the proposed C-terminal α -helix of the ligand binding domain containing the AF-2 transcriptional activating function core is associated with complete androgen insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 148, pp. 47-53.
- Weller, K. L. and Smith, D. A. (1982): Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Research*. Vol. 232, pp. 255-270.
- Wertz, K., Herrmann, B. G. (2000): Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mechanism of Development*. Vol. 98, pp. 51-70.
- West, M. J. and Gundersen, H. J. G. (1990): Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*. Vol 296. pp. 1-22.
- West, M. J., Slomianka, L. and Gundersen, H.J.G. (1991): Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*. Vol. 231, pp. 482-497.
- West, M. J. (1993): New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging*. Vol 14, pp. 275-285.
- West, M. J. (1994): Advances in the study of age-related neuron loss. *Semin. Neurosci.* Vol. 6, pp. 403-411.
- West, M. J. (1999): Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *TINS*, Vol. 22, No 2, pp. 51-61.
- West, M. J. and Slomianka, L. (2001): 2d versus 3d cell counting: a debate. What is an optical disector? *TRENDS in Neurosciences*. Vol 24, No 7, p. 374.
- Whalen, R. E. (1974): Sexual differentiation: models, methods and mechanisms. In *Sex Differences in Behavior*. R. C. Friedman, R. M. Richart and R. L. Vande Wiele (Eds) John Wiley and Sons. New York. pp. 467-488.
- Whitten, W. K. (1959): Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *Journal of Endocrinology* Vol. 18, pp. 102-107.
- Wilson, E. O. (1980): Sociobiología: la nueva síntesis. Omega, Barcelona, 1980.
- Wilson, J. G. (1943): Reproductive capacity of adult female rats treated prepuberally with estrogenic hormone. *Anat. Rec.* Vol. 86, pp. 341-359.
- Wilson, J. D., Griffin, J. E., Russell, D. W. (1993): Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews*. Vol. 14, No 5, pp. 577-593.

- Wilson, J. D. and McPhaul, M. J. (1994): A and B forms of the Androgen Receptor are present in human genital fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91, pp. 1234-1238.
- Wilson, J. D. (1999): The role of androgens in male gender role behavior. *Endocrinology Reviews*. Vol. 20, No 5, pp. 726-737.
- Winans, S. S. and Scalia, F. (1970): Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Science*. Vol. 170, pp. 330-332.
- Wisniewski, A. B. (1998): Sexually dimorphic patterns of cortical asymmetry, and the role for sex steroid hormones in determining cortical patterns of lateralization. *Psychoneuroendocrinology*, Vol. 23, No. 5, pp. 519-547.
- Wong, C.C., W.H. Poon, T.Y. Tsim, Eugene Y.K. Wong, M.S. Leung (2000): Gene expressions during the development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats. *Developmental Brain Research*. Vol. 119, pp. 187-194.
- Wolstenholme, J., White, I., Sturgiss, S., Carter, J., Plant, N. and Goodship, J. A. (2001): Maternal uniparental heterodisomy for chromosome 2: detection through "atypical" maternal AFP/hCG levels, with an update on a previous case. *Prenat. Diagn.* Vol. 21, pp. 813-817.
- Woolfolk, D. R. and Holtzman, S. G. (1995): Rat strain differences in the potentiation of morphine-induced analgesia by stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Vol. 51, No 4, pp. 699-703.
- Woolley, C., Weiland, N. G., McEwen, B. S. and Schwartzkroin, P. A. (1997): Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 17, No 5, March 1, pp. 1848-1859.
- Wunderle, V. M., Critcher, R., Hastier, N., Goodfellow, P. N. and Schedl, A. (1998): Deletion of long-range regulatory elements upstream of *SOX9* causes campomelic dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, September, pp. 10649-10654.
- Wysocki, C. J. (1979): Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* Vol. 3, pp. 301-341.
- Wysocki, C. J. Nyby, J., Whitney, G. Beauchamp, G. K. and Katz, Y. (1982): The vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiol. Behav.*, Vol. 29, pp. 325-327.
- Wysocki, C. J. Katz, Y. and Bernhard, R. (1983): The male vomeronasal organ mediates female-induced testosterone surges. *Biol. Reprod.* Vol. 28, pp. 917-922.

Wysocki, C. J. and Meredith, M. (1987): The vomeronasal system. In *Neurobiology of Taste and Smell*, Finger, T. E. and Silver, W. L., (Eds.) John Wiley, New York, 1987.

X

Xu, J., Burgoyne, P. S. and Arnold, A. P. (2002): Sex differences in sex chromosome expression in mouse brain. *Human Molecular Genetics.*, Vol. 11, No 12, pp. 1409-1419.

Y

Yang, C. C. and Bradley, W. E. (1999): Somatic innervation of the human bulbocavernosus muscle. *Clinical Neurophysiology*. Vol. 110, (1999), pp. 412-418.

Yarbrough, W. G., Quarmby, V. E., Simental, J. A., Joseph, D. R., Sar, M., Lubahn, D. B., Olsen, K. L., French, F. S., and Wilson, E. M. (1990): A single base mutation in the Androgen Receptor gene causes androgen insensitivity in the Testicular Feminized Rats. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 265, No 15, May 25, pp. 8893-8900.

Yoshida, M., Yuri, K., Kizaki, Z., Sawada, T. and Kawata, M. (2000): The distribution of apoptotic cells in the Medial Preoptic Areas of male and female neonatal rats. *Neuroscience Research*. Vol. 36, pp. 1-7.

Young, W. C., Goy, R. and Phoenix, C. (1964): Hormones and sexual behavior. Broad relationships exist between the gonadal hormones and behavior. *Science*. Vol. 143, pp. 212-218.

Yuan, H., Bowlby, D. A., Brown, T. J., Hochberg, R. B. and McLusky, N. J. (1995): Distribution of occupied and unoccupied Estrogen Receptors in the rat brain: effects of physiological gonadal steroids exposure. *Endocrinology*. Vol. 136, No 1, pp. 96-105.

Z

Zhang, L., Yoong H. Chang, Jeffery L. Barker, Qian Hu, Li Zhang, Dragan Maric, Bing-Sheng Li, David R. Rubinow. (2000): Testosterone and estrogen affect neuronal differentiation but not proliferation in early embryonic cortex of the rat: the possible roles of androgen and estrogen receptors. *Neuroscience Letters*. Vol. 281, pp. 57-60.

Zhou JN, Hofman MA, Gooren LJG, Swaab DF. (1995): A sex difference in the human brain and its relation to transsexuality. *Nature* 1995, Vol. 378, pp. 68-70.

Zhou, Y., Watters, J. J. and Dorsa, D. M. (1996): Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response elements binding protein in rat brain. *Endocrinology*. Vol. 137, No 5, pp. 2163-2166.

- Zhu, Y. S., Cai, L. Q., Cordero, J. J., Canovatchel, W. J., Katz, M. D. and Imperato-McGinley, J. (1999): A novel mutation in the CAG triplet region of exon 1 of Androgen Receptor gene causes complete androgen insensitivity syndrome in a large kindred. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 84, No 5, pp. 1590-1594.
- Zufall, F. and Munger, S. (2001): From odor and pheromone transduction to the organization of the sense of smell. *TRENDS in Neuroscience*. Vol. 24, No 4, April, 2001, pp. 191-193.
- Zucker, L. M. (1960): Two-way selection for body size in rats, with observations on simultaneous changes in coat color pattern and hood size. *Genetics*. Vol. 45, pp. 467-483.
- Zwain, I and Yen, S. C. (1999): Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cortex of rat brain. *Endocrinology*. Vol. 140, No 8, pp. 3843-3852.
- Zwieten, E. V., Ravid, R., Hoogendijk, W. J. and Swaab, D. F. (1994): Stable vasopressin innervation in the degenerating human locus coeruleus in Alzheimer's disease. *Brain Research*. Vol. 649, June 27, No 1-2, pp. 329-333.

