



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



Carrera de  
Doctorado en  
Neurociencias

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**TESIS DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS**

# **PARTICIPACIÓN DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL CEREBRO**

**Bióloga Carla Daniela Cisternas**

Directora: Dra. María Julia Cambiasso

Co-Director: Dr. Luis Miguel Garcia-Segura



Laboratorio de Neurofisiología  
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra  
INIMEC - CONICET - UNC  
Córdoba, Argentina

- 2015 -

## COMISIÓN ASESORA

Dra. María Julia Cambiasso

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET-UNC

Dpto. Biología Bucal, Facultad de Odontología, UNC

Dr. Daniel Hugo Mascó

Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas, IIBYT.

Dpto. Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC.

Dr. Mario Eduardo Guido

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC.

Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha: .....

Calificación: .....

## TRIBUNAL EVALUADOR

Firma: .....

Daniel Hugo Mascó

Firma: .....

Mario Eduardo Guido

Firma: .....

Gustavo Manuel Somoza

*Dedicado a la memoria de mi mamá  
Aunque pasen los años su constancia y sus enseñanzas me  
acompañan y fortalecen día a día.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A los Dres. Mario Guido y Daniel Mascó quienes formaron parte de la comisión asesora y del tribunal evaluador de esta tesis, por la buena predisposición que tuvieron siempre, por sus comentarios y aportes a lo largo de estos años. Por el compromiso con el que acompañaron este trabajo. Al Dr. Gustavo Somoza, evaluador externo del tribunal, por la buena predisposición y compromiso con el que acompañó la etapa final de evaluación de este trabajo, por la pertinencia de sus comentarios y correcciones.

A mi Directora, la Dra. María Julia Cambiasso, por recibirme en su laboratorio, acompañarme, corregirme y sobre todo nunca dejar de brindarse en estos cinco años. Porque enseña desde el ejemplo con la tenacidad y perseverancia que pone en sus proyectos. Por estar siempre pendiente de todos en el laboratorio aconsejando y ayudando en el trabajo diario de laboratorio. Por la confianza que depositó en mí estos años y sigue depositando, por brindar y ofrecer su ayuda cada vez que lo necesité. Por ser una fuente inagotable de ideas, por permitirme crecer y superarme. Por su cariño y los consejos brindados.

A mi Co-Director, el Dr. Luis Miguel Garcia Segura, por su gran amabilidad y calidez. Por estar siempre disponible cuando necesite ayuda y por acompañar este último trayecto de la tesis. Por recibirme en su laboratorio y por la confianza depositada en mí al permitirme trabajar estos meses. Por sus correcciones y aportes al trabajo diario en el laboratorio y a la escritura. Por brindar su experiencia y conocimientos sin retaceos y también por escuchar mis ideas.

A la Dra. María Ángeles Arévalo, por su sencillez y calidez. Por la ayuda brindada siempre que lo requerí, por sus consejos y aportes a mi trabajo en el laboratorio.

A quienes me guiaron y ayudaron en el estudio de la neuroanatomía del cerebro, la Dra. Laura Vivas, por su gran calidez y simpatía y la Dra. Soledad de Olmos por su disponibilidad para brindarme una mano siempre que lo necesité.

A quienes nos brindaron una gran ayuda cuando tuvimos que mudar la colonia de animales transgénicos del Instituto Ferreyra, la Dra. Gabriela Paglini y su laboratorio en el Instituto de Virología José María Vanella de la UNC por alojar a la colonia de

ratones y permitirme trabajar en su laboratorio durante casi un año y a Betty Haymal, por haber colaborado con nosotras en las derivaciones por histerectomía, por su gran dulzura y sencillez.

A mis compañeros de laboratorio Franco Mir y Julia Scerbo. A Franco por ser quien estuvo en el laboratorio cuando empecé y me brindo su ayuda siempre, por la paciencia y los consejos, por la buena onda inagotable. A Julia porque al llegar al laboratorio nos trajo toda su alegría y simpatía, su buena onda y energía también inagotable. A Lucas Cabrera Zapata, la nueva generación del laboratorio, por aguantarme en la última etapa del doctorado, por su simpatía y colaboración. Especialmente a Karina por su paciencia, por su dedicación y colaboración, por ser una gran compañía y ayuda para mí. También quiero agradecer a Betina Gonzalez por la inyección de buena onda en su breve pero significativo paso por el laboratorio y por la gran ayuda que me brindó con la PCR cuantitativa.

A quienes compartieron conmigo las largas jornadas laborales en el instituto, especialmente a las integrantes del laboratorio Vivas: Andrea Godino, Cinthia Porcari, Carolina Dalmasso y también a Fabiola Macchione y Soledad Coria por los lindos momentos compartidos, almuerzos, cenas, meriendas, etcétera. Especialmente a Ximena Caeiro por su gran paciencia y humildad y por guiarme en los primeros pasos del doctorado y a Florencia Dadam, por ser tan dulce y por ser además de una compañera de trabajo una gran amiga para mí estos años. También quiero agradecer a Florencia Sánchez por su cariño y amistad, por los mates compartidos, los consejos y por escucharme siempre.

A todos los miembros del Instituto Ferreyra y a quienes fomentan que el Instituto funcione como un gran equipo, porque siempre que necesite ayuda no tuve más que pedirla. Por las críticas constructivas y comentarios en los seminarios internos.

Al laboratorio C01 del Instituto Cajal: Ana López Rodríguez, Estefanía Acas Fonseca, Isabel Ruiz Palmero, Claudia Vieira Marques, Bruno Dutra Arbo, Ana Ortiz, Sa Mar Ghorbanpoor, Marcos Avila por recibirme en el laboratorio y ayudarme siempre en todo lo que necesité, por la buena onda y alegría que tienen siempre y especialmente a Virginia Sierra por ser una gran compañera, por su inagotable simpatía y buena onda.

A las autoridades del Instituto Ferreyra por haberme proporcionado las condiciones necesarias para desarrollar el presente trabajo.

A la cátedra A de Introducción a la Física y Química Biológicas especialmente a la Dra. Nelia Vermouth quien me guió en mis primeros pasos en la ciencia y a María Silvia Cadile por confiar en mí, brindarme su ayuda y apoyarme en estos años. También quiero agradecer a Pablo Fontanetti, Gerardo Theiler y Adriana Cismondi por su gran compañerismo y por aceptarme como miembro de la cátedra. Quiero agradecer también a la Dra. Mabel Brunotto por su incondicional ayuda con el análisis estadístico de los datos.

A las autoridades del Doctorado en Neurociencias, a Paula Otaiza y a todos los que hicieron posible que pueda defender la tesis en la fecha pautada.

A CONICET, por las becas otorgadas. Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por las ayudas de viaje con las que cubrí viaje y estadía los meses que estuve en Madrid.

A mi hermosa familia, por ser el pilar más importante de mi vida, porque funcionamos como un bloque unido e inquebrantable. A mi papá, por su gran sabiduría, consejos y optimismo inagotable. Por ser un gran ejemplo a seguir y por inculcarnos siempre la pasión al trabajo que elegimos. A mis hermanas Marcela y Silvana por entenderme con solo mirarme. Especialmente a José por su inagotable buena onda y Clelia por su dulzura y cariño, por ser la familia que elegí, porque se ganaron un lugar en mi corazón y por elegirme y aceptarme como familia.

A Sergio, mi compañero de vida, por alentarme siempre, por su casi inagotable paciencia, por escucharme y ayudarme a superar mis obstáculos, por estar siempre al lado mío.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5 $\alpha$ -Red:** enzima 5 $\alpha$ -reductasa
- AAA:** área amigdalina anterior
- AC:** núcleo central de la amígdala
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNasa:** desoxirribonucleasa
- AM:** núcleo medial de la amígdala
- AR:** receptor de andrógenos
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNasa:** ribonucleasa
- ARNm** ácido ribonucleico mensajero
- ARO-ir:** inmunoreactividad específica para aromatasa
- AVPV:** núcleo anteroventral periventricular del hipotálamo
- B27:** suplemento B27
- BSA:** albúmina sérica bovina
- BST:** núcleo del lecho de la estría terminalis
- Ct:** ciclo de PCR umbral en el cual se detecta una fluorescencia mayor a la basal
- CYP11A1:** enzima que escinde la cadena lateral de colesterol dependiente del citocromo P450
- CYP19A1:** aromatasa dependiente del citocromo P450
- DAB:** diaminobencidina
- DHEA:** dehidroepiandrostenediona
- DHT:** dihidrotestosterona
- DIV:** días *in vitro*
- D-MEM:** medio esencial mínimo modificado por Dulbecco
- dNTPs:** desoxirribonucleótidos
- DPN:** diarilpropiolnitrilo
- E16:** 16 días de gestación
- E2:** 17 $\beta$ -estradiol
- EDTA:** ácido etilen-diamino-tetracético
- ER- $\alpha$ :** receptor de estrógeno  $\alpha$
- ER- $\beta$ :** receptor de estrógeno  $\beta$
- F10:** D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino

**F12:** D-MEM / mezcla de nutrientes Ham F12

**FCG:** modelo de ratón de los cuatro genotipos

**G1:** agonista selectivo del receptor GPR30

**GPR30:** receptor de estrógeno asociado a proteína G en membrana plasmática

**HVM:** hipotálamo ventromedial

**LH:** hormona luteinizante

**MC:** medio condicionado por astroglia

**MPP:** 1,3-bis (4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidinil-etoxi) fenol]-1H-pirazol dihidrocloruro

**N2:** suplemento N2

**NB:** neurobasal

**Ngn3:** neurogenina 3

**NHS:** suero normal de caballo

**P10:** día posnatal 10

**PB:** buffer fosfato

**pb:** pares de bases

**PBS:** buffer fosfato salino

**PCR** reacción en cadena de la polimerasa

**qPCR:** PCR en tiempo real

**POA:** área pre-optica

**PPT:** propil-pirazol-triol

**RT:** reacción de retrotranscripción

**SF-1 KO:** ratones con una mutación nula para el factor esteroideogénico 1

**SNB:** núcleo espinal bulbocavernoso

**ST:** estría terminalis

**StAR:** proteína de la regulación aguda de la esteroideogénesis

**T:** Testosterona

**TA:** temperatura ambiente

**TBE:** buffer TBE

**wt:** *wild type*, cepa salvaje

**XXH:** hembra gonadal con complemento cromosómico XX

**XXM:** macho gonadal con complemento cromosómico XX

**XYH:** hembra gonadal con complemento cromosómico XY

**XYM:** macho gonadal con complemento cromosómico XY



## **LISTA DE GENES**

***Ar:*** gen que codifica para el receptor de andrógenos.

***Cyp11a1:*** gen que codifica para la enzima que escinde la cadena lateral de colesterol dependiente del citocromo P450.

***Cyp19a1:*** gen que codifica para la enzima aromatasa dependiente del citocromo P450.

***Esr1:*** gen que codifica para el receptor de estrógenos.

***Esr2:*** gen que codifica para el receptor de estrógenos.

***ngn3:*** gen que codifica para el factor de transcripción neurogenina 3.

***Srd5a1:*** gen que codifica para la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa tipo I.

***Srd5a2:*** gen que codifica para la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa tipo II.

***Sry:*** región determinante del sexo en el cromosoma Y.

**INDICE**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>1. LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL CEREBRO</b> .....	8
1.1. Efectos organizacionales y activacionales de los esteroides gonadales .....	9
1.2. Hipótesis de la aromatización y relevancia de la enzima aromatasa en la diferenciación sexual .....	11
1.3. Síntesis de esteroides en cerebro .....	13
1.4. La diferenciación sexual involucra al menos tres procesos independientes.....	16
1.5. La Diferenciación sexual afecta cuatro mecanismos clave .....	18
<b>2. DIFERENCIAS SEXUALES QUE NO SON EXPLICADAS POR LA ACCION ORGANIZADORA HORMONAL DURANTE EL DESARROLLO</b> .....	21
<b>3. LOS CROMOSOMAS SEXUALES COMO FACTORES PRIMARIOS EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL</b> .....	24
3.1. Diferencias sexuales causadas por el complemento cromosómico sexual .....	26
<b>4. EL ROL DE LA EPIGENÉTICA EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL</b> ....	28
<b>5. MODELO UNIFICADO DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL</b> .....	30
<b>HIPÓTESIS</b> .....	33
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	33
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
<b>1. MANTENIMIENTO Y CRÍA DE ANIMALES</b> .....	35

1.1. Animales transgénicos .....	35
1.1.1. Identificación de animales transgénicos .....	36
1.1.2. Purificación de ADN .....	37
1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa .....	37
1.1.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	38
<b>2. EXPRESIÓN DE AROMATASA .....</b>	<b>38</b>
2.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión de la proteína .....	38
2.1.1. Inmunohistoquímica en secciones de cerebro .....	39
2.1.1.1. Fijación .....	39
2.1.1.2. Procedimiento de inmunomarcación simple.....	39
2.1.1.3. Procedimiento de inmunomarcación doble.....	40
2.1.2. Análisis de las imágenes y cuantificación .....	40
2.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión del ARN mensajero de aromatasa y de otros genes implicados en la síntesis de neuroesteroides .....	41
2.2.1. Obtención de la muestra por la técnica del sacabocados o “punch”.....	41
2.2.2. Extracción de ARN .....	42
2.2.3. Digestión con ADNasa y cuantificación del ARN total .....	42
2.2.4. Transcripción reversa (RT-PCR) .....	43
2.2.5. Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR).....	43
2.3. Rol del ambiente hormonal en la regulación de aromatasa <i>in vitro</i> .....	45
2.3.1. Cultivo primario de amígdala .....	45
2.3.1.1. Disección .....	45
2.3.1.2. Disociación .....	46

2.3.1.3. Siembra y mantenimiento .....	46
2.3.1.4. Tratamientos experimentales .....	46
2.3.1.5. Extracción de ARN y RT-PCR.....	47
2.3.1.6. Cuantificación por qPCR.....	47
2.3.1.7. Esterilización de materiales y soluciones .....	48
<b>3. CRECIMIENTO AXONAL INDUCIDO POR 17<math>\beta</math>-ESTRADIOL .....</b>	<b>48</b>
3.1. Cultivo primario de HVM.....	48
3.1.1. Siembra y mantenimiento .....	48
3.1.2. Cultivos gliales .....	49
3.1.3. Tratamientos experimentales .....	49
3.1.4. Fijación .....	50
3.1.5. Inmunocitoquímica .....	50
3.1.6. Morfometría .....	51
<b>4. EXPRESIÓN DE Ngn3 .....</b>	<b>52</b>
4.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión sexualmente dimórfica de Ngn3.....	52
4.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la regulación de la expresión de Ngn3 por E2.....	52
4.2.1. Cultivo primario de HVM.....	52
4.2.2. Tratamientos experimentales .....	52
4.3. Receptores involucrados en la regulación de Ngn3 en neuronas hipotalámicas ..	53
4.3.1. Cultivo primario de HVM de embriones macho wt .....	53

4.3.2. Tratamientos experimentales .....	54
4.3.3. Extracción de ARN y RT-PCR.....	55
4.3.4. Cuantificación por qPCR.....	55
<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>56</b>
<b>6. MATERIALES UTILIZADOS .....</b>	<b>56</b>
6.1. Soluciones y buffers.....	56
6.2. Medios de cultivo.....	56
6.3. Antibióticos.....	57
6.4. Reactivos y enzimas.....	57
6.5. Anticuerpos .....	57
6.5.1. Anticuerpos primarios.....	57
6.5. 2. Anticuerpos secundarios .....	58
6.6. Agonistas y antagonistas.....	58
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
<b>1. EXPRESIÓN DE AROMATASA .....</b>	<b>60</b>
1.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión de la proteína .....	60
1.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión del ARN mensajero de aromatasa y de otros genes implicados en la síntesis de neuroesteroides .....	64
1.3. Rol del ambiente hormonal en la regulación de aromatasa <i>in vitro</i> .....	70
<b>2. CRECIMIENTO AXONAL INDUCIDO POR 17β-ESTRADIOL .....</b>	<b>75</b>
<b>3. EXPRESIÓN DE Ngn3 .....</b>	<b>77</b>

3.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión sexualmente dimórfica de Ngn3.....	77
3.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la regulación de la expresión de Ngn3 por E2.....	78
3.3. Receptores involucrados en la regulación de Ngn3 en neuronas hipotalámicas ..	79
<b>DISCUSIÓN</b> .....	82
<b>1. EXPRESIÓN DE AROMATASA</b> .....	84
<b>2. ACCIONES NEURITOGÉNICAS DE E2 EN NEURONAS HIPOTALÁMICAS</b> .....	90
<b>CONCLUSIONES</b> .....	95
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	99
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b> .....	124

## Participación de los cromosomas sexuales en la diferenciación sexual de cerebro

La diferenciación sexual del cerebro es un proceso irreversible que ocurre en un período crítico perinatal que en roedores se extiende desde el día embrionario 18 al día posnatal 10 (E18-P10). Durante este período la testosterona (T) gonadal y el estradiol (E2), producido por aromatización, masculinizan el cerebro de embriones macho a través de los receptores de andrógeno (AR) y de estrógeno (ER). Existen evidencias de diferencias sexuales antes del periodo crítico que no son causadas por la acción hormonal organizadora *in utero* y que podrían deberse a diferencias genéticas entre células XX y XY o a la interacción de factores hormonales y genéticos. Con el fin de discriminar entre efectos debidos al complemento cromosómico sexual y los debidos al ambiente hormonal en la determinación de diferencias sexuales se utilizó el modelo de ratón transgénico conocido como “*Four Core Genotype*” (FCG). Este modelo comprende machos gonadales XX y XY (XXM y XYM) y hembras gonadales XX y XY (XXH y XYH) por lo que se pueden evaluar diferencias entre individuos con distinto complemento cromosómico sexual que poseen el mismo fenotipo gonadal. Si bien no se puede negar el rol indiscutible de los esteroides gonadales en el dimorfismo sexual, el objetivo de la tesis fue analizar la participación relativa de los cromosomas sexuales y del estradiol en la determinación de las diferencias sexuales del cerebro. Se estudiaron tres características sexualmente dimórficas antes del período crítico : 1) la expresión de la enzima P-450 aromatasa en cerebro; 2) el crecimiento axonal inducido por estradiol *in vitro* y 3) la expresión génica de Neurogenina 3 (Ngn3) en neuronas de hipotálamo ventromedial.

En el modelo FCG se estudió la expresión de aromatasa y su regulación *in vitro* por un ambiente hormonal estrogénico o androgénico. Debido a que la acción organizadora de los esteroides sobre el cerebro depende de la presencia de sus receptores también se evaluó la expresión del receptor de estrógeno alfa (ER- $\alpha$ ) y del receptor de andrógenos (AR) en las regiones positivas para aromatasa. Los resultados mostraron que el cerebro de individuos XY (XYM y XYH) expresa mayores niveles de aromatasa (proteína y ARN mensajero) en la estría terminalis (ST) y el área amigdalina anterior (AAA) con respecto a individuos XX (XXM y XXH) independientemente del estatus gonadal (testículos-ovarios). Con respecto a la expresión de los receptores de hormonas esteroideas, el ER- $\alpha$  y el AR están presentes en estas regiones y su expresión depende del sexo gonadal (presencia del gen Sry). Es decir, el cerebro de embriones hembra

(XXH y XYH) presentó mayor expresión de ER- $\alpha$  en ST y AAA con respecto a las mismas regiones en machos gonadales (XXM y XYM). Por el contrario, la expresión de AR fue mayor en AAA de machos gonadales (XXM y XYM) con respecto a la misma región en las hembras (XXH y XYH). En este contexto, y con el fin de determinar si los cromosomas sexuales regulan la expresión de otras moléculas esteroideas en las regiones positivas para aromatasa se evaluó la expresión del ARN mensajero de las enzimas P450-scc y 5 $\alpha$ -reductasas I y II y del transportador de colesterol StAr. Los resultados indicaron que las regiones aromatasa-positivas expresan los genes estudiados a E16 (antes del periodo crítico) aunque su expresión no se encuentra regulada por factores debido a los cromosomas sexuales ni al sexo gonadal. Con el fin de estudiar el rol del ambiente hormonal en la regulación de la expresión de aromatasa se realizaron cultivos neuronales primarios de región amigdalina anterior y se evaluó por PCR cuantitativa el efecto del tratamiento con E2 o DHT sobre la expresión de aromatasa y de los receptores de estrógeno ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  y de AR. E2 y DHT incrementaron los niveles de aromatasa y ER- $\beta$  únicamente en cultivos XX (XXH y XXM) anulando las diferencias basales entre cultivos XX y XY.

Evidencias previas de nuestro laboratorio indican que las neuronas hipotalámicas hembra poseen mayor longitud axonal con respecto a neuronas provenientes de machos antes de haber estado expuestas a la acción organizadora de los esteroides *in vivo* y el tratamiento *in vitro* con E2 incrementa la longitud axonal de machos. Por otro lado la expresión del gen neuritogénico Ngn3 es mayor en cultivos de hembra con respecto a cultivos de macho y el agregado de E2 incrementa Ngn3 en machos. Se evaluó el rol del complemento cromosómico sexual sobre el efecto sexualmente dimórfico de E2 en el crecimiento axonal y la expresión de Ngn3 en neuronas de hipotálamo ventromedial de E15 *in vitro*. Los resultados obtenidos en cultivos transgénicos FCG indicaron que el complemento cromosómico sexual regula la expresión de Ngn3 determinando una mayor expresión en neuronas XX antes de la diferenciación sexual por hormonas gonadales. Asimismo el efecto neuritogénico de E2 *in vitro* dependió de factores debidos a los cromosomas sexuales ya que únicamente las neuronas XY (XYH y XYM) respondieron al tratamiento con un incremento en la longitud axonal y en la expresión de Ngn3 *in vitro* independientemente del sexo gonadal. A su vez los resultados obtenidos en cultivos provenientes de machos demostraron que el incremento de Ngn3 en respuesta a E2 *in vitro* depende de la activación de ER- $\alpha$ .



En conjunto los resultados obtenidos en esta tesis indican que los cromosomas sexuales determinan la expresión sexualmente dimórfica de aromatasa, la diferenciación de neuronas hipotalámicas y la expresión de Ngn3 antes del período crítico de diferenciación sexual. Estas diferencias sexuales podrían prevenir el posterior efecto organizador de las hormonas gonadales sobre el cerebro en desarrollo ya que el tratamiento con E2 y/o DHT anuló las diferencias sexuales estudiadas. Por otro lado la expresión de otras moléculas involucradas en la síntesis de esteroides en cerebro, tal como StAR, P450scc o 5 $\alpha$ -Red tipo I y II no se encuentra regulada por factores dependientes de los cromosomas sexuales al menos en la estría terminalis y regiones amigdalinas del cerebro de E16. Asimismo las diferencias sexuales en la expresión de ER- $\alpha$  y AR en estría terminalis y amígdala anterior del cerebro de embriones de E16 no responden a factores debidos a los cromosomas sexuales sino al sexo gonadal (presencia del gen *Sry*). En conclusión los resultados indican que, antes de la masculinización por hormonas gonadales, los factores genéticos debidos a los cromosomas sexuales actúan en paralelo e interactúan con factores gonadales para producir o reducir las diferencias sexuales que observamos en el fenotipo.

## Participation of sex chromosomes in sex differentiation of the brain

Brain sex differentiation is an irreversible process that takes place during a perinatal critical period that extends from embryonic day 18 to postnatal day 10 (E18-P10) in rodents. During this period gonadal testosterone (T) and estradiol (E2), produced by aromatization, masculinize the embryonic male brain through androgen (AR) and estrogen (ER) receptors. Evidences about sex differences before critical period that are not caused by organizational effect of gonadal hormones exist. That evidences could be due to genetic differences between XX and XY cells or due to an interaction between hormonal and genetic factors. To discriminate between sex chromosome complement and hormonal effect in the determination of sex differences the Four Core Genotype mice model was used in which four types of genotypes are produced: gonadal males XY and XX (XYM and XXM) and gonadal females XX and XY (XXF and XYF). By comparing these genotypes, it is feasible to evaluate differences between mice with different sex chromosome complement and the same gonadal sex. The aim of the present study was evaluate the relative contribution of sex chromosomes and E2 in the determination of brain sex differences before the critical period. We studied three sexually dimorphic traits: 1) brain expression of P-450 aromatase; 2) axonal growth induced by E2 *in vitro* and 3) expression of neurogenin 3 (Ngn3) in hypothalamic neurons.

Aromatase expression in the brain of E16 FCG embryos and *in vitro* regulation by an estrogenic or androgenic hormonal environment was studied. Because the organizational effect of steroids on the brain depends on the presence of its receptor expression we also evaluated the expression of ER and AR in aromatase-positive regions. Results showed that XY brain (XYM and XYH) expressed higher levels of aromatase (protein and mRNA) in stria terminalis and anterior amygdaloid area compared with XX brain (XXM and XXH) regardless of gonadal status (testes-ovaries). With respect to steroid receptor expression, estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ ) and androgen receptor (AR) are present in these regions and their expression depended on gonadal sex. That is, the brain of female embryos (XXH and XYH) showed a higher expression of ER- $\alpha$  in stria terminalis and anterior amygdalid area than gonadal males (XXM and XYM). In contrast, expression of AR was higher in gonadal males (XXM and XYM) in anterior amygdalid area than the same region in females (XXH and

XYH). In this context and in order to determine whether the sex chromosomes regulate the expression of other steroidogenic molecules in aromatase-positive regions the mRNA expression for the enzymes P450<sub>scc</sub> and 5 $\alpha$ -reductase enzymes I and II and also the mRNA expression of the cholesterol transporter StAR were evaluated. Results indicated that aromatase-positive regions expressed the genes studied to E16 (before the critical period) although their expression is not regulated by factors due to gonadal sex or to sex chromosomes. To study the role of hormonal environment in regulating the expression of aromatase we used primary neuronal cultures of anterior amygdala. We evaluated the effect of E2 and DHT treatment on the expression of mRNA of aromatase and ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  and AR by quantitative PCR. E2 and DHT levels increased aromatase and ER- $\beta$  only XX in cultures (XXH and XXM) irrespective of gonadal sex abolishing the basal differences between XX and XY neurons.

Previous evidences from our laboratory indicate that the female hypothalamic neurons cultured *in vitro* exhibit higher axonal length than male neurons before organizing action of gonadal steroids *in utero* and E2 treatment increases the axonal length of male neurons. Furthermore the expression of neurogenic gene Ngn3 is higher in female hypothalamic neurons relative to male cultures and E2 treatment increases Ngn3 expression in males. We evaluated the role of sex chromosome complement on the regulation of axonal effect of E2 and also on the Ngn3 expression and regulation in hypothalamic neurons of E15 embryos. The results indicated that sex chromosome complement determines a higher expression of Ngn3 in XX neurons before sexual differentiation by gonadal hormones. Also the neurogenic effect of E2 *in vitro* depend on sex chromosomes factors. E2 treatment induced an increase in axonal length and in expression of Ngn3 only in XY (XYH and XYM) neurons *in vitro* regardless of gonadal sex. Also, results of wt male cultures demonstrated that Ngn3 regulation involves the activation of ER- $\alpha$ .

Overall, the results obtained in the thesis indicate that sex chromosome complement determines the sexually dimorphic expression of aromatase, the differentiation of hypothalamic neurons and expression of Ngn3 before the critical period of sexual differentiation. These sex differences could prevent further organizational effect of gonadal hormones on the developing brain because treatment with E2 and/or DHT abolished the basal sex differences. On the other hand the expression of other molecules involved in the synthesis of steroids in the brain, such as Star, 5 $\alpha$ -reductases I and II and

the P450<sub>scc</sub> are not regulated by sex chromosome factors at least in stria terminalis and anterior amygdaloid area of E16 brain. Also, sex differences in the expression of ER- $\alpha$  and AR in stria terminalis and anterior amygdala of E16 brain embryos are not due to sex chromosomes factors but due to gonadal sex. In conclusion the results indicate that before the masculinizing action of gonadal steroids, genetic factors due to sex chromosomes act in parallel and/or interact with gonadal hormones to produce or reduce sex differences in the phenotype.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL CEREBRO

El cerebro de machos y hembras, hombres y mujeres es diferente. La magnitud de estas diferencias y la importancia funcional en la vida del organismo es foco de debate y análisis. Los estudios con animales permitieron comprender la magnitud y alcance biológico de las diferencias sexuales en el cerebro y, aunque los estudios continúan, en los últimos años se han logrado importantes avances que llevaron a mejorar la comprensión de los mecanismos celulares que participan. Hoy se conoce que factores genéticos, hormonales y ambientales actúan en paralelo organizando el cerebro de mamíferos durante períodos de tiempo acotados (McCarthy y Arnold, 2011). Se define entonces a la diferenciación sexual del cerebro como un proceso que ocurre temprano en el desarrollo y en el cual participan múltiples factores para organizar los circuitos neurales necesarios para la expresión de características sexualmente dimórficas en el organismo.

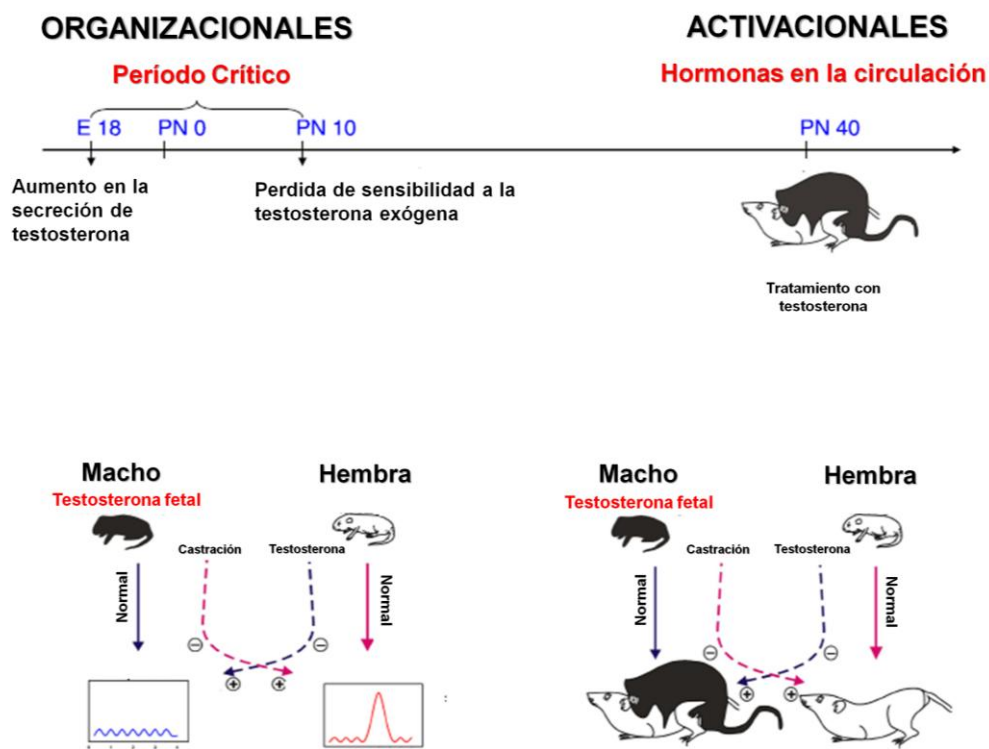
El estudio de la diferenciación sexual del cerebro tiene un punto de inflexión importante a partir de las evidencias de Phoenix y col. a fines de la década del 50. Estos autores proporcionaron un marco conceptual y un abordaje experimental que ha sido repetidamente puesto a prueba en el estudio de las diferencias sexuales del cerebro y la conducta de los últimos 50 años. La Testosterona (T) tiene un efecto organizador sobre el cerebro en desarrollo durante la vida neonatal (Phoenix y col., 1959) y este efecto puede observarse en roedores varios meses más tarde durante el estudio de la conducta sexualmente dimórfica de cópula en la vida adulta. Es decir, el tratamiento prenatal con T induce a las hembras de conejillos de indias a aumentar el cociente de montas durante la cópula indicando que esta característica puede ser masculinizada por acción de la T fetal en forma permanente e irreversible ya que sus efectos pueden verse varios meses después de concluido el tratamiento. De los resultados de este estudio ícono surgen varios puntos importantes de resaltar acerca de los efectos permanentes (organizacionales) versus transitorios (activacionales) en función del momento de la vida en el cual actúan, mecanismos y modos de acción de las hormonas en el cerebro entre otros.

### 1.1. Efectos organizacionales y activacionales de los esteroides gonadales

En la diferenciación sexual del cerebro la T y el estradiol (E2) actúan durante un período temprano del desarrollo perinatal, efecto que es llamado organizacional (Phoenix y col., 1959). La diferenciación sexual es un proceso que ocurre secundariamente a la determinación sexual, proceso que se deriva del sexo cromosómico o sexo genético del individuo (XX versus XY) y que determina que la gónada inicialmente bipotencial se diferencie a testículos u ovarios. La presencia del gen SRY (del inglés “*sex determining region of the Y chromosome*”) en el cromosoma Y de humanos o *Sry* en el de roedores determina el desarrollo de testículos (Koopman y col., 1991). Sin embargo, y de acuerdo a la hipótesis clásica de diferenciación sexual del cerebro, la T gonadal producida por los testículos fetales masculiniza el cerebro, mientras que la ausencia de secreción gonadal por los ovarios durante el desarrollo embrionario determina el patrón femenino de desarrollo. Gran parte de los dimorfismos sexuales que conocemos se producen por esta acción organizadora de los esteroides gonadales durante un período temprano del desarrollo que se conoce como período crítico. Este período se extiende desde el pico de secreción testicular que en ratones ocurre al día embrionario (E) 17-18 (O’Shaughnessy y col., 2006, 1998) y en ratas a E18,5-19,5 (Huhtaniemi, 1994; Scott y col., 2009) hasta el día posnatal (P) 10 aproximadamente.

No todas las diferencias sexuales ocurren por la acción organizacional de la T. Como toda hormona esteroidea, la T atraviesa la barrera hematoencefálica y las diferencias sexuales en los niveles de hormonas en circulación ocasionan que el cerebro y las estructuras sensibles a esteroides estén expuestos a ellos mientras los niveles de hormonas sean altos. Estas acciones agudas de los esteroides sobre el cerebro son llamadas activacionales. Existen dos características sexualmente dimórficas que han sido ampliamente estudiadas y se aplican al dogma organizacional/activacional y que a su vez están estrechamente relacionadas con la reproducción: 1) la conducta sexual durante la cópula y 2) el patrón de secreción de la hormona luteinizante (LH) pulsátil en machos y cíclico en hembras. El cerebro de machos es organizado por los esteroides gonadales durante el desarrollo para que los circuitos neurales que controlan la conducta de cópula respondan a los esteroides circulantes en la vida adulta. Sin embargo, en las hembras se requiere un ambiente temprano libre de hormonas esteroideas para la organización de estos dos dimorfismos sexuales: la conducta de lordosis y la secreción

cíclica de LH. Cuando ratas hembras son expuestas a T exógena antes de P10 no solo carecen de receptividad sexual en la vida adulta sino que también son estériles (Barraclough y Gorski, 1961; Barraclough, 1961). Si además son tratadas con andrógenos en la vida adulta exhiben un aumento en el número de montas en presencia de una hembra receptiva (Baum, 1979; Whalen, 1964). En otras palabras, el cerebro de las hembras es masculinizado cuando es expuesto a esteroides exógenos durante el período crítico (McCarthy, 2008; Figura 1).



**Figura 1: Efectos organizacionales y activacionales de los esteroides gonadales sobre el cerebro.** El establecimiento de las diferencias sexuales en la fisiología y la conducta ocurre en función de la exposición a esteroides gonadales durante el período crítico perinatal. En roedores el pico en la secreción de testosterona a E18 define el inicio del periodo crítico. En hembras el ovario en desarrollo permanece inicialmente latente y determina un ambiente temprano libre de testosterona y estradiol. El tratamiento con testosterona en hembras ocasiona su aromatización a estradiol en cerebro y lleva a la masculinización del cerebro y la conducta. El final del período crítico perinatal se caracteriza por la pérdida de sensibilidad del cerebro de hembras a la testosterona exógena. En el panel de abajo se observa el paradigma experimental utilizado en roedores para el estudio de dos dimorfismos sexuales: el patrón de secreción hipofisaria de la hormona LH y la conducta de copula. En ratas hembras la exposición a testosterona durante el período crítico las vuelve estériles y sexualmente no receptivas en la vida adulta debido a que tanto el patrón de secreción de LH como la conducta de copula son organizados durante el desarrollo pero a su vez son dependientes de los niveles de hormonas sexuales en circulación durante la vida adulta (tomado y adaptado de McCarthy, 2008).



## 1.2. Hipótesis de la aromatización y relevancia de la enzima aromatasa en la diferenciación sexual

En los primeros estudios donde se evaluó la hipótesis organizacional/activacional se inyectó T a crías hembra recién nacidas o, como en el trabajo de Phoenix y col. (1959), se trató con T a hembras preñadas para masculinizar el cerebro de las crías hembra. Sin embargo, y a modo de control, se trató también con E2 y sorprendentemente el E2 no solo fue capaz de masculinizar la conducta sexual sino que además fue más efectivo que la T misma. El tratamiento con dihidrotestosterona (DHT), el metabolito androgénico de la T que también se une a los receptores de andrógenos (AR) no fue efectivo (Whalen y Olsen, 1981).

De acuerdo con la Hipótesis de la aromatización, la T sintetizada por los testículos fetales difunde al cerebro y es localmente aromatizada a E2 (Naftolin y col., 1975). La enzima P450-aromatasa, responsable de la conversión de T a E2 se expresa en cerebro y sus niveles de expresión son máximos durante el período crítico en las regiones sexualmente dimórficas del área preóptica y el hipotálamo (Beyer y col., 1994a, 1993; Colciago y col., 2005; Karolczak y col., 1998; Lephart, 1996; Lephart y col., 1992; Negri-Cesi y col., 2001; Poletti y col., 1997; Raab y col., 1995).



**Figura 2: Conversión de testosterona a estradiol en cerebro.**

La aromatasa tiene dos picos de actividad y expresión en el área preóptica e hipotálamo de machos, uno antes (E19) y otro después del nacimiento (P2) ambos comprendidos dentro del período crítico de diferenciación sexual (Colciago y col., 2005) y en áreas sexualmente dimórficas. Durante este período crítico se observan una mayor actividad y mayores niveles de T circulante en machos, sugiriendo una mayor

exposición a estradiol con respecto a las hembras (Lephart, 1996). Estos antecedentes ubican a la aromatasa como un factor clave en el desarrollo y la diferenciación sexual del cerebro en muchas especies de mamíferos (MacLusky y Naftolin, 1981).

Los antecedentes expuestos previamente indican la relevancia del E2 producido por aromatización de la T en la masculinización del cerebro durante el período crítico. Sin embargo, se conoce que E2 está también involucrado en la organización del cerebro de hembras. Existen evidencias de alteraciones en el desarrollo normal por disrupciones en la síntesis de E2 o en la unión a sus receptores lo que indica la importancia del E2 en la diferenciación del cerebro hembra (Döhler y col., 1984; McCarthy y col., 1993). El rol indiscutible del E2 en la diferenciación sexual y la posible influencia de los estrógenos maternos llevaron al hallazgo de un factor clave importante para proteger el cerebro de las crías hembra del E2 que proviene de la placenta y de los machos adyacentes en el útero: la  $\alpha$ -fetoproteína, una globulina de unión a E2 presente en fetos en la gestación tardía y en crías postnatales. Esta proteína se sintetiza en hígado y es transportada por la circulación al cerebro durante el desarrollo (Toran-Allerand, 1987, 1980). Se ha postulado que tiene un rol protector debido a su alta afinidad por los estrógenos circulantes evitando así que lleguen al cerebro de las crías durante el desarrollo (Andrews y col., 1982; McEwen y col., 1975). Evidencias posteriores sugieren incluso que la  $\alpha$ -fetoproteína podría estar cumpliendo también un rol en el transporte de E2 hacia sus sitios de acción (Toran-Allerand, 1984) lo que sugiere un rol activo en la diferenciación del cerebro.

La hipótesis de la aromatización inicialmente planteaba que la enzima aromatasa en cerebro convierte la T de origen gonadal en E2 sin embargo hoy se conoce que puede utilizar como substrato también a precursores esteroides sintetizados *de novo*. A partir de las investigaciones pioneras de Baulieu y col. se conoce que los neuroesteroides son sintetizados a partir de sus precursores endógenos por enzimas que están presentes *in situ* e incluso se acumulan en el cerebro en ausencia de las glándulas esteroideogénicas (Corpéchet y col., 1981). En los últimos años se comenzó a utilizar el término esteroides neuroactivos para referirse no solo a los esteroides sintetizados *de novo* en cerebro sino también a los esteroides metabolizados a componentes neuroactivos en cerebro pero que derivan de precursores circulantes (Compagnone y Mellon, 2000; Melcangi y col., 2008). Si bien no existen evidencias directas sobre el rol de los neuroesteroides sintetizados *de novo* en la diferenciación sexual del cerebro, si hay

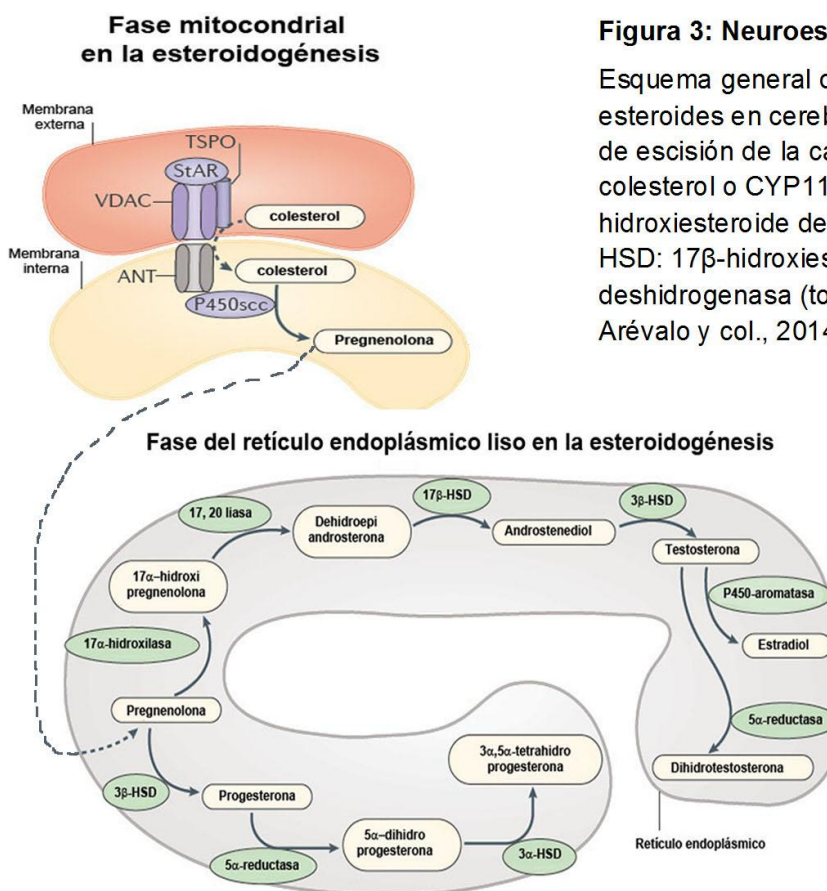
numerosos estudios que evidencian la presencia de las enzimas de la vía neuroesteroideogénica durante el desarrollo del sistema nervioso (Colciago y col., 2005; Negri-Cesi y col., 2001; Poletti y col., 1997; Raab y col., 1995; Sierra y col., 2003). Estas evidencias fueron complementando la Hipótesis de la Aromatización y dejaron abierta la posibilidad del rol potencial de los esteroides sintetizados *de novo* en la organización del cerebro en desarrollo. Asimismo son relativamente escasos los trabajos en los que se evalúan los niveles hormonales en regiones particulares del cerebro en desarrollo debido a la dificultad de obtener un nivel de muestra suficiente para la medición. Sin embargo, evidencias aportadas por el grupo de la Dra. McCarthy (Amateau y col., 2004; Konkle y McCarthy, 2011) sugieren que los esteroides sintetizados *de novo* (es decir en forma independiente de los precursores de la circulación) desempeñan un rol crítico en el desarrollo de las diferencias sexuales en cerebro. Sus resultados evidenciaron altos niveles de estradiol en hipocampo y corteza de ratas recién nacidas (tanto machos como hembras), lo cual abre la posibilidad de síntesis *de novo* en el cerebro de hembras (Amateau y col., 2004). Los niveles de E2, T y DHT en hipocampo, corteza e hipotálamo de ratas a partir de E19 reveló un patrón específico de cada sexo y sin relación con los niveles de esteroides en circulación. La remoción de las gónadas y glándulas adrenales al nacer no afectó los niveles locales de esteroides en estas regiones del cerebro a P3 (Konkle y McCarthy, 2011) apoyando la hipótesis de síntesis intracerebral de esteroides durante el desarrollo.

### 1.3. Síntesis de esteroides en cerebro

Los esteroides y los neuroesteroides derivan de su precursor común, el colesterol. En el cerebro en desarrollo, antes de que la barrera hemato-encefálica termine de desarrollarse el colesterol y sus metabolitos pueden provenir tanto de la madre como del feto llegando al cerebro libremente por la circulación. Sin embargo, luego de que se forma la barrera hemato-encefálica, el colesterol debe ser sintetizado *in situ* en cerebro (Wang y col., 2009). De acuerdo a las evidencias aportadas por estudios con ratones con una mutación en la enzima 3 beta-hidroxiesteroide-delta 7-reductasa, que los hace incapaces de convertir 7 dehidrocolesterol en colesterol la barrera hemato-encefálica se forma entre E10-11 luego de lo cual el cerebro se convierte en fuente de sus propios esteroides (Tint y col., 2006). Por lo que gran parte del colesterol que se necesita para crecimiento y diferenciación del sistema nervioso central después de E10-11 proviene de la síntesis *de novo* en cerebro. La molécula de colesterol tiene 4 anillos

fusionados-3 ciclohexanos y 1 ciclopentano- y además posee una cadena carbonada y un grupo hidroxilo.

Como se observa en la Figura 3, el primer paso es la conversión de colesterol en pregnenolona dentro de la membrana interna de la mitocondrias. El transporte del colesterol hacia la membrana interna de la mitocondrias es un paso altamente regulado y para el cual se necesita la presencia de proteínas transportadoras entre las que se encuentran la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) y la proteína translocadora conocida como TSPO (revisado por Arevalo y col., 2014). Allí se encuentra almacenada la enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (CYP11A1 o P450<sub>scc</sub>) que corta 6 carbonos de la cadena lateral de 8 carbonos de la molécula de colesterol dando lugar a la pregnenolona, el precursor de las hormonas esteroideas. StAR, TSPO y P450<sub>scc</sub> forman un complejo multimolecular junto con otras proteínas incluyendo el canal de aniones selectivo dependiente de voltaje (conocido por sus siglas en inglés como VDAC) en la membrana externa de la mitocondrias y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) presente en la membrana interna (Figura 3; Midzak y col., 2011).



**Figura 3: Neuroesteroideogénesis.**

Esquema general de la síntesis de esteroides en cerebro. P450<sub>scc</sub>: complejo de escisión de la cadena lateral de colesterol o CYP11A1; 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (tomado y adaptado de Arévalo y col., 2014).

En el retículo endoplásmico, la pregnenolona es convertida a los andrógenos dehidroepiandrosterona, androsterona y T. Todos estos andrógenos carecen de la cadena lateral de carbonos y contienen sólo 19 átomos de carbono en cuatro anillos fusionados. Las modificaciones químicas específicas que distinguen a los diferentes andrógenos son catalizadas por deshidrogenasas que actúan en las posiciones de carbono 3 y 17 (revisado en Pfaff, 2009). Tanto la proteína StAR como la enzima P450<sub>scc</sub> se expresan ampliamente en muchas regiones del cerebro en neuronas y glía (Pfaff, 2009; Sierra, 2004). Hallazgos de Shibuya y col. (2003) han demostrado que las neuronas piramidales y granulares de hipocampo de rata adulta están equipadas con toda la maquinaria enzimática necesaria para una síntesis *de novo* de E2. Con respecto a su expresión durante el desarrollo embrionario, se detectó proteína inmunoreactiva para P450<sub>scc</sub> en sistema nervioso periférico y central de embriones de rata a partir del día embrionario 9,5 en adelante (Compagnone y col., 1995).

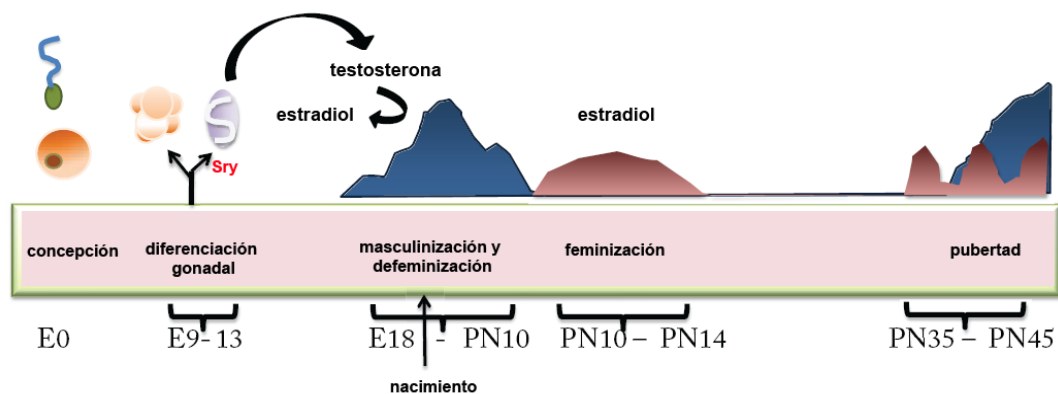
Como señalamos en la sección 1.2 la T desempeña un rol importante en el desarrollo morfológico, neuroendocrino y conductual del cerebro de roedores al estar involucrada en el establecimiento del volumen de distintas estructuras del cerebro, en el patrón de secreción de gonadotropinas y en la conducta de copula (McEwen y col., 1977). Algunas de estas funciones no están mediadas directamente por la T sino a través de sus metabolitos androgénicos. En el cerebro embrionario de mamíferos la T es convertida en E2 catalizado por la enzima aromatasa (Naftolin y col., 1975) o en DHT por las enzimas 5 $\alpha$  reductasas (5 $\alpha$ -Red Tipo I y Tipo II; Celotti y col., 1997). Una vez formados, el E2 ejerce sus acciones masculinizantes en el cerebro a través de la unión a sus receptores (ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ ), mientras que DHT es capaz de unirse a los AR con mayor afinidad incluso que su hormona nativa. Aunque los dos isotipos de reductasas catalizan la reducción del doble enlace ubicado entre los carbonos 4 y 5 de andrógenos, progestágenos y corticosteroides, estas iso-enzimas poseen diferentes propiedades cinéticas así como también distintas funciones fisiológicas. La 5 $\alpha$ -Red Tipo I, la cual posee una baja afinidad por la T, se expresa ampliamente en el cerebro y tiene un rol catabólico (Russell y Wilson, 1994). Por el contrario, la 5 $\alpha$ -Red Tipo II posee una alta afinidad por T, se concentra principalmente en estructuras periféricas dependientes de andrógenos y también se expresa en forma transitoria antes del nacimiento y hasta el día posnatal 28 en el cerebro (Poletti y col., 1997) y es considerada la isoenzima específica para la activación de T en los machos (Russell y Wilson, 1994). La actividad 5 $\alpha$ -Red

fue detectada en varias regiones del cerebro incluyendo el hipotálamo medio basal, amígdala y corteza frontal durante el desarrollo perinatal (Lephart y col., 2001). Con respecto al patrón ontogénico de expresión en hipotálamo, la  $5\alpha$ -Red Tipo I comienza a expresarse a E12 no habiendo diferencias sexuales ni un patrón específico de expresión (Karolczak y col., 1998; Spanic y col., 2015). Los productos de las  $5\alpha$ -Red se unen principalmente a los receptores GABAA, NMDA o receptores sigma y son conocidos por estimular el crecimiento neurítico, su actividad se corresponde con la formación y expresión de mielina en sustancia blanca, promover la neuroprotección en médula espinal, influenciar en el aprendizaje y memoria e inhibir convulsiones epilépticas, alterar estados de ánimo, cansancio y actividad locomotora (Lephart y col., 2001). Como se mencionó anteriormente, la progesterona es también un sustrato de las  $5\alpha$ -Red y debido a su mayor abundancia en cerebro (sobre todo de hembras) y mayor afinidad por la enzima es mejor sustrato que la T. El crecimiento neurítico es estimulado principalmente vía la  $5\alpha$  y  $3\alpha$ -reducción de progesterona especialmente durante el desarrollo prenatal dando lugar a allopregnenolona, el agonista natural más potente de los receptores GABAA (Celotti y col., 1992). Sin embargo es importante mencionar que es el E2 formado localmente vía aromatización, especialmente durante el desarrollo perinatal, el que tiene el mayor impacto en mediar la diferenciación neuronal.

#### **1.4. La diferenciación sexual involucra al menos tres procesos independientes**

La diferenciación sexual del cerebro ha sido ampliamente estudiada y como se observa en la Figura 1 involucra un período temprano de tiempo durante el desarrollo en el cual el cerebro es sensible al ambiente hormonal. Los circuitos neurales que son organizados en el período crítico son necesarios y controlan la ejecución de numerosas diferencias sexuales que se observan en el organismo adulto como por ejemplo la conducta sexual de cópula, de juego, cuidado parental, la susceptibilidad a enfermedades, secreción de hormonas, entre otras. En el caso de la conducta sexual la diferenciación de las estructuras neurales que determinan el patrón de comportamiento típico del macho adulto en roedores (monta, intromisión y eyaculación) y el patrón típico de la hembra adulta (conducta de lordosis bajo el ambiente hormonal adecuado en circulación) involucra tres procesos diferentes: (1) feminización, programa del desarrollo inicialmente visto como definido por defecto durante el desarrollo y necesario para la respuesta conductual de la hembra adulta; (2) masculinización, un proceso iniciado por el pico fetal de secreción de T durante el periodo crítico y

necesario para la respuesta conductual del macho adulto; (3) defeminización, proceso inducido hormonalmente durante el período crítico para eliminar, enmascarar o sobrescribir el proceso de feminización (Figura 4; revisado en McCarthy, 2010). Si bien el estudio de estos tres procesos continúa hay evidencias que sugieren que la masculinización y la defeminización ocurren en forma relativamente independiente e incluso involucran distintos circuitos neurales. Los machos son normalmente masculinizados y defeminizados y las evidencias sugieren que en ratones la masculinización requiere la activación del receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), mientras que la defeminización involucra la activación del ER- $\beta$  (Kudwa y col., 2006).



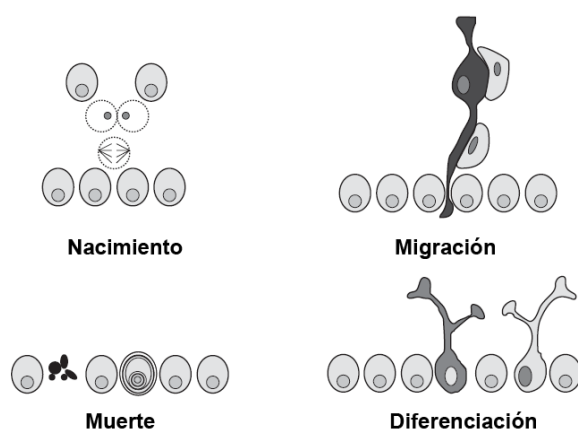
**Figura 4: Procesos involucrados en la diferenciación sexual del cerebro.** El gen Sry determina la diferenciación temprana de testículos y la síntesis de testosterona durante el desarrollo perinatal, lo que en machos induce la masculinización y defeminización del cerebro. En hembras se produce la feminización del cerebro a partir del estrógeno producido por los ovarios postnatalmente. El inicio de la pubertad ocurre antes en hembras y se caracteriza por un nuevo pico en la secreción de hormonas esteroideas cíclico en hembras y tónico en machos (tomado y modificado de McCarthy, 2010).

Resultados obtenidos en ratones deficientes de  $\alpha$ -fetoproteína indican que la acción prenatal del E2 es principalmente defeminizar y hasta cierto punto masculinizar el cerebro y la conducta. La  $\alpha$ -fetoproteína, cuya expresión es máxima al nacimiento disminuyendo luego su expresión aproximadamente un 50% (Raynaud, 1973), protege el cerebro de las crías hembra de la masculinización prenatal y, teniendo en cuenta que los ovarios comienzan a secretar niveles significativos de E2 a partir del día P7 (Lamprecht y col., 1976). Bakker y Baum (2008) proponen que la feminización del cerebro ocurre en hembras postnatalmente cuando la  $\alpha$ -fetoproteína disminuye su

expresión. En resumen, la diferenciación sexual del cerebro puede ser caracterizada de la siguiente forma: la acción defeminizadora del E2 ocurre normalmente en el período prenatal únicamente en machos debido a rol protector de la  $\alpha$ -fetoproteína en hembras. Y luego, el efecto feminizador del E2 normalmente ocurre en hembras entre el nacimiento y la edad de la pubertad, que en roedores ocurre entre los días P40-50 (Bakker y Baum, 2008).

### 1.5. La Diferenciación sexual afecta cuatro mecanismos clave

Una diferencia neuroanatómica en una región dada suele deberse a un número diferente de células en uno u otro sexo, lo cual a su vez puede ser el resultado de que las hormonas gonadales están afectando uno o más de estos cuatro procesos clave: 1) nacimiento de células, 2) migración diferencial desde otras regiones, 3) muerte celular o 4) diferenciación celular, lo cual involucra tanto al fenotipo neuroquímico de neuronas particulares como a la naturaleza y extensión de las conexiones sinápticas desarrolladas por esas neuronas. Para comprender a nivel del mecanismo como actúan las hormonas esteroideas para diferenciar el cerebro es importante identificar cuál de los cuatro procesos clave está involucrado, aunque en ocasiones puede verse afectado más de un proceso o una combinación de varios (Figura 5).



**Figura 5. Cuatro mecanismos clave por los que se establecen las diferencias sexuales en neuroanatomía.** Un número diferente de células en una región particular puede darse por el nacimiento de células nuevas (que eventualmente se diferenciarán en neuronas o glía); por una migración diferencial hacia esa región; por un mayor porcentaje de muerte celular en un sexo u otro durante el período crítico y también por diferenciación celular, lo cual involucra tanto al fenotipo neuroquímico de neuronas particulares como a la naturaleza y extensión de las conexiones sinápticas desarrolladas por neuronas particulares (tomado y adaptado de Pfaff, 2009).

Con respecto a la neurogénesis, a la fecha no existen evidencias claras de su participación directa en el establecimiento de una diferencia sexual. Para esto resulta



clave poder relacionar dos hechos fundamentales: que el nacimiento de células en la región en cuestión no finalice antes de que se diferencien las gónadas, hecho que en roedores ocurre entre los días E9-E13 (O'Shaughnessy y col., 2006). Por ejemplo, el número de motoneuronas en el núcleo espinal bulbocavernoso (SNB) en ratas es mayor en machos y está bajo el control de los andrógenos actuando a través del mecanismo clásico vía los AR (Breedlove y Arnold, 1981; Breedlove y col., 1982). Sin embargo, la mitosis de las motoneuronas del SNB finaliza antes de E14 (Breedlove y col., 1983) por lo que difícilmente las hormonas gonadales masculinicen el SNB por esta vía.

Muchas células en regiones sexualmente dimórficas del cerebro de roedores ya han terminado de migrar a su localización definitiva antes de que finalice la diferenciación testicular o antes de que los niveles de T fetal sean sexualmente dimórficos en el desarrollo perinatal. Tal es el caso del área preóptica (POA), el núcleo del lecho de la estría terminalis (BST), el núcleo anteroventral periventricular del hipotálamo (AVPV) y también el SNB (Bayer y Altman, 1987; Bayer, 1987; Han y De Vries, 1999) por lo que resulta improbable que la ubicación de sus neuronas se deba a una diferente migración celular causada por las hormonas gonadales perinatales. Nuevamente este es un proceso celular cuya regulación hormonal en la generación de diferencias sexuales durante el periodo crítico requiere aún de estudios adicionales.

En lo que respecta a la muerte celular, se conoce que alrededor de la mitad de las neuronas que originalmente se producen durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados mueren en algún momento de la vida por un proceso de muerte celular natural (Oppenheim, 1991). Los esteroides gonadales pueden incrementar los índices de muerte celular en algunas regiones mientras que lo disminuyen en otras (Forger, 2006) creando así gran parte de las diferencias sexuales que hoy conocemos. En estos casos una diferencia en el número de células en el adulto se correlaciona con una diferencia sexual en el número de células que mueren en algún momento del desarrollo. Tal es el caso del SNB donde hay un mayor índice de muerte celular en hembras postnatales (Nordeen y col., 1985). Las hembras también tienen mayor porcentaje de células muertas a partir del día P7 en el BST (Chung y col., 2000; Gotsiridze y col., 2007) y esto se relaciona con el mayor número de células en el BST de machos luego de la primer semana de vida. En ambos casos el tratamiento con andrógenos durante el período crítico en hembras elimina la diferencia sexual en el número de células (Chung y col., 2000; Nordeen y col., 1985).

La diferenciación de circuitos involucra tres cambios morfológicos: el crecimiento axonal, crecimiento dendrítico y sinaptogénesis. Este efecto, cuyo fin último es la diferenciación sexual del cerebro fue estudiado en cultivos organotípicos, donde se observó que E2 induce el crecimiento neurítico en cultivos de POA y corteza cerebral e hipotálamo (Toran-Allerand, 2005).

La diferenciación de neuronas y células gliales en el sistema nervioso central es uno de los procesos regulados por E2, cuyas acciones durante el desarrollo han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas (Cambiasso y Carrer, 2001; Díaz y col., 1992; Ferreira y Caceres, 1991) y se conoce que la hormona regula el crecimiento de axones, dendritas, espinas sinápticas y la formación de sinapsis por medio de diferentes mecanismos. Dependiendo del tipo celular y región del cerebro E2 regula estos procesos clave por medio de un mecanismo de señalización clásico que involucra la activación transcripcional de sitios de respuesta a estrógeno (ERE: *estrogen responsive elements*) en el ADN (Gruber y col., 2004) como también por medio de un mecanismo de señalización mediado por receptores de membrana (Gorosito y col., 2008; Micevych y Dominguez, 2009). Existen evidencias también de la utilización de un mecanismo de señalización mediado por receptores no clásicos de membrana asociados a proteína G (GPR30; Terasawa y col., 2009).

Nuestro laboratorio ha aportado numerosas evidencias sobre los efectos del E2 *in vitro* en el crecimiento y diferenciación de neuronas en cultivos primarios. Estos resultados indican que según sea la región neuroanatómica estudiada los efectos involucran distintos cambios topográficos. E2 promueve el crecimiento de dendritas en neuronas de amígdala provenientes de embriones de rata de E19 (Lorenzo y col., 1992) evidenciado por un aumento en la ramificación del árbol dendrítico más que por un aumento en la longitud de dendritas individuales. Por otro lado en cultivos de neuronas de hipocampo de la misma edad gestacional E2 induce un crecimiento axonal significativo sin afectar el árbol dendrítico (Blanco y col., 1990) y lo mismo ocurre en neuronas hipotalámicas (Díaz y col., 1992). Es interesante destacar que el efecto del E2 fue distinto en función de la edad embrionaria de los embriones al momento del cultivo. En neuronas hipotalámicas provenientes de embriones de E19 el efecto sobre la longitud axonal se observó tanto en neuronas de machos como de hembras (Díaz y col., 1992), mientras que si las neuronas son tomadas de embriones de E14 o E16 al momento del cultivo el efecto del tratamiento con E2 es sexualmente dimórfico. En machos

incrementa la longitud axonal mientras que en hembras no produce cambios (Cambiasso y col., 2000; Carrer y col., 2005; Scerbo y col., 2014). Estos resultados sugieren que el efecto axogénico del E2 en neuronas hipotalámicas depende del sexo genético (XX vs XY) de las células ya que a E14 el cerebro en desarrollo no ha estado expuesto aún a niveles significativos de esteroides gonadales.

## 2. DIFERENCIAS SEXUALES QUE NO SON EXPLICADAS POR LA ACCION ORGANIZADORA HORMONAL DURANTE EL DESARROLLO

Si bien es innegable el rol del E2 y la T en la masculinización de muchas de las características sexualmente dimórficas conocidas y el paradigma organizacional-activacional sigue siendo ampliamente utilizado hasta el día de hoy para abordar el estudio de las diferencias sexuales en el cerebro y la conducta, existen evidencias que reportan características sexualmente dimórficas que no pueden ser explicadas por la acción organizacional de los esteroides gonadales (Arnold, 2009; Caeiro y col., 2011; Dadam y col., 2014) o que aparecen antes de que los niveles hormonales incrementen significativamente. Estas y otras evidencias llevaron a plantear la existencia de diferencias intrínsecas entre las células XX vs XY antes de haber sido expuestas a los esteroides *in utero* y con ello a una revisión del concepto clásico de diferenciación sexual (Beyer y col., 1991; Burgoyne y col., 1995; Cambiasso y col., 2000; Dewing y col., 2003; Reisert y Pilgrim, 1991; Scerbo y col., 2014).

La enzima aromatasa, cuya expresión es clave y fundamental para el paso final de conversión de neuroesteroides en E2, se expresa durante el desarrollo siguiendo un patrón específico en el cerebro que abarca áreas sexualmente dimórficas. Estudios neuro-anatómicos de inmuno histoquímica e hibridación *in situ* en ratas (Lauber y col., 1997; Raab y col., 1995; Shinoda y col., 1994) han confirmado su patrón general de expresión durante el desarrollo. En cada región las neuronas inmunoreactivas para aromatasa aparecen durante distintos períodos que permiten clasificar su expresión en tres grupos: **Grupo Fetal:** se expresa moderadamente en el área preóptica anterior en los núcleos anteromedialpreóptico, periventricular y medial preóptico. **Grupo Fetal/Neonatal:** hay una fuerte expresión en la zona preopticoamigdalina a lo largo del arco medial preópticoamigdalino de la estría terminalis. **Grupo Joven/Adulto:** las

neuronas positivas para aromatasa se restringen a los núcleos central amigdalino, septal lateral y pálido ventral. Este circuito cerebral endócrino abarca células que contienen receptores de andrógenos y de estrógenos (Simerly y col., 1990; Tsuruo y col., 1995). Con respecto a su localización sub-celular estudios de microscopía electrónica indican que se localiza principalmente en la membrana nuclear y retículo endoplásmico (Shinoda y col., 1994) encontrándose en cuerpo celular, procesos y terminales pre-sinápticos (Naftolin y col., 1996) y la intensidad de la inmunomarcación es máxima durante el período crítico y luego disminuye progresivamente con el desarrollo (Tsuruo, 2005; Tsuruo y col., 1994) observándose diferencias sexuales en su expresión (Lauber y col., 1997). Con respecto a las diferencias sexuales en la expresión de aromatasa algunos trabajos han reportado una mayor actividad y expresión de aromatasa en neuronas y regiones hipotalámicas del cerebro de ratas y ratones macho (Beyer y col., 1994b, 1993; Colciago y col., 2005; Negri-Cesi y col., 2001) a E16. Estas diferencias no pueden ser atribuidas al pico prenatal en la secreción de T gonadal que en ratones ocurre a E17-18 (O'Shaughnessy y col., 2006, 1998) y en ratas a E18,5-19,5 (Huhtaniemi, 1994; Scott y col., 2009).

Nuestro laboratorio se ha dedicado ampliamente al estudio de las acciones neuritogénicas de E2 en neuronas hipotalámicas de roedores. Estos resultados revelaron una diferencia sexual en el efecto de E2 sobre el crecimiento y diferenciación neuronal *in vitro* (Cambiasso y col., 2000; Carrer y col., 2005) antes del período crítico de diferenciación sexual. Asimismo, encontramos diferencias sexuales en el crecimiento y diferenciación de neuronas hipotalámicas antes de la acción organizadora hormonal *in utero*. Las neuronas hipotalámicas provenientes de ratones hembra de E14 presentan un grado de desarrollo avanzado en relación a neuronas de machos *in vitro* (Scerbo y col., 2014). Los cultivos hipotalámicos provenientes de embriones hembra presentan un mayor porcentaje de células en estadios más avanzados del desarrollo neuronal, mayor proporción de neuronas con ramificaciones en las neuritas y mayor longitud axonal en relación a los cultivos de embriones machos. El tratamiento con E2 en estos cultivos tiene un efecto sexualmente dimórfico afectando únicamente a los cultivos de embriones machos (Cambiasso y Carrer, 2001; Cambiasso y col., 2000) y anulando las diferencias sexuales entre cultivos controles (Scerbo y col., 2014).

Recientemente se ha postulado que las acciones neuritogénicas de E2 encuentran su contraparte en la señalización mediada por la activación de receptores Notch

(Arevalo y col., 2010, 2014). Se conoce que el desarrollo y diferenciación neuronal se encuentra regulado por la activación de los receptores Notch (Bray, 2006). Estas proteínas integrales de membrana se unen a varios ligandos diferentes y su activación está implicada en el control de la extensión de neuritas y remodelación. La inhibición de Notch promueve la extensión neurítica (Berezovska y col., 1999; Sestan y col., 1999), mientras que su activación, resulta en una disminución del número de dendritas y un aumento en su longitud. Estos efectos están asociados con un incremento en la expresión de los factores de transcripción Hes1 (deriva de su nombre en inglés *hairly and enhancer of split*) y Hes5 (Salama-Cohen y col., 2005), los cuales controlan negativamente la expresión de Neurogenina 3 (Ngn3; Bertrand y col., 2002). Es interesante destacar que la sobre-expresión de Ngn3 en cultivos de neuronas de hipocampo estimula el crecimiento de nuevas dendritas e induce un aumento en la proporción de terminales sinápticas excitatorias/inhibitorias (Salama-Cohen y col., 2006; Simon-Areces y col., 2011). Con respecto a las funciones de Ngn3 durante el desarrollo se conoce que regula la gliogénesis en el desarrollo de la médula espinal de vertebrados (Lee y col., 2003), la neurogénesis en la retina (Ma y col., 2009) y el hipotálamo (Pelling y col., 2011) y la especificación de subtipos neuronales que controlan la homeostasis energética en el hipotálamo ventromedial (Pelling y col., 2011). Ngn3 también está implicado en la regulación del desarrollo neuronal en el hipocampo y además, está involucrado con la vía de señalización de Notch en el control de la morfología dendrítica y la conectividad sináptica de neuronas hipocampales (Ruiz-Palmero y col., 2011; Salama-Cohen y col., 2005; Simon-Areces y col., 2010) y su expresión está controlada negativamente por la actividad del receptor Notch (Apelqvist y col., 1999). Existen evidencias que indican que E2 regula negativamente la señalización mediada por Notch (Arevalo y col., 2010) en neuronas de hipocampo produciendo así una disminución en la expresión de Hes1 y un aumento de Ngn3 (Ruiz-Palmero y col., 2011).

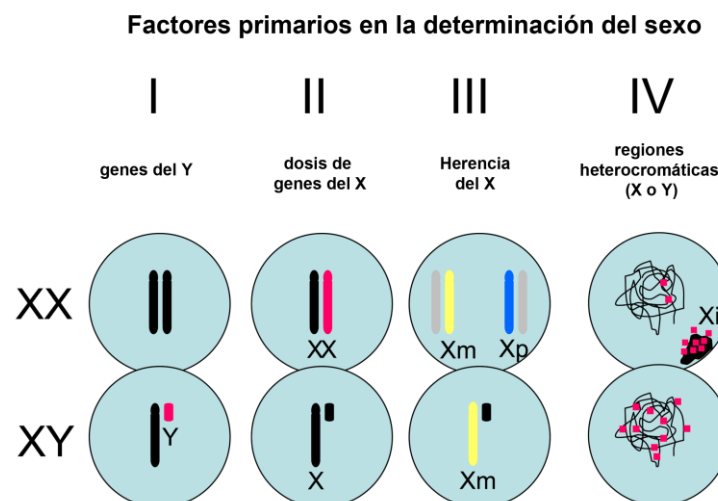
En línea con los estudios que postulan el rol neuritogénico de Ngn3 nuestros resultados previos indican que antes del período crítico las neuronas hipotalámicas de embriones hembra expresan mayores niveles de ARNm de Ngn3. Luego del bloqueo selectivo en su expresión utilizando RNA de interferencia aumenta el porcentaje de células en estadios inmaduros (II) y disminuye el porcentaje de células en estadio IV en cultivos hipotalámicos de hembra lo que resulta en la anulación de las diferencias

sexuales basales (Scerbo y col., 2014) en forma similar al efecto logrado luego del tratamiento con E2 (Scerbo y col., 2014). Estos resultados evidencian que las células provenientes del cerebro de machos y de hembras presentan características intrínsecas y diferentes antes de la masculinización por hormonas esteroides durante el periodo crítico.

### 3. LOS CROMOSOMAS SEXUALES COMO FACTORES PRIMARIOS EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL

La consideración de diferencias a nivel genético entre las células XX y XY como factores potenciales en la determinación de diferencias sexuales lleva a analizar la diferente dotación cromosómica entre ambos tipos celulares. Los cigotos macho y hembra poseen ambos la misma dotación de autosomas que, en promedio comprende el 95% del genoma. Estos factores comunes entre ambos permiten que machos y hembras sean funcionalmente similares. Sin embargo, los cromosomas sexuales involucran el 5% restante de la dotación genética del individuo y constituyen los factores primarios en la determinación del sexo y se ha postulado que a su vez pueden regular a factores secundarios (Arnold y Chen, 2009; Arnold, 2012; Arnold y col., 2012). Como se observa en la figura 6 estos factores primarios han sido clasificados en cuatro tipos principales (Arnold, 2012; Arnold y col., 2012; De Vries y col., 2002). En el tipo I se encuentran los genes del cromosoma Y solo presentes en machos. En esta categoría se menciona al gen *Sry* necesario para la diferenciación de los testículos (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993) y a los genes del Y que son necesarios para la espermatogénesis (Burgoyne, 1998). El tipo II comprende a los genes del X que escapan a la inactivación y por lo tanto se expresan en ambos cromosomas X resultando en una mayor expresión en células XX con respecto a células XY. Debido a que el cromosoma X que se inactiva varía entre los distintos tejidos y edad, el número de genes que escapan a la inactivación dependerá de la especie, momento del desarrollo y tejido y se conoce que su efecto es mayor en humanos que en roedores (Berletch y col., 2010; Carrel y Willard, 2005). El factor de tipo III involucra a los genes del X que se expresan en mayor o menor medida en las células XX o XY debido a la impronta parental del cromosoma X (*parental imprinting*). Los individuos XX pueden heredar el cromosoma X materno o paterno y dependiendo de cuál sea el X que se inactive en cada célula pueden expresar los genes

del X provenientes del lado paterno o materno, mientras que los individuos XY solo heredan el cromosoma X materno. En la clase IV recientemente propuesta como factores genéticos que posiblemente ejerzan un rol en la determinación sexual se ubica a regiones no codificantes de los cromosomas sexuales que son heterocromáticas en un sexo más que en el otro. Un mecanismo probable para dichas interacciones sexo-específicas propone que la heterocromatina de los cromosomas sexuales puede alterar el balance de factores que cambian el estatus epigenético de la cromatina actuando como un sumidero de factores (ADN metil-transferasas, enzimas modificadoras de histonas, etc.) que favorecen la formación de heterocromatina (Wijchers y Festenstein, 2011; Wijchers y col., 2010). La mejor evidencia de un efecto sexo-específico de regiones de heterocromatina proviene de *Drosophila*, en la cual el cromosoma Y heterocromático altera el balance epigenético (heterocromatina/eucromatina) de loci autosomales (Jiang y col., 2010; Lemos y col., 2010). Otro ejemplo interesante, si bien no se conocen evidencias específicas sobre el rol que ejerce sobre la expresión de genes autosomales (Wijchers y Festenstein, 2011; Wijchers y col., 2010), es el cromosoma X inactivo en las células de mamíferos. Esta gran región heterocromática que representa el cromosoma X que se inactiva está ausente en las células XY y podría estar ejerciendo alguna regulación sobre los genes presentes en los otros cromosomas (Arnold, 2012; Arnold y col., 2012).



**Figura 6: Factores primarios en la determinación del sexo presentes en los cromosomas sexuales.** En la clase I se ubican los genes del Y solo presentes en machos. La clase II comprende a los genes del X que escapan a la inactivación y se expresan en mayor proporción en hembras. En la clase III están los genes ligados a la impronta del X y su efecto sexo-específico se debe a que solo las hijas hembras heredan el cromosoma X paterno. La clase IV comprende regiones de heterocromatina presentes en los cromosomas sexuales (como por ejemplo el cromosoma X inactivo) que pueden alterar el estatus epigenético de los autosomas (tomado y modificado de Arnold, 2012).

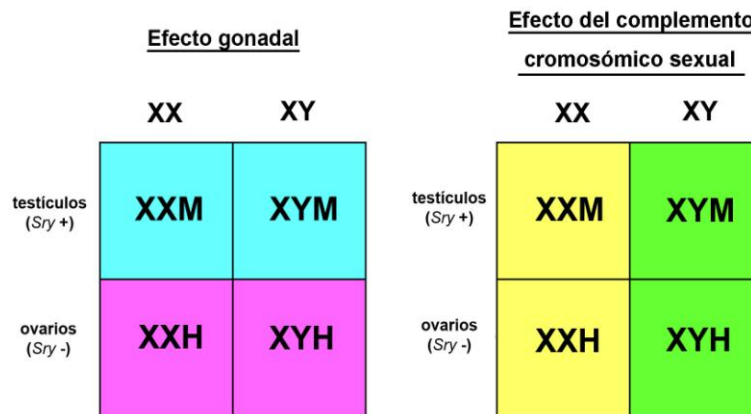
Las evidencias que respaldan la participación relativa de la diferente dotación genética entre individuos XX y XY en la diferenciación sexual se encuentran en que un número creciente de investigaciones aborda el estudio de la expresión sexualmente dimórfica de genes clave durante el desarrollo porque, ya sea que estén ubicados en autosomas o que estén ligados a los cromosomas sexuales, podrían ser la base de comportamientos regulados por los cromosomas sexuales (Armoskus y col., 2014; Dewing y col., 2003; Wolstenholme y col., 2013; Xu y col., 2005, 2002). Estos estudios han permitido identificar diferencias en la expresión de genes ubicados en autosomas entre individuos con el mismo fenotipo gonadal pero que difieren en el número de copias del cromosoma X: 1X versus 2X (Wolstenholme y col., 2013).

### **3.1. Diferencias sexuales causadas por el complemento cromosómico sexual**

El verdadero rol del complemento cromosómico ha sido muy difícil de estudiar por la falta de un modelo *in vivo* en el que se pueda separar el efecto del sexo genético de las células del fenotipo gonadal. En un tipo de modelo animal desarrollado se logró descontar el efecto de las hormonas en un animal que carece de gónadas y de esta forma permite la evaluación de diferencias sexuales que se desarrollan en total ausencia del efecto organizacional de las hormonas, aunque si hay producción de hormonas esteroides en otros tejidos como el cerebro. Estos animales tienen una mutación nula para el factor esteroidogénico 1 (SF-1 KO) el cual es necesario para la diferenciación de las gónadas y de las glándulas adrenales. En este modelo animal es posible encontrar algunas diferencias sexuales en el hipotálamo por ejemplo que no son causadas por la acción hormonal (Büdefeld y col., 2008; Majdic y Tobet, 2011). Recientemente, un modelo originalmente desarrollado por Burgoyne (Gubbay y col., 1990; Koopman y col., 1991), ha sido utilizado para abordar el estudio de esta temática (Arnold y Chen, 2009; Carruth y col., 2002; De Vries y col., 2002; Wagner y col., 2004). Se trata de ratones cuyo fenotipo gonadal (testículos u ovarios) es independiente del complemento cromosómico sexual (XY o XX), lo que se logra mediante una delección del gen Sry del cromosoma Y (Y<sup>-</sup>), el cual es responsable del desarrollo testicular en machos. De esta forma, los ratones portadores de esta delección son XY<sup>-</sup> y tienen ovarios (hembras gonadales). En estos ratones también se insertó el gen Sry en un autosoma, creando ratones XY<sup>-</sup>Sry que poseen testículos y son machos fértiles. Al cruzar estos machos



( $XY^{-}Sry$ ) con hembras XX se obtienen 4 genotipos: hembras XX, hembras  $XY^{-}$ , machos  $XY^{-}Sry$  y machos  $XXSry$ . La comparación de un carácter entre estos 4 grupos permite la valoración independiente de los efectos de: a) sexo; b) complemento cromosómico, y c) su interacción (Figura 7).



**Figura 7: Modelo animal de los cuatro genotipos utilizado para el estudio del rol del complemento cromosómico sexual.** El modelo presenta animales con igual complemento cromosómico sexual (XY-XX) pero diferente sexo gonadal (testículos-ovarios). XXM y XYM: machos gonadales (poseen el gen *Sry* en un autosoma). XXH y XYH: hembras gonadales (no portan el gen *Sry*). La evaluación de un dimorfismo sexual entre estos cuatro grupos permite discriminar entre el efecto debido al sexo gonadal del efecto debido al complemento cromosómico sexual (para mayor detalle ver Figura 9 en la página 36).

Distintos trabajos del grupo del Dr. Arnold y de otros laboratorios con este modelo, proponen el papel rector del complemento masculino de los cromosomas sexuales en la determinación de algunas características sexualmente dimórficas del cerebro (Arnold y Burgoyne, 2008). Estudios *in vitro* realizados a partir de mesencéfalo, mostraron un mayor número de neuronas inmunoreactivas para la enzima tirosina hidroxilasa en cultivos de animales portadores del cromosoma Y, ya sean machos ( $XY^{-}Sry$ ) o hembras ( $XY^{-}$ ) (Carruth y col., 2002). Asimismo, se conoce que la densidad de fibras vasopresinérgicas del septum lateral es mayor en los machos que en las hembras y luego de evaluar este parámetro en animales portadores del cromosoma Y ( $XY^{-}Sry$ ) se determinó que poseen una mayor densidad de fibras inmunoreactivas para vasopresina que animales del mismo sexo gonadal sin cromosoma Y ( $XXSry$ ) (De Vries y col., 2002). Este modelo animal ha sido evaluado también en el patrón de conducta agresiva (Gatewood y col., 2006). Las evidencias indican que las hembras portadoras del cromosoma Y ( $XY^{-}$ ) presentan mayor agresividad que las hembras XX (Gatewood y col., 2006). En otro trabajo, Dewing y col. (2006) han empleado oligonucleótidos

antisentido para disminuir la expresión del gen *Sry* en sustancia nigra para demostrar su rol en la regulación de células dopaminérgicas de la sustancia nigra del cerebro de roedores adultos por el gen *Sry*. Esta región y tipo celular, se ven deteriorados en la enfermedad de Parkinson, un desorden degenerativo más frecuente en hombres que en mujeres y la participación del gen *Sry* podría explicar las diferencias en la frecuencia de aparición según el género.

En otros casos sin embargo, se han relacionado diferencias sexuales en la respuesta a estímulos nociceptivos (Gioiosa y col., 2008), la formación de hábitos (Quinn y col., 2007) y la mayor susceptibilidad a enfermedades autoinmunes (Smith-Bouvier y col., 2008) con el complemento cromosómico XX. También, recientemente se han asociado diferencias sexuales en la aparición de defectos en el desarrollo del tubo neural con diferencias en la expresión de genes del cromosoma X (Chen y col., 2008). Evidencias de nuestro laboratorio demostraron que la administración de Angiotensina II produce, independientemente del fenotipo gonadal, una sensibilidad barorefleja diferente en ratones portadores del complemento XX respecto a la respuesta observada en ratones portadores del complemento XY. Ratones hembras XX y machos XX $\overline{Sry}$  presentan una sensibilidad barorefleja mayor que hembras XY $\overline{Sry}$  y machos XY $\overline{Sry}$  (Caeiro y col., 2011). Asimismo, resultados recientes de nuestro grupo indicaron un efecto del complemento cromosómico sexual sobre la activación cerebral en respuesta a la depleción aguda de sodio. Ratones XX tuvieron mayor inmunoreactividad para Fos en regiones relacionadas con la homeostasis de la presión sanguínea y de los fluidos corporales (Dadam y col., 2014).

#### **4. EL ROL DE LA EPIGENÉTICA EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL**

En los últimos años, los grandes avances en el campo de la epigenética tuvieron impacto en el estudio de la diferenciación sexual. Las modificaciones epigenéticas son importantes en prácticamente cualquier proceso biológico por lo que no es sorprendente que tengan un rol fundamental en el proceso de diferenciación sexual. Algunas de las modificaciones epigenéticas incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y palmitoilación de histonas y metilación del ADN (Roth y Sweatt, 2011). Además de que involucran modificaciones a largo plazo cuyos efectos en el

genoma no solo persisten en el tiempo evidenciándose en el fenotipo del individuo mucho tiempo después de haber ocurrido (Zhang y Meaney, 2010) sus efectos pueden persistir por varias generaciones (Guerrero-Bosagna y Skinner, 2012; Morgan y Bale, 2011). Esta persistencia en sus efectos llevo a pensarlas como un mecanismo potencialmente involucrado en los efectos organizacionales de las hormonas gonadales y hoy en día ya son numerosas las evidencias que indican que algunos de estos procesos epigenéticos juegan un rol importante en la diferenciación sexual del cerebro (Auger y Auger, 2011; Chung y Auger, 2013; McCarthy y col., 2009; Menger y col., 2010; Nugent y McCarthy, 2011). Por ejemplo, en algunas regiones del cerebro existen diferencias sexuales en el patrón de acetilación o metilación de histonas antes del nacimiento (Matsuda y col., 2011; Tsai y col., 2009) lo cual podría indicar que esta diferencia sexual está actuando como un factor sexo- específico. Algunas evidencias indican que el tratamiento prenatal con T masculiniza el patrón de acetilación de la histona 3 en hembras al nacer aunque no afecta el patrón de metilación (Matsuda y col., 2011). Asimismo, la administración de ácido valproico, un inhibidor de las desacetilasas de histonas, al momento del nacimiento altera no solo la acetilación de la histona 3 sino también bloquea la masculinización en el número de células del núcleo del lecho de la estra terminalis (Murray y col., 2011, 2009).

Recientemente se ha descrito que el cerebro de hembras posee más sitios CpG metilados en el POA que el cerebro de machos en un mecanismo mediado por la acción organizadora de E2 durante el período crítico. La inhibición de las enzimas metil-transferasas fue tan eficiente como las hormonas gonadales en masculinizar el patrón de metilación del POA y la conducta sexual (Nugent y col., 2015). La relevancia de estos resultados radica en que implican un rol activo de las hormonas en la represión de las enzimas metil-transferasas en POA, lo cual implica que la feminización es un proceso mantenido por acción hormonal y por lo tanto reversible ya que el estado de metilación de genes (demetilación o metilación *de novo*) ha sido asociado con procesos dependientes de la actividad como cambios en excitabilidad neuronal (Guo y col., 2011).

Por último es interesante señalar que dentro de los factores ligados a los cromosomas sexuales y que podrían causar diferencias sexuales se encuentran los genes ligados al cromosoma X que escapan a la inactivación (Figura 6). Y entre estos genes se incluyen algunos genes que codifican para desmetilasas de histonas como los genes

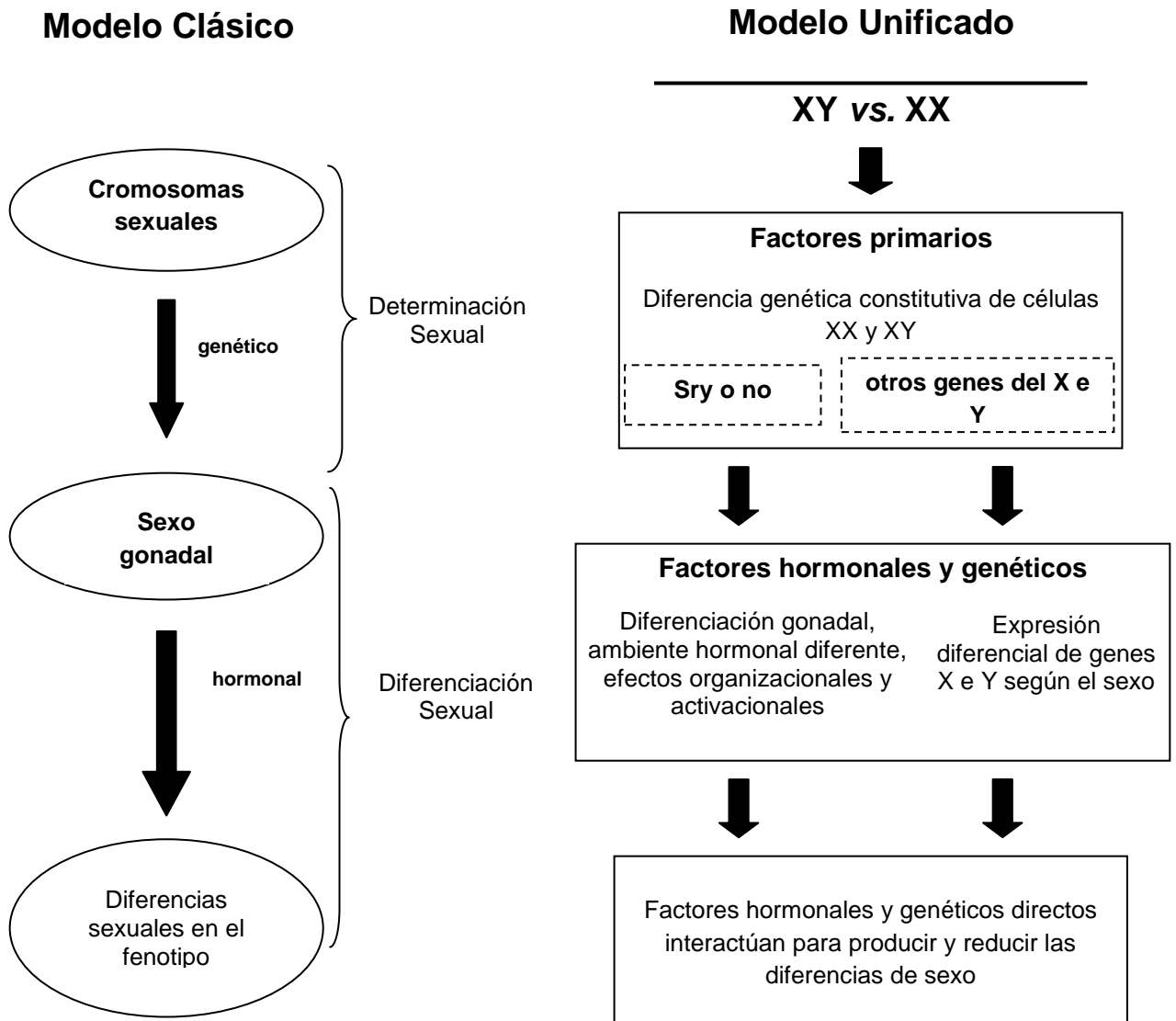
*Kdm5c* y *kdm6a* (Xu y col., 2008a, 2008b) cuya expresión es mayor en individuos XX con respecto a individuos XY (Wolstenholme y col., 2013) en varios tipos celulares además del cerebro. Si bien aún no han sido directamente implicados en la diferenciación sexual podrían estar involucrados en alguna acción sexo-específica en diferentes tejidos o estados del desarrollo ya que sus funciones e implicancias fenotípicas están siendo ampliamente estudiadas todavía. *Kdm5c* ha sido relacionado con la supresión de tumores y retardo mental (Niu y col., 2012; Santos-Rebouças y col., 2011), mientras que *kdm6a* está involucrado en oncogénesis (Kristensen y col., 2011).

## 5. MODELO UNIFICADO DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL

De acuerdo a la gran cantidad de antecedentes expuestos ya no se puede negar que existe una multiplicidad de factores que actúan en paralelo para determinar el fenotipo sexual del cerebro y demás tejidos no gonadales. Por un lado las diferencias a nivel genético debidas al complemento cromosómico sexual de las células que actúan a nivel primario determinando el sexo de las células y del organismo eran antes clasificadas dentro de la determinación sexual del individuo, proceso del cual se deriva secundariamente el estatus gonadal del organismo y con ello un ambiente hormonal temprano en machos debido a la secreción de T por los testículos fetales. Las hormonas gonadales organizan el cerebro masculinizando y defeminizando los circuitos neurales que controlan las características sexualmente dimórficas (Figura 8).

Actualmente la acción organizacional de las hormonas gonadales conserva un lugar preponderante entre los factores que causan las diferencias de sexo y el gen *Sry*, ligado al cromosoma Y, es aún una de las diferencias primarias que determinan un desbalance genético entre células XX y XY (Figura 6). Sin embargo, además de este gen hoy en día se reconoce la importancia de identificar los factores codificados por los cromosomas sexuales, que regulan a su vez a genes y/o factores ubicados en otros cromosomas los que, en forma secundaria determinan las diferencias de sexo. Es así, que hoy se habla de una teoría unificada (Figura 8) que reconoce al gen *Sry* y a otros genes de los cromosomas X e Y ocupando el mismo nivel debido a que todos están codificados de manera diferencial en los cromosomas sexuales. Los diversos factores sexo-específicos interactúan en una de varias maneras sobre las gónadas u otros tejidos, causando diferencias sexuales entre las células XX y XY. Sus efectos pueden ser

sinérgicos, como por ejemplo cuando los factores del cromosoma Y y la T hacen que los tejidos del macho funcionen de manera diferente al de las hembras, o se contrarrestan entre sí para reducir las diferencias de sexo, tal como el proceso de inactivación del cromosoma X específico de las hembras, el cual inactiva uno de los cromosomas X de cada célula, compensando la diferencia sexual que se produciría en la expresión de genes del X (Arnold, 2009; Arnold y col., 2013; Wallen, 2009).



**Figura 7: Esquema que demuestra el contraste entre los modelos de determinación sexual.** En el modelo clásico de determinación sexual de vertebrados con cromosomas sexuales heteromorfos (izquierda) la determinación sexual se define como el proceso que lleva a la diferenciación de las gónadas las cuales secretan hormonas gonadales que causan la diferenciación sexual de tejidos no gonadales. Por otro lado, el modelo unificado actual (derecha) reconoce múltiples factores codificados por los cromosomas sexuales actuando en paralelo y activando numerosas vías secundarias, hormonales y genéticas, para causar o reducir las diferencias sexuales en el fenotipo del organismo. El modelo unificado reconoce a las hormonas gonadales con un rol dominante dentro del grupo de factores secundarios que causan las diferencias sexuales en mamíferos (tomado y adaptado de Arnold et al., 2013).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS**

La diferenciación sexual del cerebro no depende exclusivamente de las secreciones gonadales sino también del complemento cromosómico sexual. Como consecuencia de la diferente expresión de los genes de los cromosomas X e Y, la acción de los esteroides sexuales es diferente en ambos sexos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la participación relativa de los cromosomas sexuales y del estradiol en la determinación de las diferencias sexuales del cerebro.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estudiar la participación de los cromosomas sexuales en la expresión de tres fenotipos sexualmente dimórficos, previo a la acción organizadora de los esteroides gonadales.

- La expresión de la enzima aromatasa en cerebro
- El crecimiento axonal inducido por estradiol en neuronas hipotalámicas *in vitro*
- La expresión del factor proneural neurogenina 3 en neuronas hipotalámicas

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



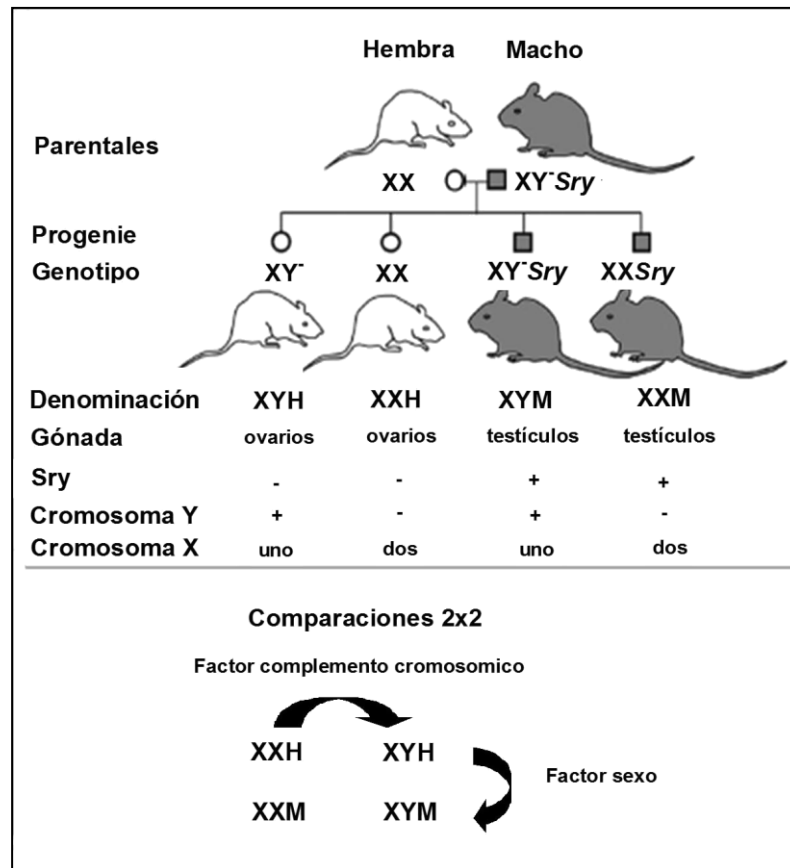
## 1. MANTENIMIENTO Y CRÍA DE ANIMALES

En el bioterio del Instituto M. y M. Ferreyra (Córdoba, Argentina) se mantiene la colonia de ratones MF1 de la cepa salvaje (wt) y la colonia de ratones transgénicos MF1 de los cuatro genotipos. Los animales se mantienen en condiciones libre de gérmenes en jaulas individualmente ventiladas a temperatura constante (23°C), con agua y alimento *ad libitum* y con un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Para obtener embriones de edad gestacional conocida se aparearon los animales la noche del proestro de las hembras y al día siguiente la presencia de tapón vaginal en las hembras indicó el día 1 de la gestación (E1). El día correspondiente a la edad gestacional determinada para cada experimento las ratonas preñadas fueron deprimidas por inhalación de dióxido de carbono y luego se procedió a la dislocación cervical. Los embriones fueron extraídos asépticamente de la cavidad uterina. El procedimiento posterior para la obtención del tejido nervioso dependió de las condiciones de cada experimento.

### 1.1. Animales transgénicos

El modelo de ratón de los cuatro genotipos (FCG, del inglés “Four Core Genotype”) fue originalmente desarrollado por Burgoyne (Gubbay y col., 1990) y consiste en animales en los que el fenotipo gonadal (testículos u ovarios) es independiente del complemento cromosómico sexual (XY o XX). Esto se logró mediante una deleción espontánea del gen *Sry* del cromosoma Y (Y) responsable del desarrollo testicular en los machos (del inglés Sex determining Region of the Y chromosome). La deleción del gen *Sry* de ratones XY (XY) resulta en un fenotipo femenino (ovarios). Cuando el gen *Sry* es re-insertado en un autosoma como transgen, estos ratones desarrollan testículos y son machos fértiles (XY*Sry*). Es así que del cruzamiento de ratones XY*Sry* con hembras normales XX se obtienen 4 genotipos: machos gonadales XX y XY (XXM y XYM; ambos con el gen *Sry* en un cromosoma autosómico) y hembras gonadales XX y XY (XXH y XYH sin el gen *Sry* en el cromosoma Y).

La comparación de un carácter entre estos 4 grupos permite la valoración independiente de los efectos del factor: **a) sexo; b) complemento cromosómico, y c) su interacción** (Figura 9).



**Figura 9: Modelo de los cuatro genotipos (FCG).** Los ratones transgénicos FCG se producen por el cruzamiento entre hembras gonadales XX con machos gonadales XY<sup>-</sup>Sry, obteniéndose los cuatro genotipos posibles en la progenie. Se muestran las diferencias entre los cuatro genotipos con respecto al tipo de gónada, presencia del gen Sry y al tipo y número de cromosomas sexuales. En el panel de abajo se observan las comparaciones 2x2 que permite el modelo FCG para discriminar entre el efecto fenotípico del sexo (presencia o ausencia del gen Sry) o del complemento cromosómico (XX vs. XY).

### 1.1.1. Identificación de animales transgénicos

La identificación del genotipo de los animales transgénicos se realizó a partir del análisis del ADN genómico obtenido de biopsias de embriones o crías al destete, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En todos los casos se confirmó el fenotipo gonadal por observación de la arteria espermática bajo lupa estereoscópica en los embriones o por observación de la distancia ano-genital (mayor en machos) en los posnatales.

### 1.1.2. Purificación de ADN

Las muestras individuales obtenidas de cada ratón se sometieron a una incubación de 18 horas a 55°C con la enzima proteinasa K (20mg/ml, Promega) en buffer de lisis. A continuación se centrifugaron las muestras y se recuperó el sobrenadante que luego fue lavado con isopropanol seguido de un lavado con etanol 70%. Las muestras fueron centrifugadas luego de cada lavado recuperándose siempre el precipitado obtenido en cada una. Luego del último lavado y centrifugación se dejó secar por 10 minutos para evaporar el remanente de etanol en cada muestra. Finalmente las muestras fueron re-suspendidas y homogeneizadas en agua bidestilada estéril. A continuación fueron almacenadas a -20°C hasta la obtención del genotipo por PCR.

### 1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa

La genotipificación se realizó mediante la amplificación por PCR con tres pares de oligonucleótidos o “primers”: un par que amplificó el gen Sry (Gubbay y col., 1990), otro par amplificó una región del cromosoma Y no presente en el cromosoma X (Turner y col., 2000) y por último un par que amplificó el gen autosómico Miogenina sirvió como un control de amplificación [control positivo (+) de la PCR] (Palaszynski y col., 2005). Las secuencias para cada par de oligonucleótidos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la detección del genotipo

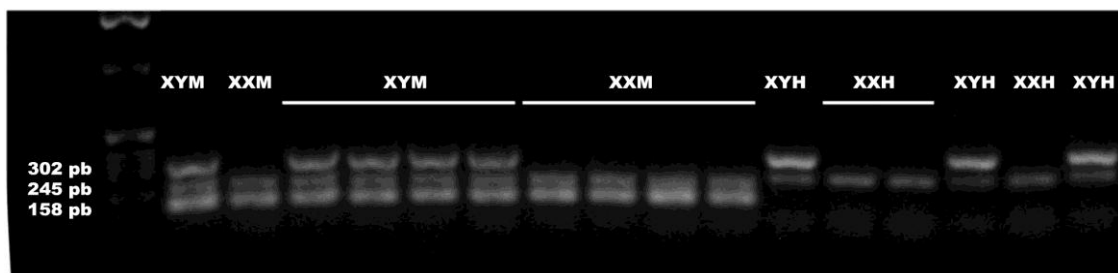
<b>GEN (MGI)</b>	<b>Secuencia sentido 5'-3'</b>	<b>Secuencia antisentido 5'-3'</b>	<b>Producto (pb)</b>
<b>Sry (98660)</b>	CTACACAGAGAGAAATACCCAAAC	GTCTTGCCTGTATGTGATGG	158
<b>Ssty (1314663)</b>	CTGGAGCTCTACAGTGATGA	CAGTTACCAATCAACACATCAC	302
<b>Miogenina (97276)</b>	TTACGTCCATCGTGGACAGCAT	TGGGCTGGGTGTTAGTCTTAT	245

Las condiciones de ciclado fueron: 94 °C 3 min, 35 ciclos [94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min], 72 °C 10 min y mantuvo a 4 °C (Termociclador Biometra).

### 1.1.4. Electroforesis en gel de agarosa

Una vez finalizada la PCR, los productos de la misma fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se compararon con un marcador de fragmentos de ADN de tamaño conocido. En la Figura 10 se muestran, como ejemplo, los resultados obtenidos en la determinación del genotipo de una camada representativa de ratones transgénicos.

GEN					Producto (pb)
	XYM	XXM	XYH	XXH	
Ssty	X		X		302
Miogenina	X	X	X	X	245
Sry	X	X			158



**Figura 10. Determinación del genotipo de animales transgénicos.** En la tabla se observan los productos de la PCR para cada genotipo y en el gel de agarosa se presenta una corrida electroforética representativa. Como se observa en la tabla los productos para cada genotipo son: XYM: banda de 302-pb (Ssty), de 245-pb (Miog) y de 158-pb (Sry); XXM: banda de 159-pb (Sry) y de 245-pb (Miog); XYH: banda de 302-pb (Ssty) y de 245-pb (Miog); XXH: banda de 245-pb (Miog). XYM y XXM (machos gonadales), XYH y XXH (hembras gonadales).

## 2. EXPRESIÓN DE AROMATASA

### 2.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión de la proteína

Con el objetivo de estudiar el rol del complemento cromosómico sexual en la expresión sexualmente dimórfica de aromatasa antes del período crítico de

diferenciación sexual del cerebro se analizó por inmunohistoquímica la expresión de esta enzima.

### **2.1.1. Inmunohistoquímica en secciones de cerebro**

Los cerebros se obtuvieron de embriones de E16. Luego de la extracción de los embriones del útero materno se procedió a la extracción del cerebro manteniendo los embriones en solución PBS a 4°C. En el caso de embriones transgénicos se separó y codificó una porción del cuerpo del embrión y se la almacenó a -20°C hasta la extracción del ADN para la obtención del genotipo por PCR.

#### **2.1.1.1. Fijación**

Los cerebros fueron individualmente sumergidos en paraformaldehído al 4% en solución PB 0,1 M y se los mantuvo en agitación a 4°C por 48 horas. Luego de la fijación se los colocó en solución de sacarosa al 30% a 4°C hasta la realización de la inmunomarcación.

#### **2.1.1.2. Procedimiento de inmunomarcación simple**

La localización inmunohistoquímica de aromatasa se realizó utilizando la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Se obtuvieron cortes coronales de cerebro de 40µm de espesor en criostato a -25°C. Las secciones de cerebro fueron montadas sobre portaobjetos tratados con gelatina (10%) y se dejaron secar a temperatura ambiente (TA) para asegurar su completa adherencia al vidrio.

Para dar inicio al procedimiento inmunohistoquímico los cortes fueron rehidratados con tres lavados en PBS 0,1 M. Todos los pasos que se describen a continuación se realizaron en agitación suave. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con una solución de etanol (50%) y peróxido de hidrógeno (5%) en solución PB por 45 minutos a TA. Inmediatamente después, se lavaron los cortes en PBS 0,1 M y se bloquearon las uniones inespecíficas por incubación durante 1 hora con suero normal de caballo (NHS, por sus siglas en inglés: *normal horse serum*) al 10% en PBS. A continuación se incubaron los cortes por 48 horas a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-aromatasa, desarrollado en conejo, dilución: 1:1000 en una solución de incubado que contiene 0,3% de tritón X-100, 0,3% de albúmina sérica bovina, 5% de NHS en PB 0,1M. Después de 48 horas de incubación, los cortes fueron lavados con PBS y se

incubaron por 1 hora a TA con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con biotina dilución 1:200 en NHS al 1% en PB. A continuación se incubó con el complejo avidina-biotina por 2 horas a TA. La detección se realizó con 3'3 diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB; 5mg/ml) como cromógeno y 0,01% de peróxido de hidrógeno por 3-4 minutos. Luego de la detección los cortes fueron deshidratados en xileno por 10 minutos y se los cubrió con el cubreobjetos. La tinción específica para aromatasa estuvo ausente cuando se omitió el anticuerpo primario.

### **2.1.1.3. Procedimiento de inmunomarcación doble**

Para identificar el fenotipo de las células aromatasa positivas se realizó doble inmunomarcación con un marcador específico de neuronas. En criostato a -25°C se obtuvieron cortes coronales de 20µm de cerebro de ratón recién nacido. Los cortes fueron co-incubados a 4°C con el anticuerpo contra aromatasa (descrito previamente) y con un anticuerpo monoclonal de ratón contra el marcador neuronal NeuN, dilución 1:1.000. Después de 48 horas de incubado, los cortes fueron lavados con PBS y se incubaron por 1 hora a TA con los anticuerpos secundarios fluorescentes: anticuerpo de burro anti-conejo conjugado con alexa verde (488nm) y anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con alexa rojo (564 nm; dilución 1:450 en NHS 1% en PB).

### **2.1.2. Análisis de las imágenes y cuantificación:**

El estudio neuro-anatómico del cerebro embrionario se realizó utilizando el Atlas de Ratón Prenatal para el cerebro embrionario de E16 (Schambra, 2008). Se realizó un análisis preliminar de todo el cerebro para definir los núcleos que expresan inmunoreactividad específica para aromatasa (ARO-ir). A continuación, los cortes conteniendo la estría terminalis y el área amigdalina anterior fueron ubicados en el plano coronal 15 del atlas mientras que los cortes de regiones más posteriores del cerebro conteniendo los núcleos medial y central de la amígdala fueron ubicados en el plano coronal 18. Los parámetros anatómicos utilizados para definir estas regiones en el plano coronal 15 fueron los ventrículos laterales, la posición de la capsula interna y la comisura anterior. Para la identificación del plano coronal 18 se utilizó la posición del tracto óptico (Schambra, 2008).

Los núcleos positivos para aromatasa se analizaron en un sistema computarizado que incluye un microscopio Zeiss equipado con cámara digital Leica DC

200. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas con el programa ImageJ (versión 1.42q). La cantidad total de inmunoreactividad para aromatasa se determinó en un campo de  $0,035\text{mm}^2$  ubicado de forma estandarizada dentro de cada núcleo midiendo el porcentaje de área cubierta por los pixeles que caen dentro del umbral establecido (aquellos pixeles con un valor gris más alto que un valor definido como umbral para la inmunoreactividad específica). El umbral fue establecido para cada imagen como una función constante de la tinción de fondo, la cual fue calculada a partir de la tinción media restando tres veces el mayor desvío estándar de estas mediciones (Brock y col., 2010; Wagner y col., 2004). La densidad media de fondo fue medida en una región inmediatamente lateral a la región analizada con ARO-ir. La cuantificación se realizó en tres cortes consecutivos para cada núcleo.

## **2.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión del ARN mensajero de aromatasa y de otros genes implicados en la síntesis de neuroesteroides**

Con el objetivo de evaluar el rol del complemento cromosómico sexual sobre la expresión transcripcional de la aromatasa se evaluaron los niveles relativos del ARN mensajero de la enzima por PCR en tiempo real en los núcleos ARO-ir. A su vez, también estudiamos la expresión de receptores esteroideos y otras moléculas esteroideas claves en la síntesis de neuroesteroides y en la metabolización de la testosterona de origen gonadal.

### **2.2.1. Obtención de la muestra por la técnica del sacabocados o “punch”**

Los cerebros de E16 fueron extraídos en PBS a  $4^{\circ}\text{C}$  e inmediatamente congelados por inmersión en isopentano mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$  en hielo seco. Luego fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la obtención del genotipo por PCR. Los núcleos positivos para aromatasa previamente identificados por inmunohistoquímica fueron obtenidos por la técnica del sacabocados (conocida por su nombre en inglés: punch) a partir de rodajas coronales de cerebro. Para la obtención de cada núcleo se realizaron cortes de  $40\ \mu\text{m}$  en criostato a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta llegar a la altura correspondiente al área de interés. Una vez identificada la altura del cerebro se realizó una única rodaja de  $280\ \mu\text{m}$  de grosor. Luego se extrajo cada núcleo con una aguja estéril de 18G de  $0,838\ \text{mm}$  de diámetro interno.

La región de interés fue cuidadosamente succionada con una jeringa adherida a la aguja. El procedimiento completo fue realizado adentro de la cámara del criostato (-25°C) para evitar la degradación del ARN. De cada individuo se obtuvo un “punch” individual para cada núcleo: la estría terminalis, el área amigdalina anterior y luego un único punch para la región amigdalina que contiene los núcleos medial y central. Los criterios anatómicos para la selección de las áreas de interés fueron los mismos que los descritos para inmunohistoquímica (ver sección 2.1.2). El ARN total fue extraído a partir de muestras individuales provenientes de un único punch para cada área. A continuación, se homogenizó el tejido en Trizol a 4°C por pasaje a través de jeringas 30G/½ (Darling) e inmediatamente se procedió a la purificación del ARN de acuerdo a las instrucciones de fábrica.

### **2.2.2. Extracción de ARN**

Luego de homogeneizar el tejido se incubó cada muestra 5 minutos a TA, se agregó cloroformo y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C. Luego, se separó la fase acuosa superior (transparente) que contiene el ARN. Posteriormente, se precipitó el ARN con isopropanol durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, se centrifugó el contenido durante 20 min a máxima velocidad a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con etanol 70% y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones durante 15 min. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se dejó secar durante 10 min a 37 °C. El ARN purificado se disolvió en agua libre de ARNasa y se lo incubó 10 min a 45 °C.

### **2.2.3. Digestión con ADNasa y cuantificación del ARN total**

El ARN total purificado se trató con Buffer 10 X con MgCl<sub>2</sub> y se lo incubó 15 minutos con DNasa I (Invitrogen) a 37 °C y luego con EDTA 50 mM a 65 °C. Inmediatamente después de la digestión con ADNasa, se cuantificó el ARN por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm (NanoDrop 2000-Thermo Scientific) y se evaluó su pureza por medio del índice de absorbancia 260/280. La relación de DO 260/280 considerada óptima fue ~1.8, valores menores indican contaminación de la muestra con proteínas o fenol y valores mayores hasta 2.0 indican preparaciones altamente purificadas de ARN. Además, se valoró la integridad del ARN total purificado en un gel de agarosa al 2%.



#### 2.2.4. Transcripción reversa (RT-PCR)

La transcripción reversa se realizó con 1,5 µg de ARN en un volumen de reacción de 20 µl conteniendo oligonucleótidos de secuencias aleatorias (random primers), dNTP y 0,5 µl de la enzima SuperScript II. Como control negativo, se utilizó un tubo de reacción sin ARN. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 25 °C 10 min, 42 °C 50 min y 70 °C 15 min.

#### 2.2.5. Cuantificación por PCR en tiempo real

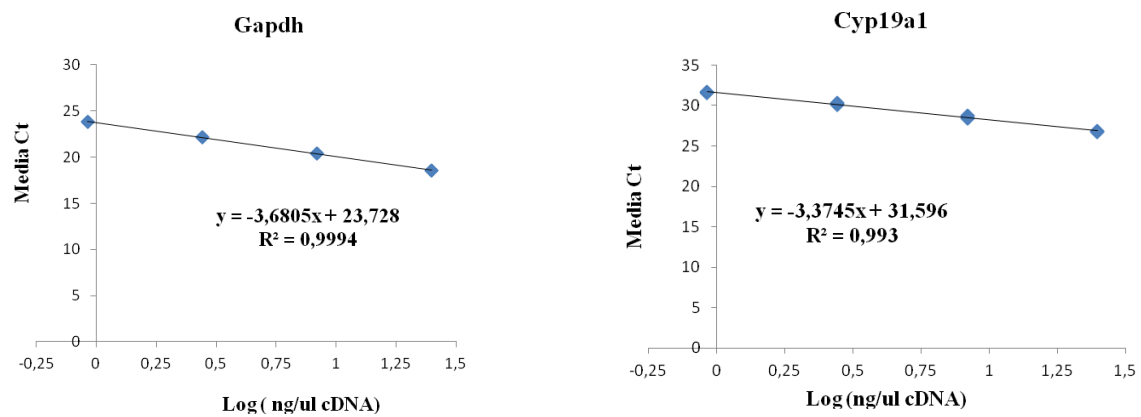
La cuantificación de la expresión relativa por PCR en tiempo real (qPCR) se realizó con oligonucleótidos diseñados para la amplificación específica de *Cyp19a1* (aromatasa), *Esr1* (receptor de estrógeno  $\alpha$ ), *Ar* (receptor de andrógenos), *Srd5a1* y *Srd5a2* (5 $\alpha$ -Reductasa tipo I y II respectivamente), *Star* (transportador de colesterol StAr), *Cyp11a1* (P450-scc) utilizado *Gapdh* como gen endógeno calibrador. El diseño del par de oligonucleótidos para cada gen fue realizado utilizando el programa Primer Express® Software (Applied Biosystems). Las secuencias para cada gen se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos usados en los ensayos de expresión génica

Gen	Genbank	Secuencia sentido 5'-3'	Secuencia antisentido 5'-3'	Producto (pb)
<b><i>Cyp19a1</i></b>	NM_007810.3	CGGGCTACGTGGATGTGTT	GAGCTTGCCAGGCGTTAAAG	135
<b><i>Esr1</i></b>	NM_007956.4	ATGAAAGGCGGCATACGGAAAG	CACCCATTTCAATTCGGCCTTC	94
<b><i>Ar</i></b>	NM_013476.3	GGCGGTCCTTCACTAATGTCAACT	GAGACTTGTGCATGCGGTACTCAT	84
<b><i>Cyp11a1</i></b>	NM_019779.3	GCTGGGCACTTTGGAGTCA	TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT	61
<b><i>Star</i></b>	NM_011485.4	GCTGGAAGTCCCTCCAAGACT	GCCACCCCTTCAGGTCAATA	61
<b><i>Srd5a1</i></b>	NM_175283.3	GAGGCAGCATCATCAGTGGTAC	CACCGGGAAGACAGACTCA	134
<b><i>Srd5a2</i></b>	NM_053188.2	ACAGACATGCGGTTTAGCGT	AACAAGCCACCTTGTGGGAT	134
<b><i>Gapdh</i></b>	NM_008084	AGTGCCAGCCTCGTCCCCTAG	GTGCCGTTGAATTTGCCGTGAGTG	128

La reacción se llevó a cabo utilizando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 20  $\mu$ l y utilizando una concentración de 300-800 nM de cada par de oligonucleótido y 4  $\mu$ l de una dilución del producto de la RT-PCR conteniendo 100 ng de ADN complementario. La amplificación se realizó en el equipo Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Los cálculos de cuantificación relativa de cada gen se realizaron con el método  $\Delta\Delta C_t$ , en el cual las diferencias cuantitativas en la expresión génica entre los genotipos y tratamientos se calculan en base a la expresión de un gen endógeno calibrador. Los cálculos de expresión relativa se realizaron luego de calcular la eficiencia (E) de amplificación de cada uno de los genes estudiados (Figura 11).



$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

$$E_{\text{Gapdh}} = 1,88$$

(86,71%)

$$E_{\text{Cyp19a1}} = 1,98$$

(97,85%)

$$\Delta C_t_{\text{muestra X}} = \text{media Ct}_{\text{Cyp19a1}} - \text{media Ct}_{\text{Gapdh}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{muestra X}} - \Delta C_t_{\text{muestra C}}$$

$$\text{Expresión relativa}_{\text{Cyp19a1}} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

**Figura 11:** Cálculo de expresión relativa para PCR en tiempo real. E: eficiencia. Muestra X: muestra problema. Muestra C: muestra proveniente de individuo XY wt.

Para esto se realizó una curva estándar de los valores de Ct (ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de

fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR) obtenidos en función de diluciones seriadas del ADN complementario de muestras controles (macho XY wt) y se trazó una relación lineal de cuya pendiente se obtiene el valor de eficiencia.

Se consideraron óptimos los valores de eficiencia  $E = 2 \pm 0,14$ . Una vez corroboradas las eficiencias máximas para cada par de oligonucleótido se procedió al cálculo de expresión relativa en las muestras problema (muestra X). Como grupo control se utilizaron muestras/cultivos sin tratar de individuos XY wt.

### **2.3. Rol del ambiente hormonal en la regulación de aromatasa *in vitro***

Luego de identificar el fenotipo de las células que expresan aromatasa y el patrón de expresión de los núcleos positivos para aromatasa en cerebro embrionario el siguiente paso fue estudiar la regulación ejercida por E2 y DHT. El modelo experimental utilizado fue el cultivo primario de región amigdalina anterior de embriones de E15 separados por genotipo y sexo.

#### **2.3.1. Cultivo primario de amígdala**

Se realizaron cultivos derivados de embriones E15 obtenidos del cruzamiento de hembras normales XXH con machos transgénicos XYM. Las ratonas preñadas fueron deprimidas por inhalación de CO<sub>2</sub> y sus fetos extraídos asépticamente de la cavidad uterina. Se separó una porción del cuerpo de cada embrión y se la codificó para la posterior identificación del genotipo por PCR.

##### **2.3.1.1. Disección**

Los encéfalos extraídos se colocaron en cápsulas de Petri estériles con solución salina Hanks que contiene en mM: HEPES 10; NaCl 136,9; KCl 5,36; Glucosa 5,55; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,33 para ser disecados bajo observación con una lupa binocular a un aumento de 20X. Previa remoción de las meninges se disecó la región amigdalina anterior según lo descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio (Lorenzo y col., 1992).

### 2.3.1.2. Disociación

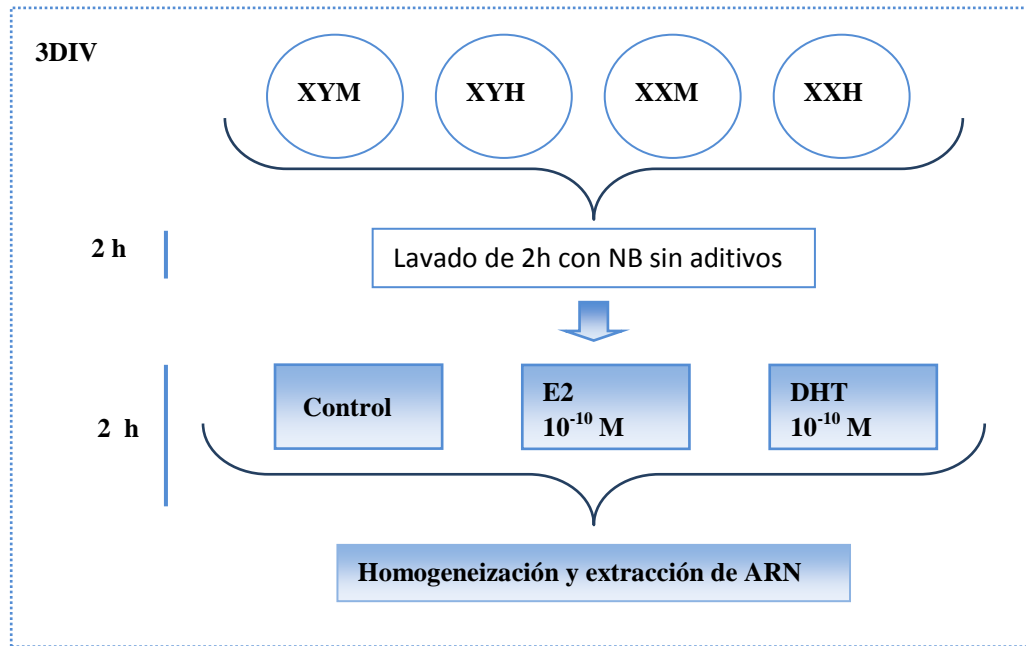
Las porciones de tejido provenientes de cada embrión se sometieron individualmente a una incubación de 15 minutos a 37°C con 0,25% de tripsina en solución Hanks luego de lo cual se realizaron dos lavados de 5 minutos con solución Hanks fresca. La disociación mecánica se realizó en medio esencial mínimo de Dulbecco (D-MEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (F10) con pipetas Pasteur de diferente diámetro. Las células derivadas de cada embrión fueron re-suspendidas en F10 para su siembra.

### 2.3.1.3. Siembra y mantenimiento

Las células disociadas derivadas de cada embrión se sembraron por separado sobre cápsulas de Petri estériles de 35 mm de diámetro (Corning) conteniendo un volumen final de 1,5 ml de F10 y se codificaron con el mismo número que las muestras obtenidas para obtención del genotipo. Las cápsulas fueron previamente cubiertas con 1 mg/ml poli-L-lisina. Las neuronas se incubaron durante 2 a 4 horas a 37°C en una atmósfera saturada de humedad conteniendo aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se reemplazó el F10 por Neurobasal sin rojo fenol suplementado con B-27, N2, GlutaMAX I y Penicilina-Streptomicina. Los cultivos se mantuvieron en incubador a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 días sin el agregado posterior de medio de cultivo.

### 2.3.1.4. Tratamientos experimentales:

Como se observa en la Figura 12 las células obtenidas de cada embrión se sembraron individualmente y a los 3 días *in vitro* (DIV) se realizó un lavado de 2 horas reemplazando el medio por Neurobasal sin aditivos a 37°C. A continuación, y con el objetivo de estudiar la regulación del ARN mensajero de aromatasa (*Cyp19a1*) por diferentes tratamientos hormonales los cultivos neuronales fueron tratados durante 2 horas con E2 (10<sup>-10</sup> M) o DHT (10<sup>-10</sup> M). Para esto se preparó una solución 10<sup>-8</sup> M de cada hormona en Neurobasal y se agregó 10 µl de esta solución por cada 1 ml de medio de cultivo, alcanzando la concentración final deseada. En forma paralela se mantuvieron neuronas de amígdala de cada genotipo durante 2 horas en presencia de Neurobasal sin aditivos (condición control). Luego se procedió a la homogeneización de las células en Trizol y purificación del ARN.



**Figura 12:** Esquema que muestra las condiciones de cultivo y tratamientos empleados para el análisis de la regulación de aromatasa en neuronas de amígdala de los cuatro genotipos. XYM y XXM: machos gonadales. XYH y XXH: hembras gonadales. NB: Neurobasal. E2: 17 $\beta$ -estradiol. DHT: dihidrotestosterona.

### 2.3.1.5. Extracción de ARN y RT-PCR

Luego de los tratamientos se homogeneizaron las células en Trizol. El procedimiento posterior de extracción de ARN, tratamiento con ADNasa y retrotranscripción son similares a los ya descritos en las secciones 2.2.2 a 2.2.4.

### 2.3.1.6. Cuantificación por qPCR

El procedimiento seguido fue similar al descrito en la sección 2.2.5. Se realizó la cuantificación relativa de la expresión de ARN mensajero para aromatasa (*Cyp19a1*) y para los receptores de estrógeno  $\alpha$  (*Esr1*) y  $\beta$  (*Esr2*) y receptor de andrógenos (*Ar*). Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para *Cyp19a1* y *Esr1* se describen en la Tabla 2 de la sección 2.2.5 mientras que los oligonucleótidos para la amplificación de *Esr2* se describen en la Tabla 3

Tabla 3: Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificación de *Esr2*

Gen	Genbank	Secuencia sentido 5'-3'	Secuencia antisentido 5'-3'	Producto (pb)
<b><i>Esr2</i></b>	NM_010157.3	CCTGGTCTGGGTGATTCGA	ACTGATGTCCTGACATGAGAAAG	100

### 2.3.1.7. Esterilización de materiales y soluciones

Todas las soluciones y medios de cultivo empleados se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles con un diámetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). El material de cirugía al igual que el de vidrio fue esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 1 atm de presión.

## 3. CRECIMIENTO AXONAL INDUCIDO POR 17 $\beta$ -ESTRADIOL

Con el propósito de estudiar el rol de los cromosomas sexuales sobre la respuesta sexualmente dimórfica a E2 de neuronas hipotalámicas empleamos el modelo experimental de cultivos transgénicos de hipotálamo ventromedial (HVM; Cambiasso y col., 2000, 1995; Carrer y col., 2005; Scerbo y col., 2014) y evaluamos el efecto del E2 sobre distintos parámetros de la morfología neuronal.

### 3.1. Cultivo primario de HVM

Se realizaron cultivos derivados de embriones de E15 obtenidos del cruzamiento de hembras XXH con machos transgénicos XYM. Los procedimientos empleados para la disección y disociación fueron similares a los ya descritos para cultivos de amígdala (sección 2.3.1). Luego de remover las meninges se disecó el HVM delimitado por el quiasma óptico, los surcos hipotalámicos laterales y los cuerpos mamilares para los cultivos neuronales.

#### 3.1.1. Siembra y mantenimiento

Para los estudios morfométricos las células disociadas derivadas de cada embrión fueron sembradas individualmente en discos de vidrio (12 mm, Assistant) tratados previamente con poly-L-lisina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y ubicados en cápsulas de Petri estériles de 35 mm de diámetro (Corning) conteniendo 1 ml de F10. La densidad final de siembra fue de  $10^4$ - $20^4$  células/cm<sup>2</sup>. Las neuronas se incubaron durante 2 horas a 37°C en una atmósfera saturada de humedad conteniendo aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego los vidrios con las células ya adheridas fueron transferidos y colocados con las células hacia abajo en pocillos individuales de una placa multipocillo estéril (Corning) conteniendo

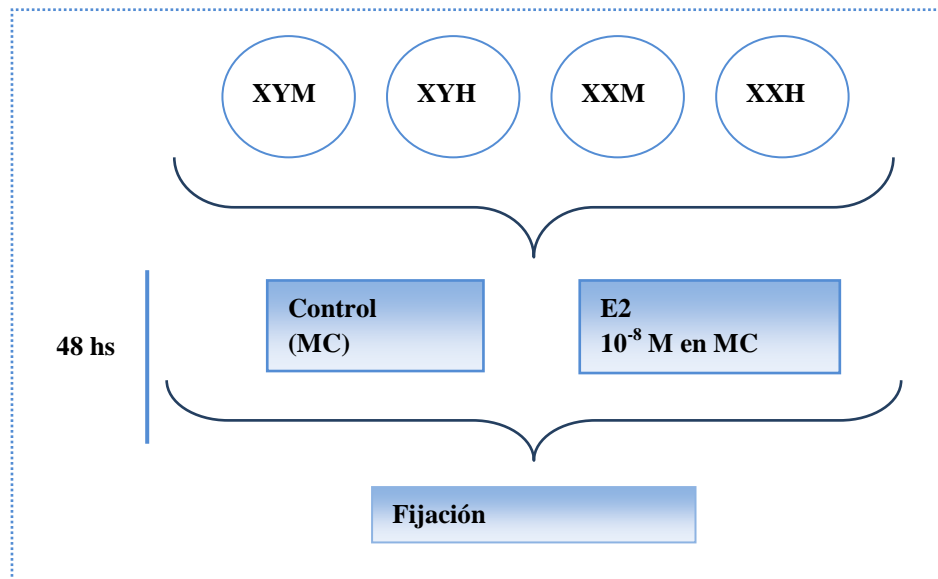
cada pocillo un volumen de 0,5 ml de medio condicionado (MC) por astroglia del mismo sexo. Los cultivos neuronales se mantuvieron en incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 DIV sin el agregado posterior de medio de cultivo.

### 3.1.2. Cultivos gliales

Los cultivos gliales se prepararon a partir de embriones provenientes del cruzamiento de hembras XX con machos XY de la cepa salvaje wt MF1. Una vez obtenido el cerebro embrionario se disecó el mesencéfalo ventral. Para la siembra se agrupó por sexo el tejido nervioso. La siembra se realizó en el fondo de botellas estériles (25 cm<sup>2</sup>, Corning) sin ningún tratamiento previo y conteniendo 4 ml de F10. La densidad inicial de siembra fue alta. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y a las 24 horas se les cambió el medio; esto se repitió cada 5 días. A los 5 días de sembradas se las agitó manualmente para desprender las células superficiales (oligodendrocitos y microglía) y obtener un cultivo compuesto por astrocitos. Se las incubó hasta llegar a formar una monocapa confluyente (alrededor de 15 días). Éstas monocapas fueron utilizadas para condicionar 6,5 ml de medio D-MEM / mezcla de nutrientes Ham F12 (F12) con factores solubles de secreción de las células astrogiales, durante 48 horas. Este medio condicionado por astroglia (MC) fue utilizado para cultivar las neuronas hipotalámicas.

### 3.1.3. Tratamientos experimentales

El esquema experimental utilizado se detalla en la Figura 13. Las células obtenidas de cada embrión se cultivaron en pocillos individuales. Con el objetivo de evaluar el efecto neuritogénico de E2 en cada genotipo se trataron los cultivos con E2 (10<sup>-8</sup> M). Para esto se preparó una solución 10<sup>-6</sup> M de la hormona en agua Mili Q estéril y se agregó al cultivo el volumen necesario para alcanzar la concentración final deseada en el pocillo. Luego de agregar el MC a las neuronas se seleccionaron al azar los pocillos de cada embrión para el tratamiento con E2. En forma paralela se mantuvieron neuronas hipotalámicas de cada embrión durante 48 horas en presencia de MC (condición control).



**Figura 13:** Esquema que muestra las condiciones de cultivo utilizadas para el estudio del efecto neuritogénico del estradiol en neuronas hipotalámicas de los cuatro genotipos. MC: medio condicionado por glía de mesencéfalo ventral del mismo sexo gonadal. XYM y XXM: machos gonadales. XYH y XXH: hembras gonadales. E2: 17 $\beta$ -estradiol.

### 3.1.4. Fijación

Luego del tratamiento experimental, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 20 minutos a 37 °C y mantenidas en PBS a 4 °C hasta el momento de la inmunoreacción.

### 3.1.5. Inmunocitoquímica

Los cultivos de neuronas hipotalámicas fueron marcados inmunocitoquímicamente con el anticuerpo monoclonal contra la proteína  $\beta$ -tubulina clase III. La concentración utilizada se determinó luego de realizar la curva de dilución correspondiente. Tanto el anticuerpo primario como el secundario fueron diluidos en albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS.

Las células fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X100 al 0.2% en PBS durante 6 minutos, lavadas por 5 minutos con PBS y luego incubadas a temperatura ambiente con BSA al 5% en PBS durante 60 minutos. Tras eliminar el exceso de BSA los cultivos se incubaron con el anticuerpo primario durante 12 horas a 4°C en cámara húmeda. Luego de 3 lavados de 5 minutos con PBS, los discos se incubaron con el



anticuerpo secundario biotinilado correspondiente durante 45 minutos a TA. El lavado del anticuerpo secundario se realizó con PBS durante 5 minutos y se incubó con extravidina conjugada con peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente. La visualización de la reacción inmunocitoquímica se realizó utilizando una solución 1,4 mM de DAB en PBS con el agregado de peróxido de hidrogeno. El tiempo de reacción con DAB fue el mismo para todos los discos de una misma serie, deteniéndose la reacción por el agregado de PBS.

Seguidamente, los discos fueron deshidratados colocándolos en soluciones crecientes de etanol (50, 70, 90, 100%), sumergidos en xileno y montados en medio de montaje Entellan (Merck). El procesamiento inmunocitoquímico, la deshidratación y el montaje se realizaron simultáneamente para todos los preparados de un mismo cultivo.

### **3.1.6. Morfometría**

El análisis de los cultivos neuronales se realizó sobre imágenes de video digitalizadas utilizando el procesador de imágenes JAVA (Jandel Inc., Chicago, USA), controlado por una computadora. Las imágenes fueron adquiridas a través de un microscopio de campo claro Zeiss. Se midieron todas las células inmunomarcadas que pudieron ser identificadas como una neurona individual en campos seleccionados al azar a 40 X de magnificación. Se estudiaron distintos parámetros relacionados con la morfología neuronal (longitud neurítica total, longitud media de procesos menores, área del soma, número de neuritas primarias, longitud de axón, cantidad de ramificaciones del axón y de las neuritas). Utilizando el cursor de la computadora se siguió el recorrido del proceso neurítico desde que emerge del soma neuronal hasta su porción más distal; esto se define como longitud de un proceso. Mediante criterios morfológicos (Díaz y col., 1992; Dotti y col., 1988) se define la identidad de dicho proceso: procesos menores, son 2 ó 3 neuritas cortas que emergen del cuerpo celular; axón, es una neurita única, de al menos 100  $\mu\text{m}$  y más larga que el resto de las neuritas, delgada y de diámetro relativamente uniforme. Para cada grupo experimental se midieron 60 células pertenecientes a no menos de tres cultivos. Las observaciones se realizaron sin que el operador conozca el genotipo y grupo experimental analizado. Solamente se cuantificaron células cuyas neuritas pudieron ser identificadas en toda su extensión.

## **4. EXPRESIÓN DE Ngn3**

### **4.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión sexualmente dimórfica de Ngn3.**

Con el fin de evaluar el rol del complemento cromosómico sexual sobre la expresión sexualmente dimórfica de Ngn3 antes del período crítico se utilizaron cultivos primarios de HVM de los cuatro genotipos y a los 3 DIV se evaluó la expresión del ARNm por qPCR.

### **4.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la regulación de la expresión de Ngn3 por E2**

Luego de determinar si hay diferencias de expresión de Ngn3 entre los cuatro genotipos se procedió a evaluar la regulación por E2 *in vitro* con el fin de determinar si el complemento cromosómico sexual de las células influye en el efecto de E2.

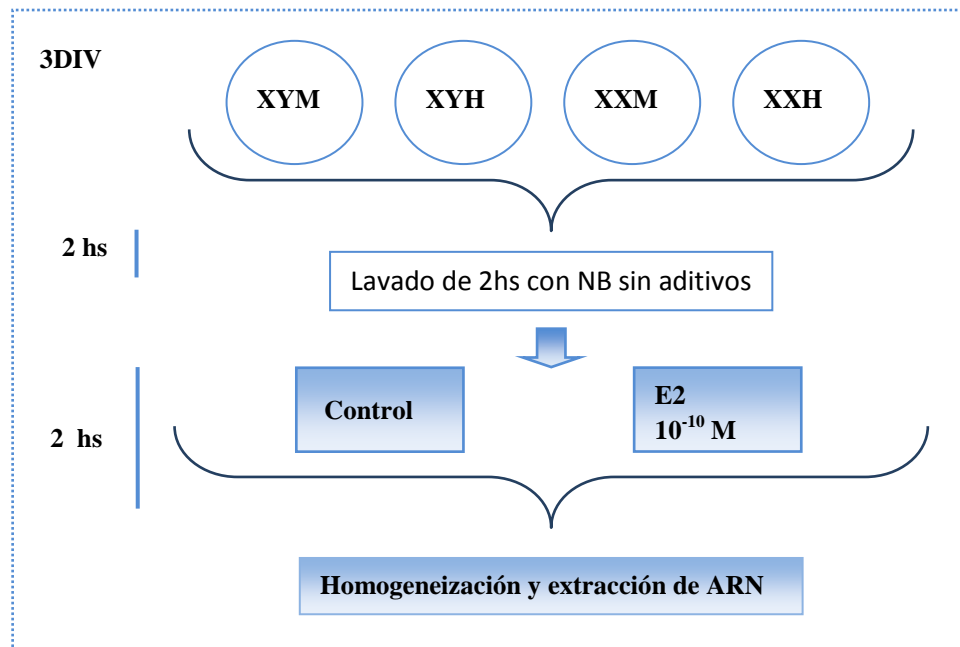
#### **4.2.1. Cultivo primario de HVM**

Se realizaron cultivos derivados de embriones E15 obtenidos del cruzamiento de hembras XXH con machos transgénicos XYM. Los procedimientos empleados para la disección y disociación fueron similares a los ya descritos en secciones anteriores. Luego de remover las meninges se disecó el HVM. Las células disociadas derivadas de cada embrión se sembraron individualmente por tratarse de cultivos transgénicos. La siembra y mantenimiento de los cultivos fue similar a lo descrito para cultivos de amígdala (sección 2.3.1.3).

#### **4.2.2. Tratamientos experimentales**

Después de 3 DIV, se realizó un lavado de 2 horas reemplazando el medio por Neurobasal sin aditivos a 37°C. A continuación, y con el objetivo de estudiar la regulación del ARN mensajero de Ngn3 por E2 los cultivos neuronales fueron tratados durante 2 horas con E2 ( $10^{-10}$  M). Para esto se preparó una solución  $10^{-8}$  M de la hormona en Neurobasal y se agregó 10  $\mu$ l de esta solución por cada 1 ml de medio de cultivo, alcanzando la concentración final deseada. En forma paralela se mantuvieron neuronas de hipotálamo de cada genotipo durante 2 horas en presencia de Neurobasal

sin aditivos (condición control). Luego se procedió a la homogeneización de las células en Trizol y purificación del ARN (Figura 14).



**Figura 14:** Esquema que muestra las condiciones de cultivo utilizadas para el análisis de la expresión de Ngn3 en neuronas de hipotálamo ventromedial y su regulación por estradiol. NB: Neurobasal. XYM y XXM: machos gonadales. XYH y XXH: hembras gonadales. E2: 17 $\beta$ -estradiol.

### 4.3. Receptores involucrados en la regulación de Ngn3 en neuronas hipotalámicas

Con el fin de determinar el mecanismo por el cual E2 incrementa la expresión de Ngn3 en neuronas de machos se emplearon cultivos derivados de embriones machos de la cepa wt y se evaluó el efecto del agregado de agonistas y antagonistas específicos de los receptores de estrógeno clásicos ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  y del receptor de membrana acoplado a proteína G: GPR/ GPR30. En todos los casos se comparó con el incremento en la expresión de Ngn3 producido por E2.

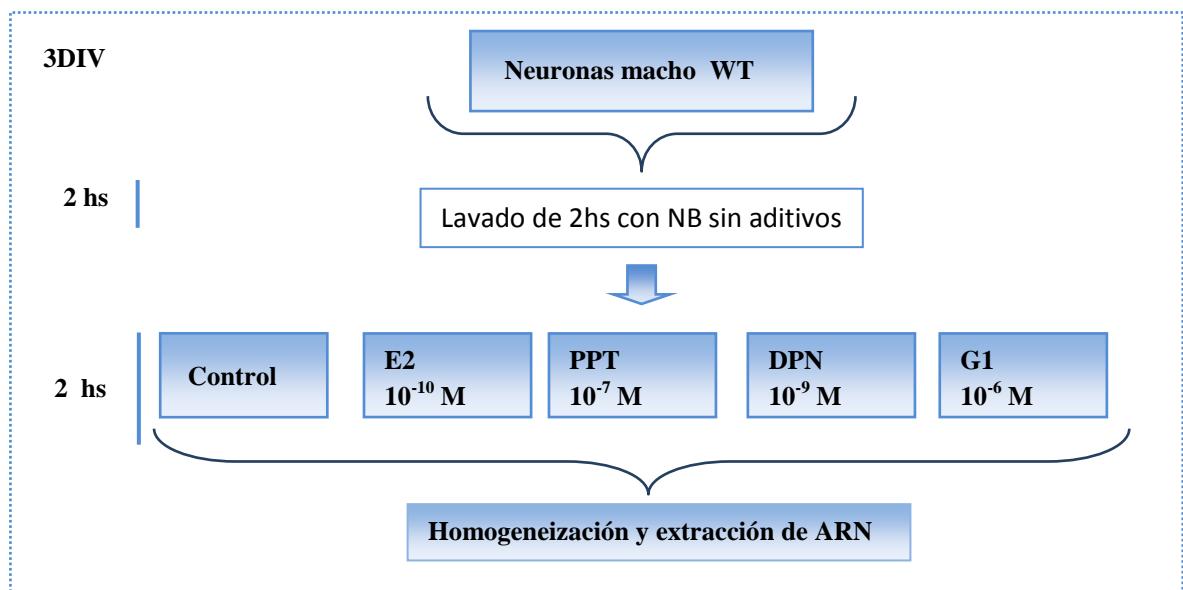
#### 4.3.1. Cultivo primario de HVM de embriones macho wt

Se realizaron cultivos derivados de embriones E15 obtenidos del cruzamiento de animales wt. Los procedimientos empleados para la disección y disociación fueron similares a los ya descritos en secciones anteriores. Luego de remover las meninges se

disecó el HVM (ver sección 3.1). Únicamente se utilizaron los embriones macho cuyo fenotipo gonadal se determinó por la observación de la arteria espermática bajo lupa bajo lupa estereoscópica. Se agrupó el tejido nervioso obtenido de todos los embriones machos de la camada y luego las células disociadas se sembraron y mantuvieron en cultivo siguiendo el procedimiento descrito para cultivos de amígdala (sección 2.3.1.3).

#### 4.3.2. Tratamientos experimentales

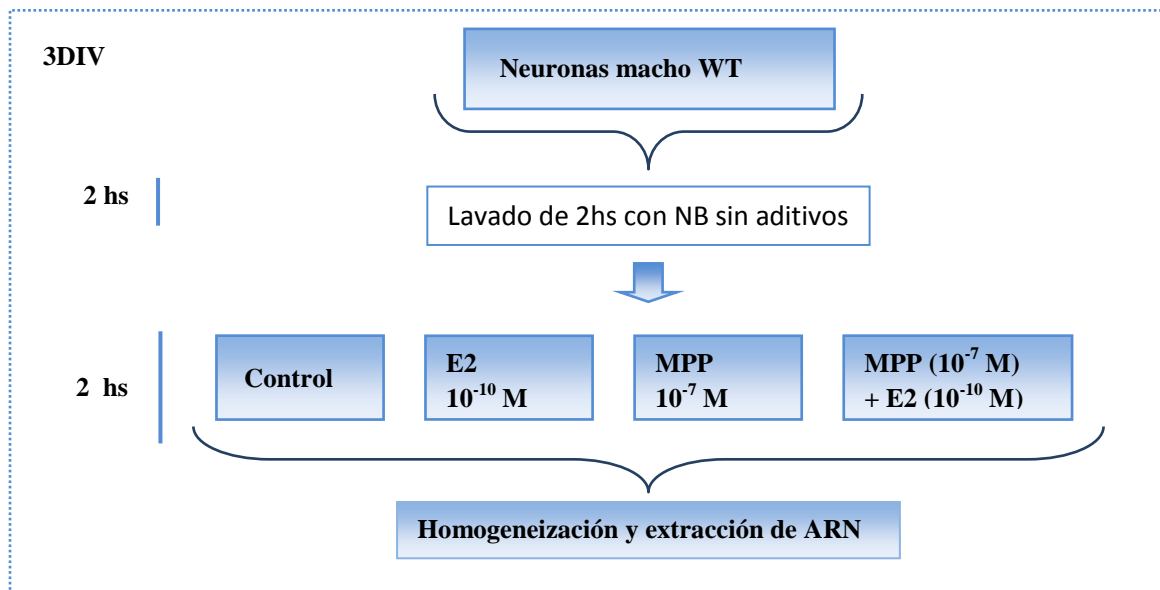
A los 3 DIV se reemplazó el medio de cultivo por Neurobasal sin aditivos y luego de 2 horas se trataron algunas capsulas con agonistas selectivos para receptores de estrógeno (Figura 15): agonista selectivo de los ER $\alpha$ : propil-pirazol-triol (PPT), agonista selectivo de los ER $\beta$ : diarilpropionitrilo (DPN), agonista selectivo del receptor GPR30: G1.



**Figura 15:** Esquema que muestra las condiciones de cultivo utilizadas para el análisis de la regulación de Neurogenina 3 en neuronas de hipotálamo ventromedial de embriones macho. NB: Neurobasal, PPT: Agonista selectivo de ER- $\alpha$ , DPN: agonista selectivo de ER- $\beta$ , G1: agonista selectivo del receptor GPR30. E2: 17 $\beta$ -estradiol.

Luego de la evaluación de los resultados obtenidos con agonistas específicos se procedió a tratar los cultivos con el antagonista específico para el ER $\alpha$ : 1,3-bis (4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidinil-etoxi) fenol]-1H-pirazol dihidrocloruro (MPP;

Figura 16. Las concentraciones empleadas fueron determinadas previamente por curva de dosis-respuesta y por trabajos previos de nuestro laboratorio (Gorosito y col., 2008).



**Figura 16:** Esquema que muestra las condiciones de cultivo utilizadas para el análisis de la regulación de Neurogenina 3 en neuronas de hipotálamo ventromedial de embriones macho. NB: Neurobasal, MPP: antagonista específico de ER- $\alpha$ , E2: 17 $\beta$ -estradiol.

#### 4.3.3. Extracción de ARN y RT-PCR

Luego de los tratamientos se homogeneizaron las células en Trizol. El procedimiento posterior de extracción de ARN, tratamiento con ADNasas y retrotranscripción son similares a los ya descritos en las secciones 2.2.2 a 2.2.4.

#### 4.3.4. Cuantificación por qPCR

Con el fin de evaluar la expresión del ARN mensajero del gen *Ngn3*, se realizó una cuantificación por PCR en Tiempo Real utilizando cebadores y sondas diseñados a demanda (Assay-on-Demand<sup>TM</sup>, Applied Biosystems) para la amplificación específica del gen de *Ngn3*, empleando *Gapdh* como gen endógeno calibrador (Applied Biosystems). Cada muestra se amplificó por duplicado usando Taqman Universal Master Mix (Invitrogen) en un volumen final de 15 $\mu$ l. La amplificación se llevó a cabo en StepOne<sup>TM</sup> Real Time PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo [50 °C 2 min, 95 °C 10 min] y 40 ciclos [95 °C 15 s,

60°C 1 min]. Los niveles de expresión relativa del ARN mensajero para Ngn3 se calcularon utilizando el método de  $\Delta\Delta C_t$  con el programa StepOne™ Software v2.2.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante análisis de varianza (ANOVA) de una, dos y tres vías, seguido de comparaciones post-hoc de las medias con el test LSD Fisher. La variable porcentaje de área cubierta por ARO-ir fue transformada para ajustar a una distribución normal. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa STATISTICA (StatSoft). La diferencia se consideró significativa cuando las medias mostraron una  $p < 0,05$ .

## 6. MATERIALES UTILIZADOS

### 6.1. Soluciones y buffers.

- **Solución salina Hanks:** HEPES 10 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, Glucosa, 5,55 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,33 mM.
- **GlutaMAX® 100X:** Invitrogen.
- **Solución Buffer Borato:** Borax 12 mM, Acido Bórico 50 mM, pH 8,5
- **PBS:** NaCl 145 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  90 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  13 mM, pH 7,4.
- **TBE (10 X):** contiene Tris base 1M, ácido bórico 0,9M y EDTA 0.5 M pH 8.
- **Buffer de lisis:** contiene NaCl 2,5 M, Tris 1M, EDTA 0,5 M pH 8 y SDS 10%.

### 6.2. Medios de cultivo

- **F10:** Medio esencial mínimo modificado por Dulbecco sin rojo fenol (DMEM) con el agregado de glucosa al 2,2 %, 1 ml de GlutaMAX®, 1  $\mu\text{l}/\mu\text{l}$  de penicilina-estreptomicina y suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), pH 7,4.
- **F12:** Medio basal DMEM/mezcla de nutrientes Ham F-12 (1:1), con el agregado de glucosa al 4 %, 1 ml de GlutaMAX® 100X y 1  $\mu\text{l}/\mu\text{l}$  penicilina-estreptomicina.
- **Neurobasal sin rojo fenol:** Invitrogen. Medio de cultivo que permite el mantenimiento de poblaciones homogéneas de células neuronales tanto a cortos

como largos periodos de tiempo. No contienen L-glutamina, ácido L-glutámico o ácido aspártico.

- **Suplemento N2:** Invitrogen. Contiene proteínas, como transferrina humana e insulina recombinante; y otros componentes, como progesterona, putrescina y selenita.
- **Suplemento B27:** Invitrogen. Contiene vitaminas, proteínas y otros componentes como corticosterona, progesterona, putrescina, selenita, entre otros.

### 6.3. Antibióticos

- Penicilina (5000 µl/ml)-Streptomycin (5000 U/ml) - Gibco.

### 6.4. Reactivos y enzimas

- Power sybr green pcr master mix: Invitrogen.
- Trizol: Invitrogen.
- ADNasa I: Fermentas.
- Random primers: Oligonucleótidos de secuencias aleatorias, Byodynamics.
- dNTP: Fermentas.
- SuperScript II: Invitrogen.
- Proteinasa K: Promega
- Taq DNA Polimerasa: Fermentas
- Complejo ABC: Vector, Burlingame, CA.
- Extravidina-peroxidasa: Sigma-Aldrich.
- Poly-L-lysina: Sigma Aldrich.

### 6.5. Anticuerpos

#### 6.5.1. Anticuerpos primarios

- Anti  $\beta$ -tubulina isotipo III, clon SDL.3D10, Sigma-Aldrich.
- Anti-aromatasa: Reconoce una porción de 15 aminoácidos correspondiente a los residuos 488–502 de aromatasa de ratón (García-Segura y col., 1999). La especificidad de este anticuerpo ha sido previamente descrita (García-Segura y col., 1999; Yague y col., 2010, 2008), reconoce la aromatasa murina, humana y

de monos. Producido en el Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Técnicas (CSIC; Madrid, España).

- Anti NeuN: MAB 377, Chemicon, Temecula, CA

### **6.5.2. Anticuerpos secundarios**

- Anti-ratón conjugado con peroxidasa, desarrollado en cabra. Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
- Anti-conejo conjugado con biotina, desarrollado en burro. Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
- Anti-conejo conjugado con alexa verde (488nm), desarrollado en burro. Invitrogen.
- Anti ratón conjugado con alexa rojo (564 nm), desarrollado en burr. Invitrogen.

### **6.6. Agonistas y antagonistas**

- Propil-pirazol-triol (PPT): agonista selectivo de ER- $\alpha$ . Tocris Bioscience.
- Diarilpropiolnitrilo (DPN): agonista selectivo de ER- $\beta$ . Tocris Bioscience.
- G1: agonista selectivo del receptor GPR30. Calbiochem,
- 1,3-bis (4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidinil-etoxi) fenol]-1H-pirazol dihidrocloruro (MPP): antagonista específico de ER $\alpha$ . Tocris Bioscience.

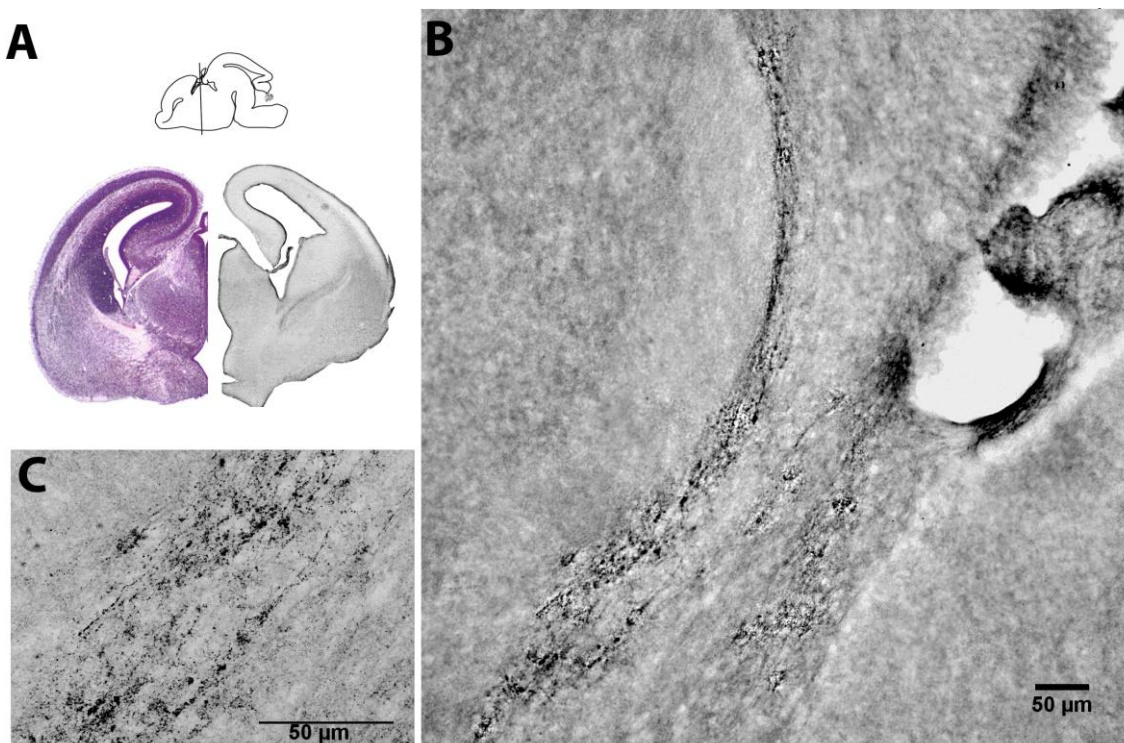


# RESULTADOS

## 1. EXPRESIÓN DE AROMATASA

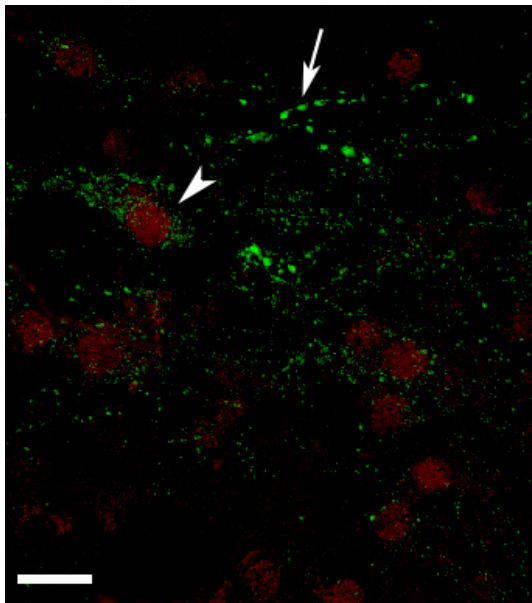
### 1.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión de la proteína

El estudio neuroanatómico del cerebro embrionario se realizó de acuerdo al atlas de ratón prenatal de Uta Schambra (2008). La evaluación inmunohistoquímica del cerebro entero de ratón MF1 de la cepa salvaje wt evidenció que la inmunoreactividad específica para aromatasa (ARO-ir) se presenta en grupos discretos que abarcan el núcleo paraventricular hipotalámico, la estría terminalis y el área amigdalina anterior. Se observó que estos subgrupos neuronales continúan caudalmente con la ARO-ir presente en amígdala medial y central. En la figura 17 se observa el patrón de expresión en estría terminalis donde se puede observar la ARO-ir en pericarion y proyecciones neuronales.



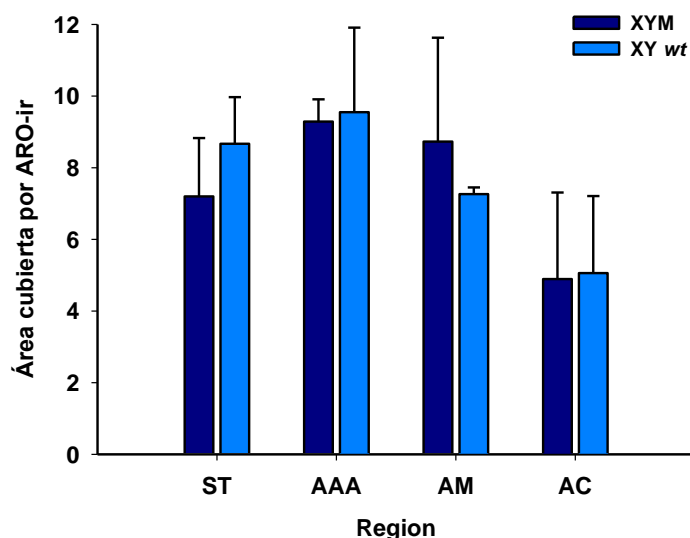
**Figura 17: Patrón de expresión de la inmunoreactividad específica para aromatasa en cortes coronales de cerebro de embriones de E16.** A) Esquema donde se muestra la ubicación del corte coronal en el cerebro de ratón de 16 días de gestación. Paralelismo entre la sección correspondiente al plano coronal 15 del Atlas de Ratón Prenatal (Schambra, 2008) donde se observa el patrón de expresión de aromatasa en el arco medial preopticoamigdalino de la estría terminalis; B) Sección coronal representativa de la estría terminalis donde se observa el patrón de expresión de las células aromatasa-positivas; C) Magnificación de una porción del área representada en B donde se puede observar el soma neuronas positivas para aromatasa rodeadas de proyecciones neuronales.

La inmunomarcación en amígdala medial se caracterizó como un grupo densamente teñido y empaquetado que corresponde al grupo de neuronas aromatasa-positivas presentes en amígdala posterodorsal descrito por Shinoda y col. (1994). En conjunto la ARO-ir observada se corresponde con el grupo neuronal pre-óptico amigdalino que se extiende a lo largo del lado medial del arco post comisural de la estría terminalis (Shinoda y col., 1994). La co-localización de aromatasa con marcadores neuronales indicó el fenotipo neuronal de las células positivas para aromatasa (Figura 18). En ausencia del anticuerpo primario no se detectó inmunomarcación.



**Figura 18:** Microfotografía de máxima proyección en el eje Z obtenidas por microscopía confocal (FV300) demostrando co-localización de aromatasa (verde) y NeuN (rojo) en cerebro de ratón recién nacido. Se observa un soma neuronal positivo para aromatasa y para NeuN (cabeza de flecha) y proyecciones neuronales positivas para aromatasa (flecha). Escala: 10  $\mu\text{m}$

El análisis estadístico del área cubierta por ARO-ir demostró que no existen diferencias significativas en la expresión de ARO entre individuos XY de la cepa salvaje y XYM de la cepa transgénica (Figura 19).

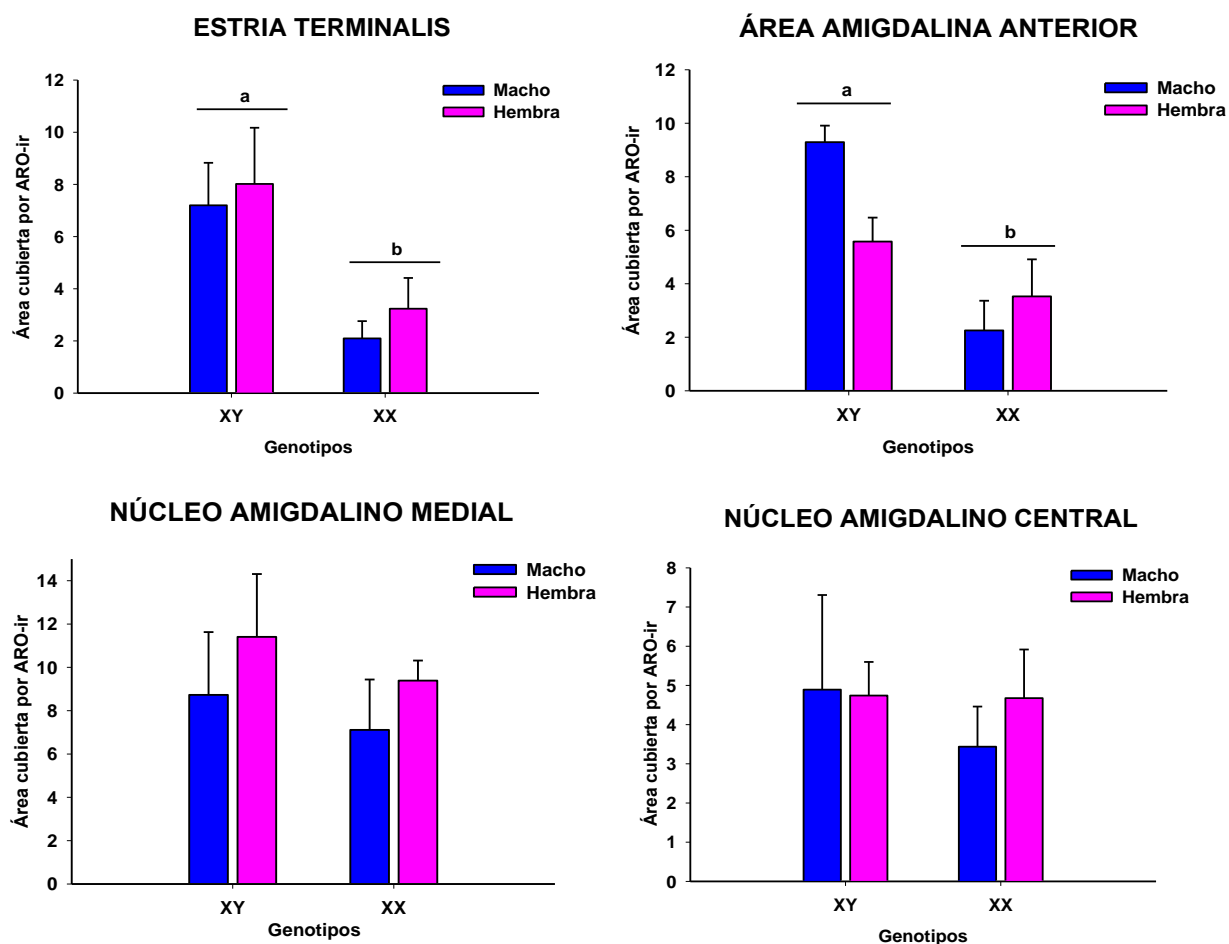


**Figura 19:** Área cubierta por la inmunoreactividad para aromatasa en estría terminalis (ST), área amigdalina anterior (AAA), amígdala medial (AM) y central (AC) de ratones de 16 días de gestación separados según genotipo. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. XYM: machos transgénicos del modelo de los cuatro genotipos; XY wt: machos de la cepa salvaje. ARO-ir: inmunoreactividad específica para aromatasa, n=4 embriones.

La aromatización de testosterona a E2 en cerebro es un pre requisito para la diferenciación sexual del cerebro (MacLusky y Naftolin, 1981). La existencia de un dimorfismo sexual en la expresión de aromatasa a E16 (Beyer y col., 1994b, 1993; Colciago y col., 2005; P. Negri-Cesi y col., 2001) antes del aumento significativo en la secreción de la T gonadal (O'Shaughnessy y col., 2006, 1998) sugiere el posible efecto de los cromosomas sexuales en la regulación de su expresión. Debido a la alta inmunoreactividad observada en la estría terminalis y regiones amigdalinas se escogieron estas áreas para evaluar el rol del complemento cromosómico sexual.

El análisis de los niveles de ARO-ir en cerebros de los cuatro genotipos de E16 reveló un efecto principal debido al complemento cromosómico en estría terminalis ( $F_{1,11}=10,50$ ;  $p=0,008$ ) y área amigdalina anterior ( $F_{1,11}=12,52$ ;  $p=0,005$ ). El análisis *post hoc* indicó que, independientemente del estatus gonadal, los individuos XY tuvieron mayor expresión de ARO-ir que individuos XX en estas áreas (XYM y XYH > XXM y XXH;  $p<0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas debidas al sexo

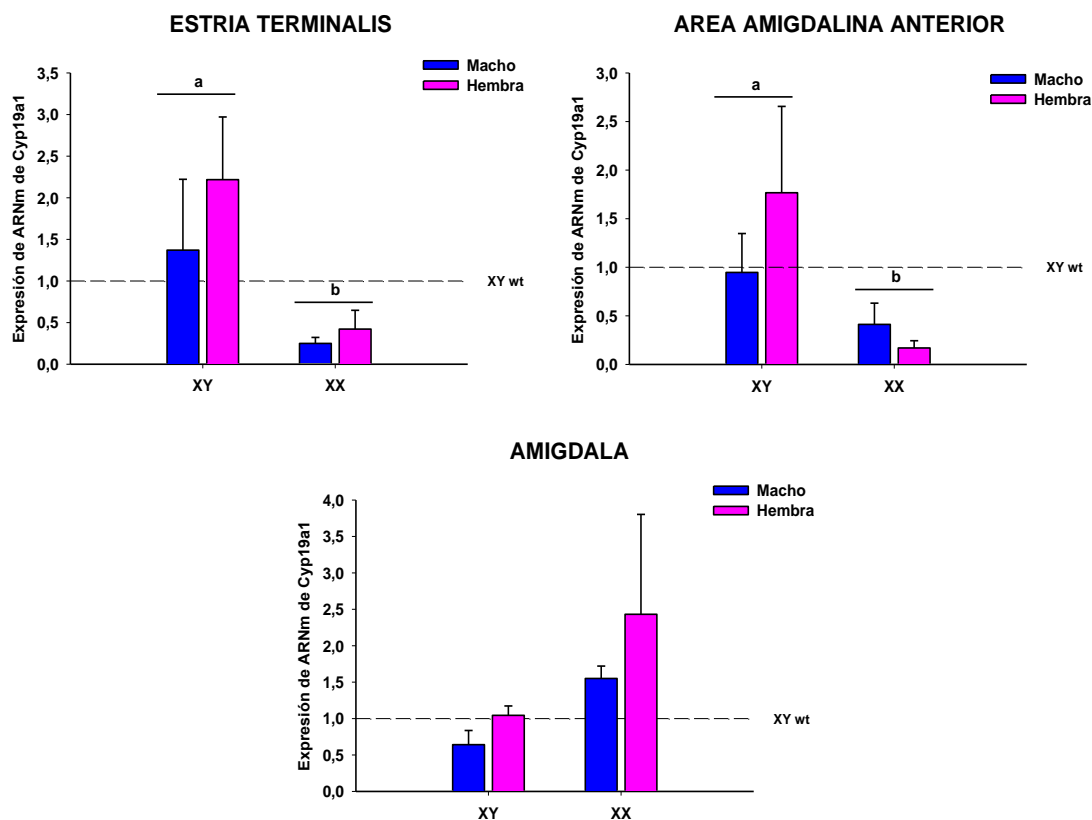
gonadal o a su interacción con el complemento cromosómico sexual en y área amigdalina anterior. La cuantificación y análisis de ARO-ir en amígdala medial y amígdala central no evidenció diferencias significativas entre los cuatro genotipos (Figura 20).



**Figura 20:** Cuantificación relativa de la inmunoreactividad para aromatasa en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. Los individuos XY expresaron mayores niveles de aromatasa en estría terminalis y área amigdalina anterior. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,05$ . XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales. ARO-ir: inmunoreactividad específica para aromatasa,  $n=4$  embriones.

## 1.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión del ARN mensajero de aromatasa y de otros genes implicados en la síntesis de neuroesteroides

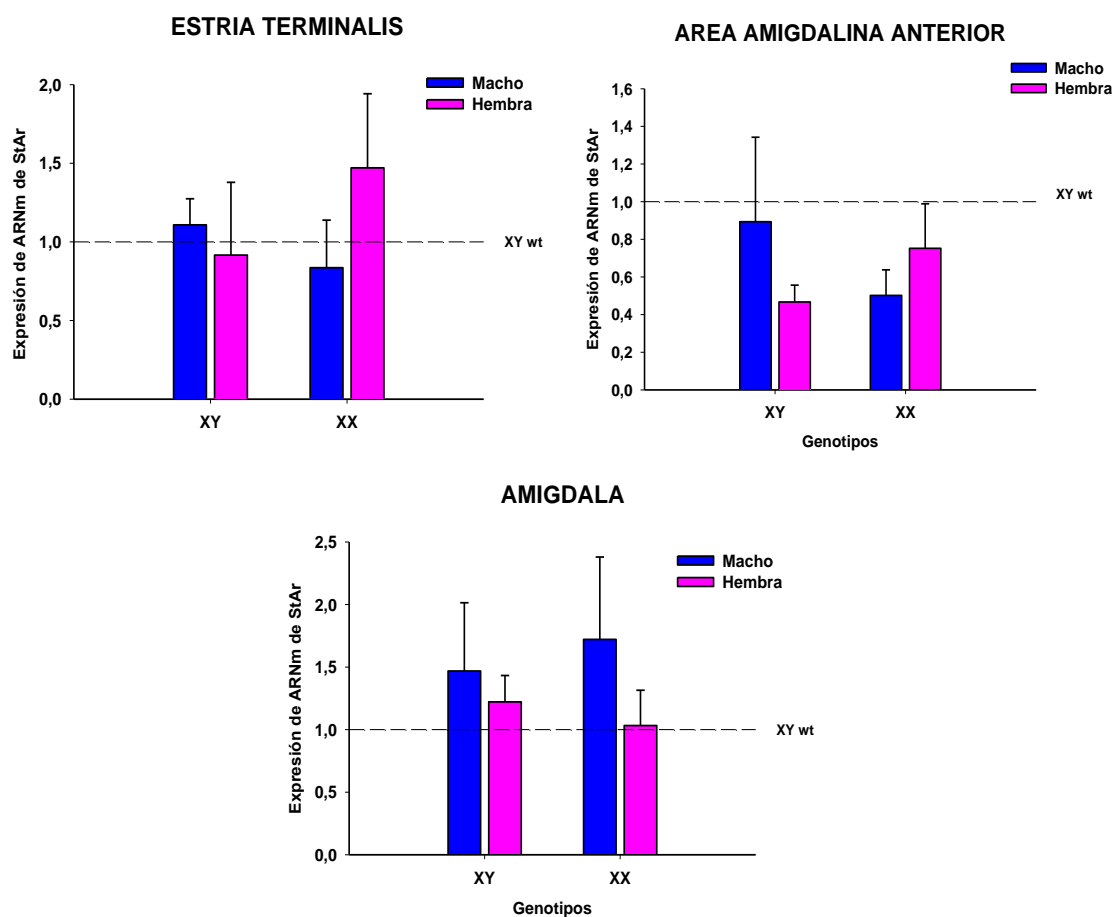
Con el propósito de comparar la abundancia de la proteína con la expresión del ARN mensajero (ARNm) se estudió por qPCR la expresión de *Cyp19a1* en los núcleos positivos para aromatasa. El ANOVA a dos vías no reveló diferencias debidas al estatus gonadal o a la interacción sino que, al igual que lo observado para la proteína, se encontró un efecto principal debido al complemento cromosómico sexual en estría terminalis ( $F_{1,8}=6,31$ ;  $p=0,036$ ) y área amigdalina anterior ( $F_{1,13}=5,23$ ;  $p=0,039$ ). Los individuos XY (machos y hembras gonadales) tuvieron mayor expresión de *Cyp19a1* que individuos XX (machos y hembras;  $p<0,05$ ; Figura 21).



**Figura 21:** Niveles del ARNm de *Cyp19a1* en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. Los individuos XY expresaron mayores niveles de *Cyp19a1* en estría terminalis y área amigdalina anterior. La normalización se realizó con individuos XY wt (línea cortada). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p<0,05$ . XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales,  $n=3-5$  embriones de cada genotipo.

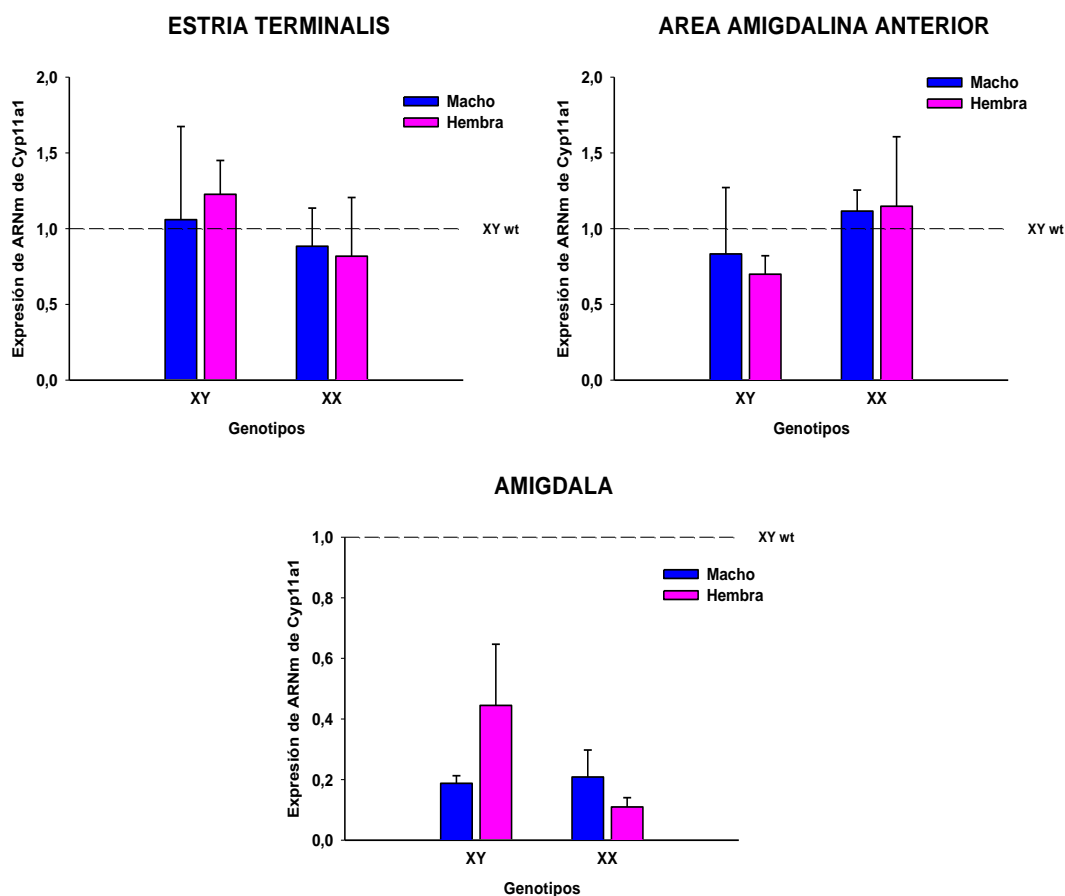
Asimismo, no se encontraron diferencias entre los cuatro genotipos en las regiones más posteriores de la amígdala (amígdala medial y central; Figura 21).

Con el fin de evaluar si las regiones inmunoreactivas para aromatasa expresan también otras moléculas necesarias para iniciar la síntesis de neuroesteroides y encargadas de generar en el cerebro los precursores de T utilizada como sustrato de aromatasa estudiamos el rol del complemento cromosómico sexual en la expresión del ARNm del transportador StAR y de la enzima *Cyp11a1* en estas áreas. De acuerdo a resultados previos *Star* y *Cyp11a1* se expresan tempranamente en cerebro en desarrollo (Compagnone y col., 1995; Pezzi y col., 2003; Sierra y col., 2003) e incluso sus transcritos de ARN co-localizan en giro dentado del hipocampo y células de purkinje (Furukawa y col., 1998; King y col., 2002).



**Figura 22:** Niveles de ARNm de StAR en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. La normalización se realizó con individuos XY wt (línea cortada). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales, n=3-5 embriones.

Los niveles de ARNm de *Star* y *Cyp11a1* fueron detectables por qPCR en todas las regiones analizadas sin embargo, no se encontraron diferencias entre los cuatro genotipos indicando que a E16 en estría terminalis, área amigdalina anterior y amígdala el complemento cromosómico sexual y el estatus gonadal no afectan la expresión de estos genes (Figuras 22 y 23).



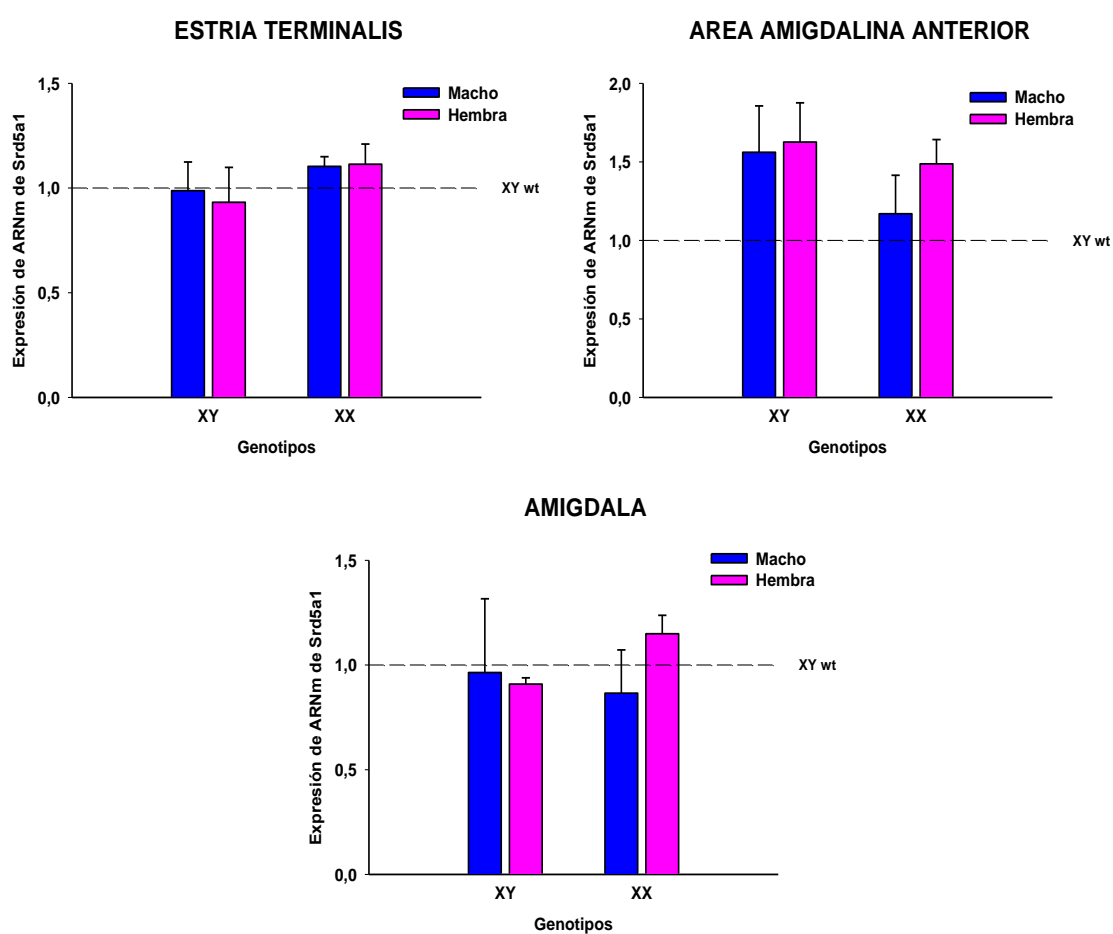
**Figura 23:** Niveles de ARNm de *Cyp11a1* en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. La normalización se realizó con individuos XY wt (línea cortada). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales, n=3-5 embriones.

Debido que las enzimas  $5\alpha$ -Red tipo I y II pueden metabolizar la testosterona para convertirla en DHT, un metabolito androgénico más activo que y a su vez que ha sido implicado en la masculinización de algunas regiones del cerebro (Goto y col.,

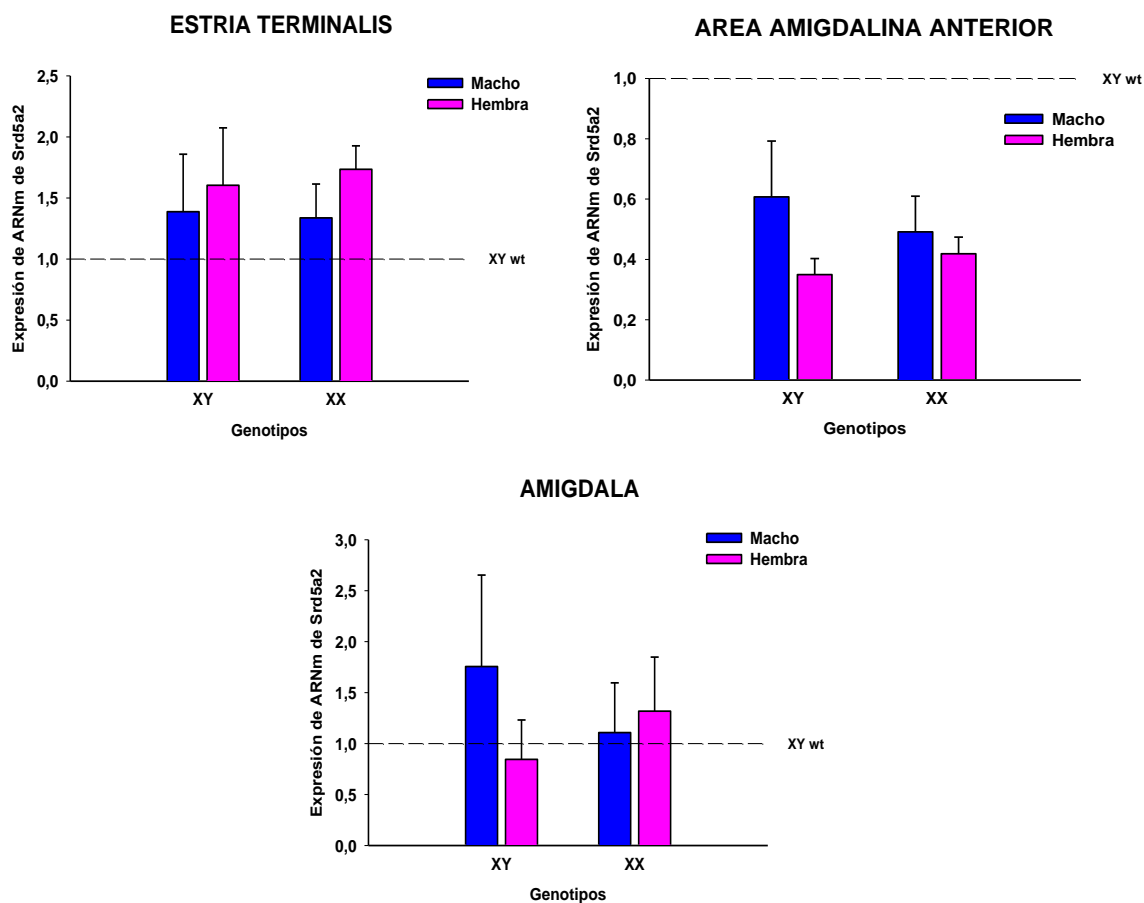


2005; Ribeiro y Pereira, 2005) se evaluó la expresión del ARNm de *Srd5a1* y *Srd5a2* en las regiones positivas para aromatasa.

La expresión de *Srd5a1* y *Srd5a2* no mostró diferencias significativas entre los genotipos indicando que a E16 en estría terminalis, área amigdalina anterior y amígdala el complemento cromosómico sexual y el estatus gonadal no afectan la expresión de estos genes (Figuras 24 y 25).



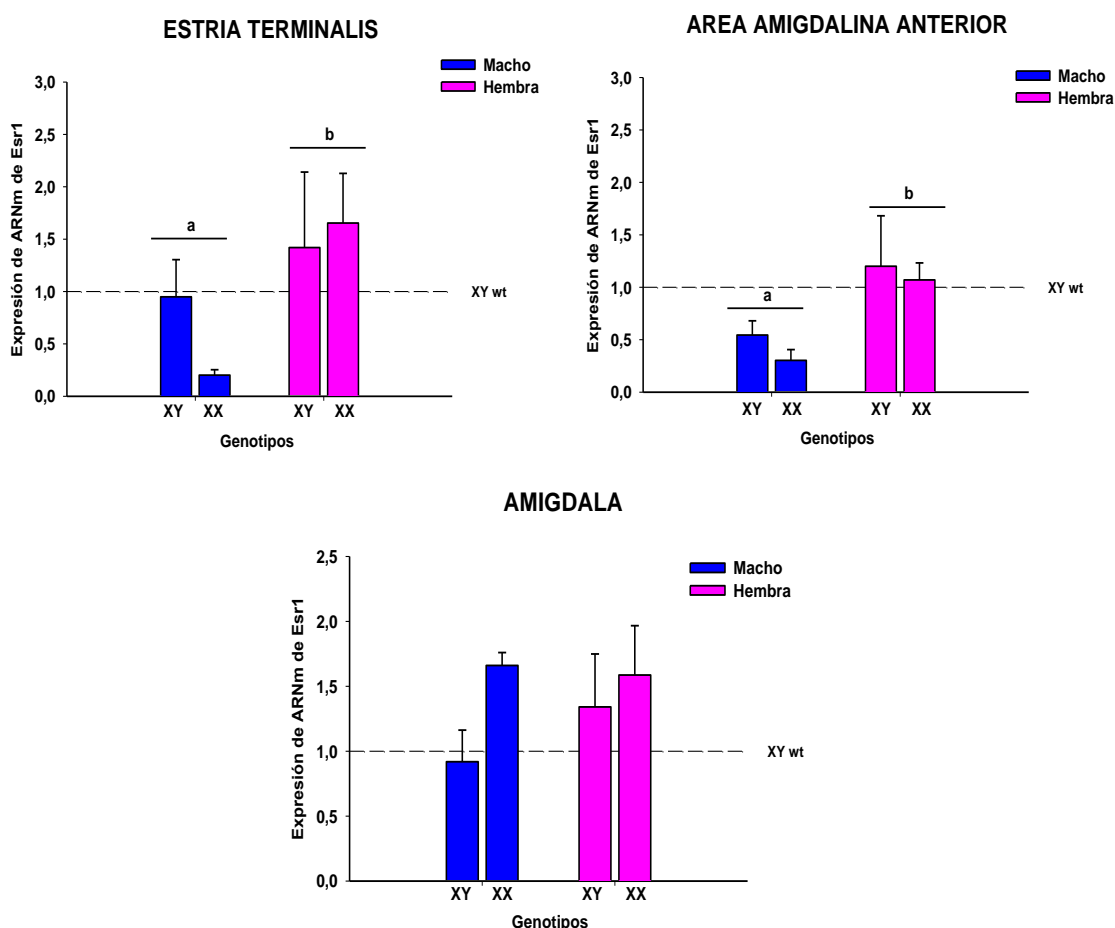
**Figura 24:** Niveles de ARNm de *Srd5a1* en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. La normalización se realizó con individuos XY wt (línea cortada). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales, n=3-5 embriones.



**Figura 25:** Niveles de ARNm de *Srd5a2* en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. La normalización se realizó con individuos XY wt (línea cortada). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales, n=3-5 embriones.

Se conoce que en las regiones positivas para aromatasa también se expresan los receptores de hormonas esteroideas (Simerly y col., 1990). Debido a que los resultados mostraron que el complemento cromosómico sexual determina la expresión de aromatasa antes de que el cerebro haya sido expuesto *in utero* a hormonas gonadales se evaluó la hipótesis de que el complemento cromosómico sexual también afecte la expresión de los receptores ER- $\alpha$  y AR.

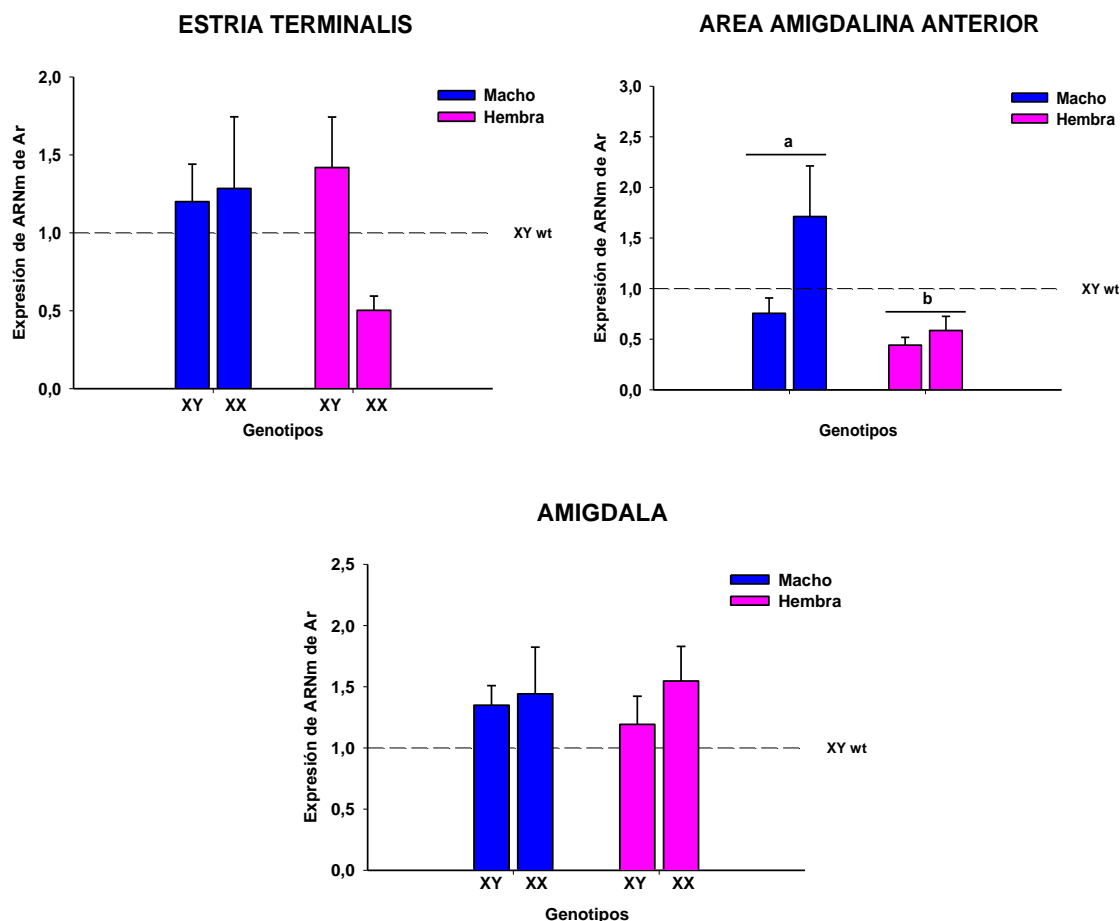
La expresión de ER- $\alpha$  en estría terminalis mostró un efecto principal debido al estatus gonadal (presencia de gen Sry) ( $F_{1,9}=5,06$ ;  $p=0,05$ ). Se encontró un resultado similar en área amigdalina anterior ( $F_{1,8}=7,09$ ;  $p=0,029$ ). Es decir, los machos gonadales (XYM y XXM) tuvieron menor expresión de ER- $\alpha$  que las hembras (XYH y XXH;  $p<0,05$ ). Por último, la expresión de ER- $\alpha$  no mostró diferencias entre los genotipos en amígdala (Figura 26).



**Figura 26** Niveles de ARNm de *Esr1* en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. Los machos gonadales presentaron menor expresión de *Esr1* que las hembras gonadales en estría terminalis y área amigdalina anterior. La normalización se realizó con individuos XY wt (línea cortada). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p<0,05$ . XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales,  $n=3-5$  embriones.

El análisis de expresión génica de AR mostró también que en área amigdalina anterior la presencia del gen Sry determina diferencias entre los cuatro genotipos ( $p<0,05$ ). Los machos gonadales (XYM y XXM) tuvieron mayor expresión de AR que

las hembras gonadales (XYH y XXH) en área amigdalina anterior ( $F_{1,9}=7,86$ ;  $p=0,021$ ). En estría terminalis y amígdala no se encontraron diferencias entre los genotipos (Figura 27).



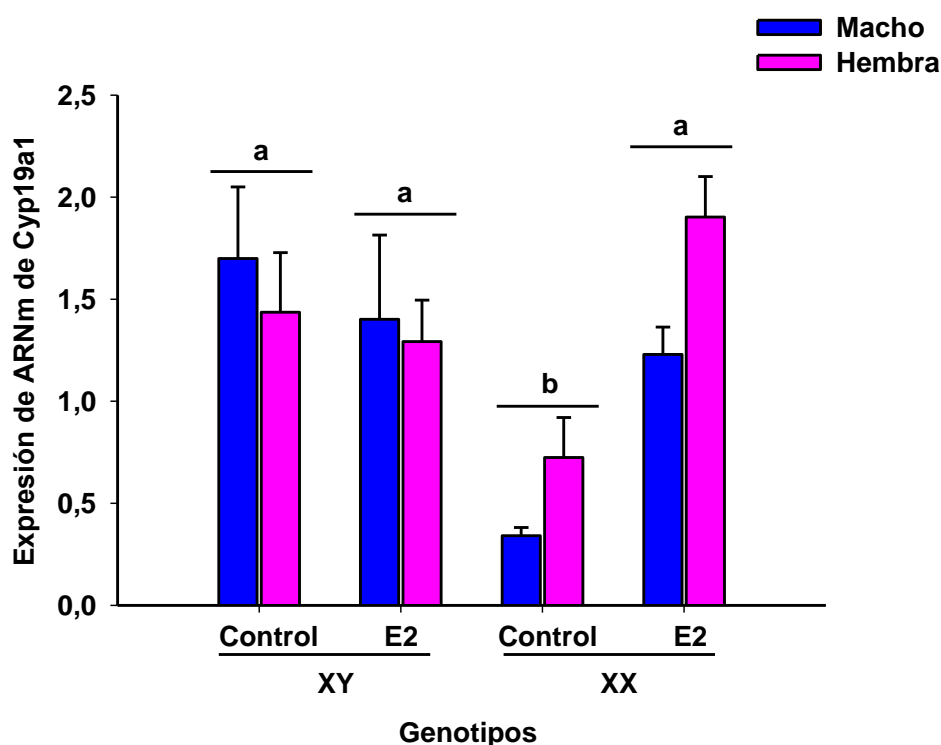
**Figura 27:** Niveles de ARNm de *Ar* en estría terminalis y regiones amigdalinas de ratones de 16 días de gestación separados según sexo y genotipo. Los machos gonadales presentaron mayor expresión de *Ar* que las hembras gonadales en área amigdalina anterior. La normalización se realizó con individuos XY wt (línea cortada). Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,05$ . XYH y XXH: hembras gonadales, XYM y XXM: machos gonadales,  $n=3-5$  embriones.

### 1.3. Rol del ambiente hormonal en la regulación de aromatasa *in vitro*

Los esteroides sexuales regulan la expresión de aromatasa en cerebro. Existen evidencias de que E2 y T o DHT pueden incrementar los niveles de ARNm de aromatasa en algunas regiones del cerebro en desarrollo (Beyer y col., 1994b; P Negri-

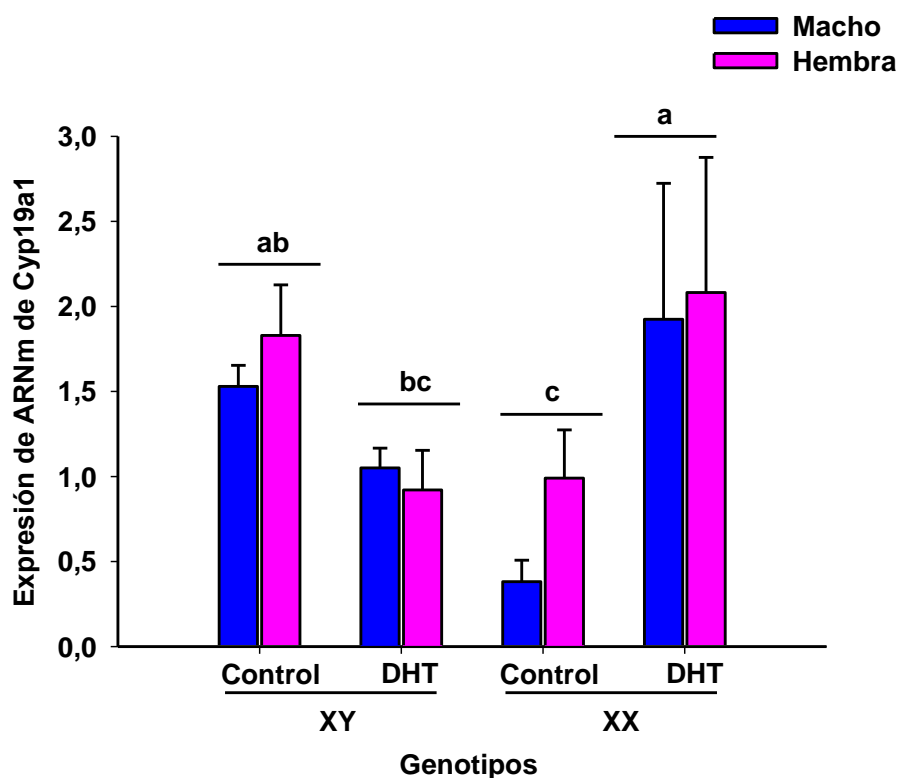
Cesi y col., 2001) mientras que en otras áreas no tienen efecto (Beyer y col., 1994b). Debido a que la expresión de aromatasa es sexualmente dimórfica antes de la acción organizadora por esteroides gonadales *in vivo* y de acuerdo a nuestros resultados en cerebro de ratones FCG de E16 esta expresión sexualmente dimórfica fue diferente entre cerebros XX y XY nos propusimos evaluar por qPCR si el complemento cromosómico sexual determina un efecto diferencial de los esteroides sobre la expresión de aromatasa en cultivos neuronales de amígdala anterior.

En los cultivos tratados con E2 el ANOVA a tres vías (sexo x genotipo x tratamiento) reveló un efecto principal de la interacción genotipo x tratamiento ( $F_{1,32}=8,95$ ;  $p=0,005$ ). Es decir que el tratamiento con E2 resultó en un incremento significativo en los niveles de ARNm de *Cyp19a1* ( $p<0,01$ ) únicamente en los cultivos portadores del complemento cromosómico XX, independientemente del estatus gonadal (testículos-ovarios) de los embriones donantes. Por el contrario el tratamiento con E2 no afectó los niveles de *Cyp19a1* en los cultivos XY (Figura 28).



**Figura 28:** Efecto de estradiol (E2) sobre los niveles de ARNm de *Cyp19a1* en cultivos primarios de amígdala anterior de ratones de 15 días de gestación separados según sexo y genotipo. El tratamiento con E2 aumentó significativamente la expresión de *Cyp19a1* en cultivos XX anulando las diferencias entre cultivos XX y XY controles. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles de machos XY wt. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p<0,05$ .  $n= 4-6$  cultivos independientes para cada genotipo y tratamiento.

El tratamiento con DHT a los cultivos reveló un efecto principal de la interacción genotipo x tratamiento ( $F_{1,25}=10,49$ ;  $p=0,003$ ). Nuevamente los resultados indican que el tratamiento hormonal incrementó significativamente ( $p<0,01$ ) la expresión de *Cyp19a1* en los cultivos XX (XXM y XXH) mientras que no tuvo efecto en los cultivos XY ( $p<0,05$ ; Figura 29).

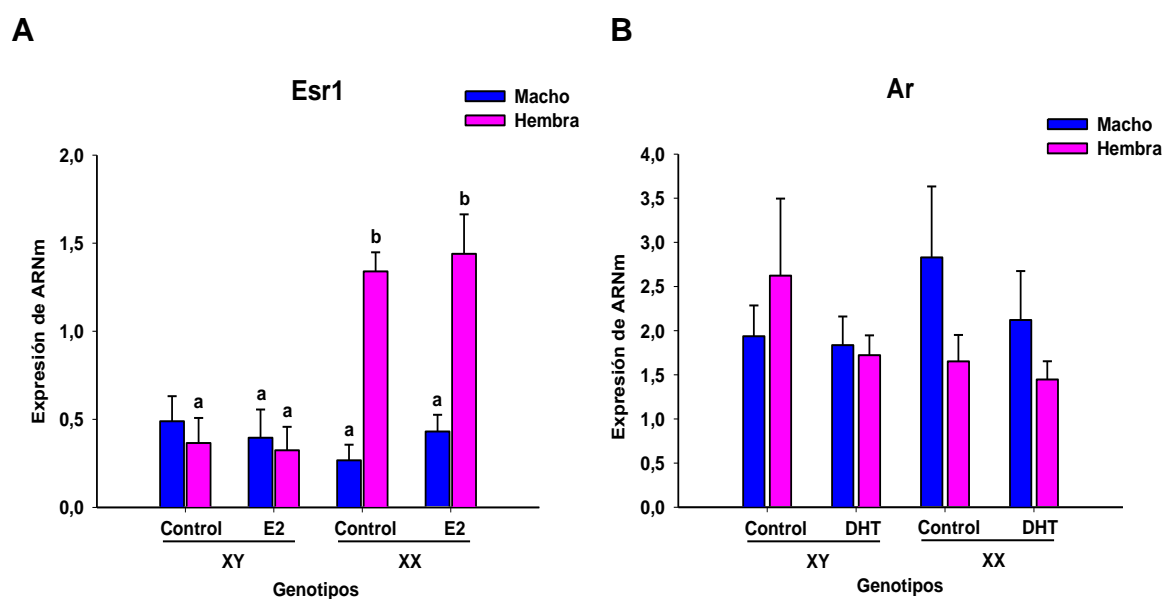


**Figura 29:** Efecto de dihidrotestosterona (DHT) sobre los niveles de ARNm de *Cyp19a1* en cultivos primarios de amígdala anterior de ratones de 15 días de gestación separados según sexo y genotipo. El tratamiento con DHT aumentó significativamente la expresión de *Cyp19a1* en cultivos XX anulando las diferencias entre cultivos XX y XY controles. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles de machos XY wt. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p<0,01$ .  $n= 4-6$  cultivos independientes para cada genotipo y tratamiento.

Con el fin de determinar si el efecto de E2 y DHT involucra cambios en la expresión génica de los receptores esteroideos ER- $\alpha$  (*Esr1*) o AR (*Ar*) se estudió por qPCR la expresión de estos receptores en los cultivos de amígdala.

La expresión génica de *Esr1* mostró diferencias significativas debidas al sexo gonadal (gen *Sry*;  $F_{1,31}=18,31$ ;  $p=0,0002$ ), al complemento cromosómico sexual ( $F_{1,31}=18,65$ ;  $p=0,0001$ ) y a la interacción entre estos factores ( $F_{1,31}=26,65$ ;  $p=0,00001$ ). El análisis *post hoc* indicó que los cultivos XXH tuvieron mayor expresión de *Esr1* y que el tratamiento hormonal no afectó esta expresión ( $p<0,001$ ; Figura 30A).

El tratamiento con DHT a los cultivos no tuvo efectos sobre la expresión génica de *Ar* (Figura 30B).

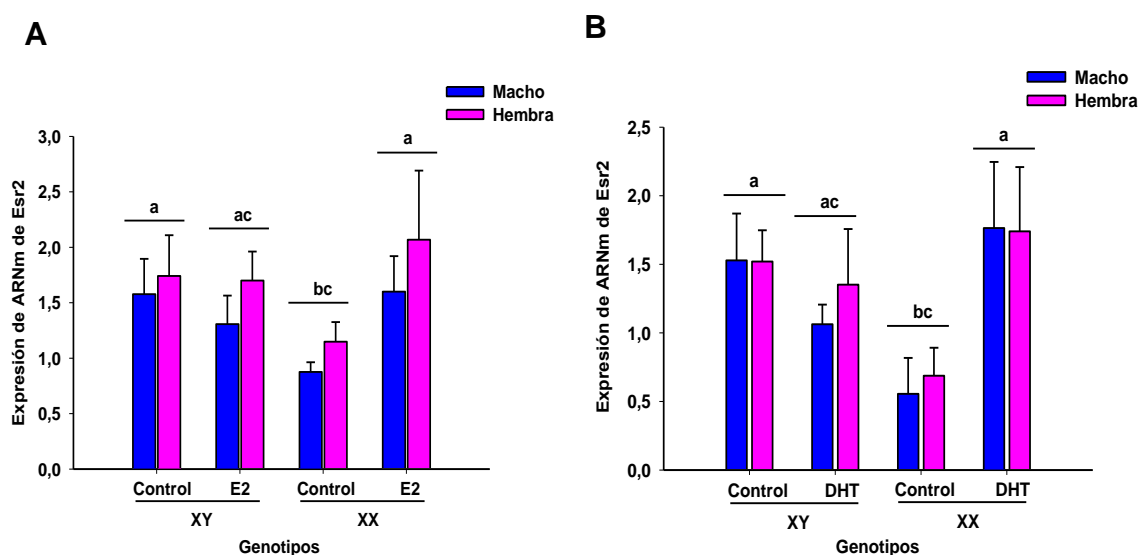


**Figura 30:** Efecto de A) estradiol (E2) y B) dihidrotestosterona (DHT) sobre los niveles de ARNm de *Esr1* y *Ar* en cultivos primarios de amígdala anterior de ratones de 15 días de gestación separados según sexo y genotipo. Los cultivos XX hembra tuvieron mayor expresión de *Esr1* y el tratamiento hormonal no afectó esta expresión. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles de machos XY wt. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p<0,001$ .  $n=4-6$  cultivos independientes para cada genotipo y tratamiento.

En algunas regiones del cerebro hay expresión de ambos subtipos de ER ( $\alpha$  y  $\beta$ ) por lo que E2 puede organizar el cerebro en desarrollo por medio de la activación de los ER- $\alpha$  o ER- $\beta$  (Hisasue y col., 2010). Asimismo, existen evidencias de que DHT puede actuar en cerebro a través de los receptores de estrógeno  $\beta$  (ER- $\beta$ ) luego de su conversión a 5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (conocido como 3 $\beta$ -diol) (Grassi y col., 2013; Handa y col., 2008; Zuloaga y col., 2012) por lo que se evaluó también el efecto de los

tratamientos sobre la expresión de *Esr2* en los cultivos de amígdala de los cuatro genotipos.

Los resultados de expresión del ARNm de *Esr2* mostraron una interacción significativa entre el tratamiento hormonal y el genotipo (E2 x genotipo:  $F_{1,25}=4,54$ ;  $p=0,043$  y DHT x genotipo:  $F_{1,27}=7,25$ ;  $p=0,012$ ). El análisis *post hoc* confirmó que ambos tratamientos hormonales afectaron la expresión de *Esr2* de distinta forma dependiendo del complemento cromosómico sexual de las células. Los cultivos XX controles tuvieron menor expresión de *Esr2* que los cultivos XY controles ( $p<0,05$ ) y ambos tratamientos hormonales (E2 y DHT) incrementaron significativamente los niveles de *Esr2* únicamente en los cultivos XX (XXM y XXH;  $p<0,05$ ; Figura 31).



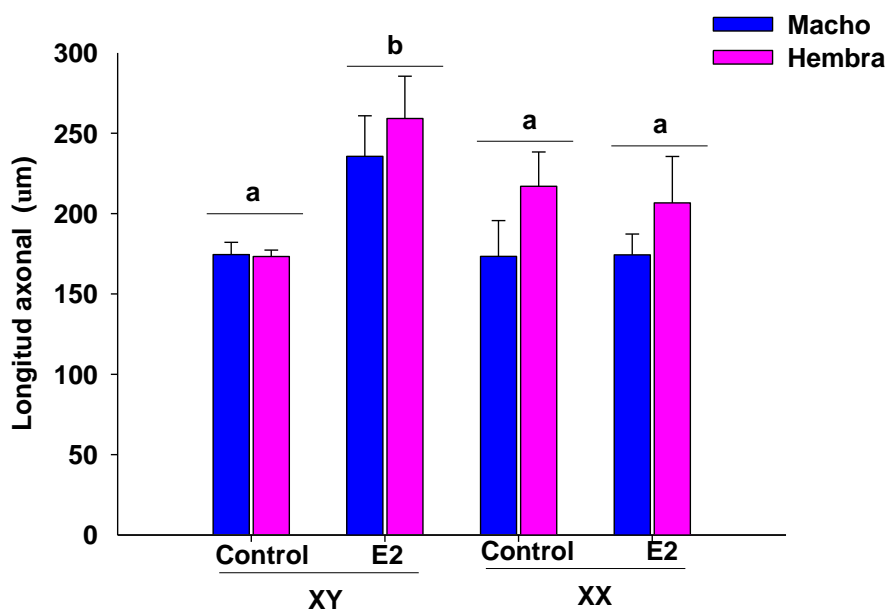
**Figura 31:** Efecto de A) estradiol (E2) y B) dihidrotestosterona (DHT) sobre los niveles del ARNm de *Esr2* en cultivos primarios de amígdala anterior de ratones de 15 días de gestación separados según sexo y genotipo. El tratamiento con E2 o DHT aumentó significativamente la expresión de *Esr2* en cultivos XX anulando las diferencias entre cultivos XX y XY controles. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles de machos XY wt. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p<0,05$ .  $n= 4-6$  cultivos independientes para cada genotipo y tratamiento.



## 2. CRECIMIENTO AXONAL INDUCIDO POR 17 $\beta$ -ESTRADIOL

Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que en cultivos primarios de neuronas disociadas el efecto neuritogénico del estradiol es ejercido diferencialmente dependiendo del sexo de los embriones aún antes de la masculinización del cerebro durante el período crítico. Estas evidencias indican que en neuronas de HVM de embriones provenientes de rata (Cambiasso y Carrer, 2001; Cambiasso y col., 2000; Díaz y col., 1992) y de ratón (Scerbo y col., 2014) el estradiol produce un incremento en la longitud y diferenciación del axón únicamente en cultivos provenientes de embriones macho. Estos resultados abrieron el interrogante acerca de las diferencias intrínsecas entre neuronas macho y hembra antes de haber estado expuestas a estradiol *in utero* que podrían determinar esta respuesta diferencial.

Con el objetivo de determinar el rol del complemento cromosómico sexual en la determinación de esta diferencia sexual en las acciones neuritogénicas del estradiol realizamos cultivos primarios de neuronas de HVM de E15 separados por sexo y genotipo y tratados con E2 por 48 horas. El análisis del efecto de E2 sobre la longitud axonal mostró un efecto significativo de la hormona ( $F_{1,26}=4,69$ ;  $p=0,04$ ) y de la interacción del genotipo con el tratamiento ( $F_{1,26}=6,05$ ;  $p=0,02$ ) (Figura 32).



**Figura 32:** Efecto de estradiol (E2) sobre la longitud axonal de neuronas hipotálamicas de ratones de 15 días de gestación separados según sexo y genotipo. El tratamiento con E2 incrementó la longitud axonal de neuronas XY. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,001$ .  $n = 3-7$  cultivos independientes para cada genotipo y tratamiento.

El resultado final fue que E2 produjo un aumento significativo en la longitud axonal de los cultivos XY (XYH y XYM;  $p < 0,001$ ). Por el contrario el tratamiento hormonal no produjo efecto sobre la longitud axonal en los cultivos XX (Figura 32).

El tratamiento con E2 también afectó a la longitud neurítica total, igual a la longitud del axón más la longitud de los procesos menores (Tabla 4).

**Tabla 4:** Efecto de E2 sobre el crecimiento *in vitro* de neuronas del hipotálamo ventromedial de embriones de ratón de 15 días de gestación separados por sexo y genotipo.

GENOTIPO	TRATAMIENTO	PARÁMETRO			
		N° neuritas primarias	Procesos Menores ( $\mu\text{m}$ )	Longitud total ( $\mu\text{m}$ )	Área del soma ( $\mu\text{m}^2$ )
XYM	Control	3,36 $\pm$ 0,23	95,29 $\pm$ 9,49	211,96 $\pm$ 15,38 <sup>#</sup>	75,23 $\pm$ 3,61 <sup>*</sup>
	E2	3,82 $\pm$ 0,12	96,73 $\pm$ 5,98	290,77 $\pm$ 34,83	73,05 $\pm$ 2,12 <sup>*</sup>
XXM	Control	3,14 $\pm$ 0,27	76,61 $\pm$ 8,46	203,45 $\pm$ 41,97 <sup>#</sup>	69,01 $\pm$ 5,18 <sup>*</sup>
	E2	3,41 $\pm$ 0,45	93,84 $\pm$ 19,31	214,89 $\pm$ 46,43	72,87 $\pm$ 6,67 <sup>*</sup>
XYH	Control	3,68 $\pm$ 0,16	84,09 $\pm$ 5,65	224,87 $\pm$ 11,87 <sup>#</sup>	66,37 $\pm$ 2,84
	E2	4,16 $\pm$ 0,10	69,18 $\pm$ 2,06	341,20 $\pm$ 36,79	66,62 $\pm$ 0,56
XXH	Control	3,6 $\pm$ 0,24	69,18 $\pm$ 2,06	277,04 $\pm$ 26,43 <sup>#</sup>	61,40 $\pm$ 1,98
	E2	3,58 $\pm$ 0,05	73,40 $\pm$ 3,08	277,40 $\pm$ 35,22	67,35 $\pm$ 5,43

Los datos se expresan como media  $\pm$  EE, n= 3-7 cultivos independientes para cada genotipo. E2: 17 $\beta$ -estradiol. XYM y XXM: machos gonadales, XYH y XXH: hembras gonadales. Test LSD Fisher:

**Longitud Total:** Efecto significativo debido al tratamiento: control vs E2, #  $p < 0,05$ .

**Área del soma:** Efecto significativo debido al sexo gonadal: macho vs hembra, \*  $p < 0,01$ .

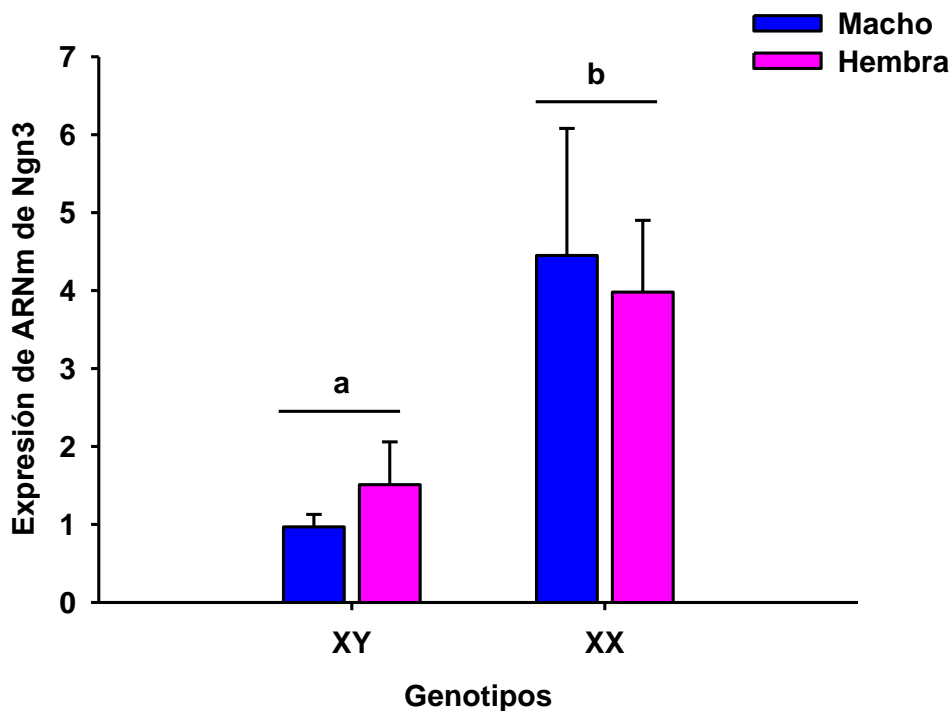
El análisis de la longitud total mostró un efecto significativo del sexo gonadal ( $F_{1,26}=4,82$ ;  $p<0,05$ ) y del tratamiento ( $F_{1,26}=4,61$ ;  $p<0,05$ ). Con respecto a la longitud de procesos menores y número de neuritas primarias no encontramos efectos significativos con ninguno de los factores analizados. Se evaluaron también el área del soma y los resultados mostraron un efecto significativo del sexo gonadal ( $F_{1,26}=6,76$ ;  $p<0,05$ ). Es decir, los cultivos provenientes de embriones hembras (XXH y XYH) tuvieron una medida menor de área media de soma con respecto a los cultivos provenientes de machos (XX y XY) independientemente del tratamiento con E2 ( $p<0,01$ ; Tabla 4).

### 3. EXPRESIÓN DE Ngn3

#### 3.1. Rol del complemento cromosómico sexual en la expresión sexualmente dimórfica de Ngn3.

Evidencias de nuestro laboratorio demuestran la existencia de una diferencia sexual en la expresión del factor de transcripción neural Ngn3 en neuronas hipotalámicas de E14 (Scerbo y col., 2014). Las neuronas provenientes de embriones hembra expresan mayores niveles de Ngn3 con respecto a los machos y a su vez el tratamiento con E2 *in vitro* anula esta diferencia sexual al aumentar Ngn3 en neuronas de machos sin provocar cambios en los cultivos de hembras.

Con el fin de determinar si la expresión sexualmente dimórfica de Ngn3 se debe al complemento cromosómico sexual de las células se emplearon cultivos transgénicos FCG. Como se observa en la Figura 33 la expresión génica de Ngn3 fue significativamente mayor en cultivos XX independientemente del sexo gonadal (XXH y XXM > XYH y XYM;  $F_{1,29}=11,31$ ;  $p=0,0022$ ). Las neuronas portadoras de los cromosomas XY mostraron menor expresión de Ngn3 que las neuronas XX ( $p<0,01$ ), independientemente de haber sido originado de embriones machos o hembras gonadales (Figura 33).

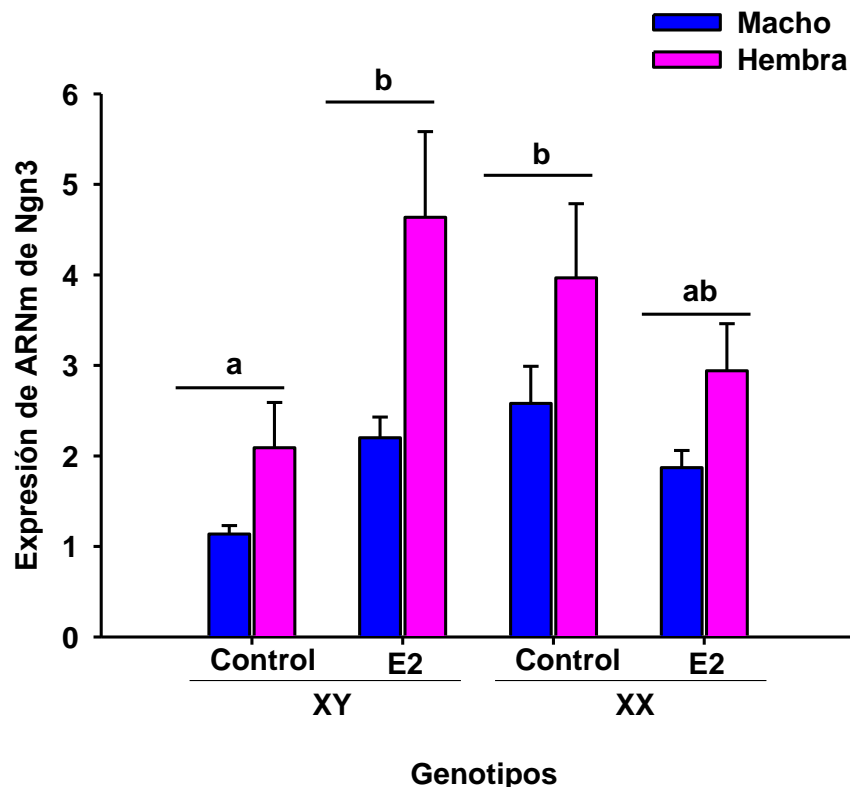


**Figura 33:** Niveles del ARNm de neurogenina 3 (Ngn3) en neuronas hipotalámicas de ratones de 15 días de gestación separados por sexo y genotipo. Los cultivos provenientes de individuos XX presentaron mayores niveles de Ngn3 que los cultivos XY. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles de machos XY. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,01$ .  $n = 7-9$  cultivos independientes para cada genotipo.

### 3.2. Rol del complemento cromosómico sexual en la regulación de la expresión de Ngn3 por E2

A continuación se procedió a evaluar si las diferencias en la expresión de Ngn3 entre neuronas XX y XY determinan una acción diferencial de E2 sobre la regulación de Ngn3 se realizaron cultivos transgénicos FCG en los que se cuantificó la expresión del ARN mensajero de Ngn3 luego del tratamiento con E2. El ANOVA a tres vías (sexo x genotipo x tratamiento) reveló un efecto significativo debido a la interacción entre el genotipo y el tratamiento hormonal ( $F_{1,45}=9,2005$ ;  $p=0,004$ ). El análisis *post hoc* indicó que el E2 incrementó la expresión de Ngn3 solo en cultivos provenientes de embriones portadores del complemento cromosómico sexual XY ( $p < 0,001$ ; Figura 34), independientemente del sexo gonadal sin afectar la expresión de Ngn3 en cultivos XX. Estos resultados indicaron que E2 anula las diferencias sexuales debidas al

complemento cromosómico sexual, igualando los niveles de expresión de Ngn3 entre los genotipos.

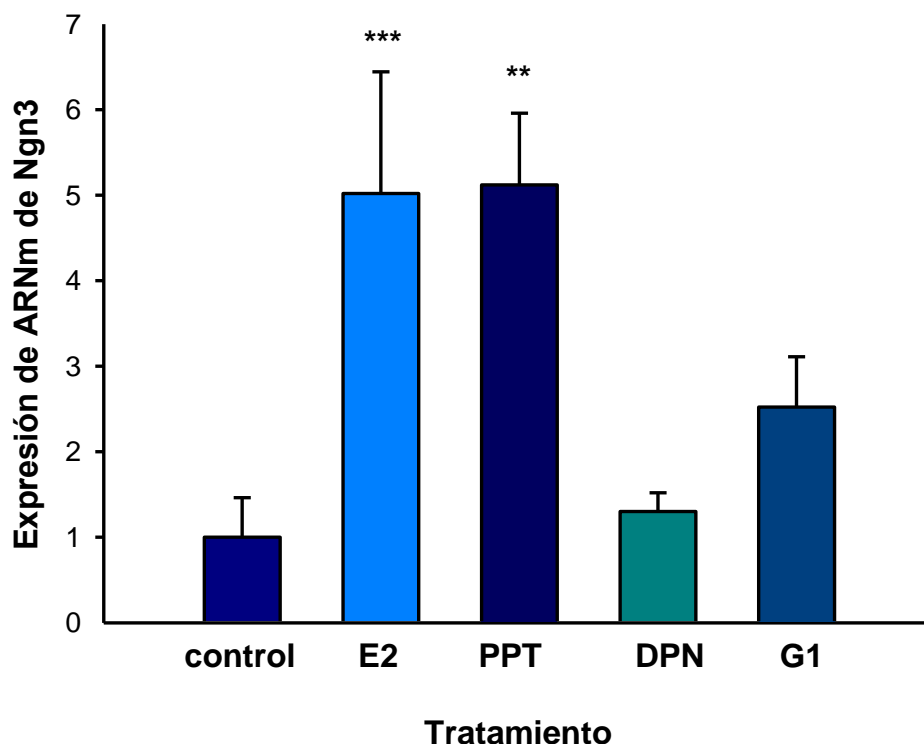


**Figura 34:** Efecto de estradiol (E2) sobre los niveles de ARNm de neurogenina 3 (Ngn3) en neuronas hipotálamicas de ratones de 15 días de gestación separados por sexo y genotipo. El tratamiento con E2 aumentó significativamente la expresión de Ngn3 en cultivos XY anulando las diferencias entre cultivos XX y XY controles. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles de machos XY. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,001$ .  $n = 7-9$  cultivos independientes para cada genotipo y tratamiento.

### 3.3. Receptores involucrados en la regulación de Ngn3 en neuronas hipotálamicas

Con el fin de evaluar si el aumento en la expresión de Ngn3 en cultivos provenientes de embriones macho involucra la regulación transcripcional mediada por los receptores clásicos de E2 o si, por el contrario, involucra al receptor de estrógeno asociado a proteína G (GPR30/GPR) los cultivos fueron tratados con agonistas selectivos de los receptores de estrógeno clásicos ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  (PPT y DPN, respectivamente) y con un ligando de GPR30/GPR (G1). El análisis estadístico de los

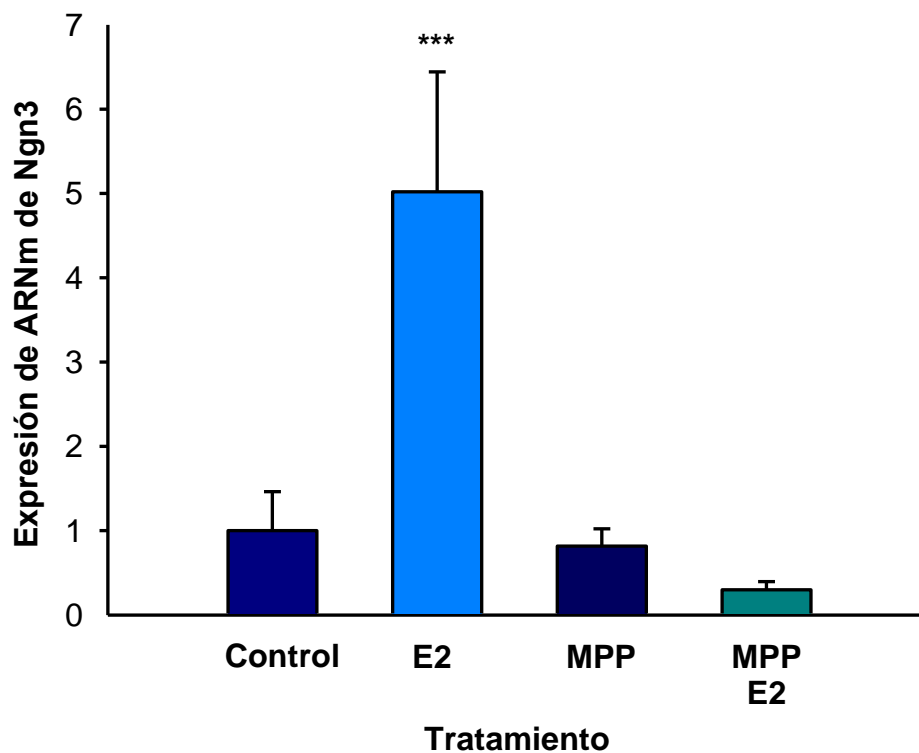
resultados mostró un efecto significativo del tratamiento ( $F_{4,29}=5,35$ ;  $p=0,002$ ). Los cultivos tratados con E2 presentaron mayores niveles de expresión de Ngn3 que los cultivos controles ( $p<0,001$ ). De los compuestos analizados, sólo el agonista selectivo para el ER- $\alpha$  PPT fue capaz de incrementar los niveles de Ngn3 ( $p<0,01$ ; Figura 35) comparados con los cultivos controles.



**Figura 35:** Efecto de estradiol (E2) y de agonistas selectivos de los receptores de estrógeno sobre los niveles de ARNm de neurogenina 3 (Ngn3) en neuronas hipotalámicas de ratones macho de 15 días de gestación. Sólo el agonista selectivo para el ER- $\alpha$  PPT fue capaz de incrementar los niveles de Ngn3 al igual que E2. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$  difieren significativamente del control.  $n=3-7$  cultivos independientes. PPT: agonista selectivo de ER- $\alpha$ , DPN: agonista selectivo de ER- $\beta$ , G1: ligando del receptor GPR30.

Con el objeto de corroborar que la regulación de Ngn3 por E2 depende de ER- $\alpha$ , los cultivos de neuronas hipotalámicas fueron tratados con un antagonista específico (MPP) de estos receptores en presencia de E2. Como se muestra en la Figura 36 se encontró un efecto significativo del tratamiento sobre los niveles de Ngn3 ( $F_{3,22}=5,53$ ;  $p=0,005$ ). De las condiciones experimentales evaluadas, únicamente el agregado de E2

al medio de cultivo incrementó la expresión de Ngn3 ( $p < 0,001$ ) mientras que el pre-tratamiento con MPP bloqueó este efecto (Figura 36).



**Figura 36:** Efecto de estradiol (E2) y de un antagonista selectivo de ER- $\alpha$  (MPP) sobre la expresión del ARNm de Neurogenina 3 (Ngn3) en neuronas hipotalámicas de ratones macho de 15 días de gestación. El tratamiento con MPP bloqueó el efecto de E2 sobre Ngn3. Los datos fueron normalizados con la expresión en cultivos controles. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0,001$  difiere significativamente del control.  $n = 3-7$  cultivos independientes.

# DISCUSIÓN



La valoración independiente de los factores gonadales y los factores debidos a la diferente dotación genética entre machos y hembras sobre la diferenciación sexual del cerebro tiene la dificultad de que naturalmente la herencia del sexo gonadal está ligada al cromosoma Y. El modelo de animal transgénico FCG tiene la ventaja de permitir separar la herencia del gen Sry (que determina la formación del testículo) de la herencia del cromosoma Y, debido a una deleción espontánea de este gen y su reinsertión como transgen en el cromosoma autosómico 3 (Itoh y col., 2015). Así, el efecto de los dos grandes factores que causan las diferencias sexuales en el cerebro, el complemento cromosómico sexual y las hormonas gonadales, pueden ser evaluados independientemente en un mismo modelo animal. El efecto del complemento cromosómico sexual puede ser evaluado en ausencia (XYH vs XXH) o presencia (XYM vs XXM) de secreciones gonadales durante el desarrollo embrionario. Los machos XY y XX están expuestos a niveles hormonales similares durante el desarrollo ya que la distancia ano-genital entre grupos no difiere al nacer (Itoh y col., 2015) permitiendo de este modo discriminar el efecto del complemento cromosómico sexual. Asimismo, este modelo animal permite analizar el rol de las hormonas gonadales comparando individuos con el mismo complemento cromosómico y diferente sexo gonadal (XXH vs XXM / XYH vs XYM). Finalmente, también permite evaluar la interacción entre los efectos hormonales y del complemento cromosómico sexual, si el ambiente hormonal tiene efectos diferentes entre los individuos XX y XY.

Este trabajo de tesis se centró en el estudio de tres características sexualmente dimórficas en el cerebro de embriones antes de haber sido expuesto a la acción organizacional de las secreciones gonadales *in utero*. **La expresión de aromatasa**, enzima clave y fundamental para el paso final de síntesis de E2 en cerebro, ya sea a partir de la T gonadal o sintetizada *de novo* en el cerebro a partir de colesterol; la **acción neuritogénica de E2 *in vitro*** sobre neuronas hipotalámicas cuyos efectos difieren según el sexo de los embriones; y por último, la expresión sexualmente dimórfica del **gen pro-neural Ngn3**, cuya implicancia en la neuritogénesis y diferenciación neuronal ha sido demostrada por trabajos de nuestro y otros laboratorios.

## 1. EXPRESIÓN DE AROMATASA

La expresión de aromatasa en el cerebro durante el desarrollo presenta un patrón específico (Lauber y col., 1997; Raab y col., 1995; Shinoda, 1994). La distribución de la inmunomarcación para aromatasa observada en el cerebro de ratones FCG de E16 mostró el patrón fetal-neonatal (Shinoda, 1994) con presencia de grupos discretos de ARO-ir de moderada expresión en el núcleo paraventricular hipotalámico y de alta expresión en la estría terminalis y regiones amigdalinas anteriores y posteriores (Figura 17). La co-localización de ARO-ir con NeuN indicó el fenotipo neuronal de las células positivas para aromatasa (Figura 18).

Las diferencias sexuales en la expresión de aromatasa han sido registradas en diversas áreas del cerebro de roedores (Beyer y col., 1994b; Colciago y col., 2005; Ivanova y Beyer, 2000; Negri-Cesi y col., 2001). El análisis de nuestros resultados reveló que el cerebro de embriones XY presenta mayores niveles de aromatasa que individuos XX en la estría terminalis y el área amigdalina anterior (Figuras 20 y 21) a E16, antes de período crítico de la masculinización del cerebro. Si bien el pico de T gonadal se presenta alrededor de E17 en ratones (O'Shaughnessy y col., 2006, 1998) la producción de T comienza varios días antes por lo que no podemos descartar su efecto potencial sobre la expresión de aromatasa. Sin embargo nuestros resultados indican que las hembras XYH tienen mayor expresión que los machos XXM lo que sugiere que es el complemento cromosómico el principal factor que determina la expresión de aromatasa en estas regiones.

Con respecto a la regulación de aromatasa, una vez que determinamos que su expresión fue mayor en individuos XX, un punto importante a resolver fue si el incremento en la T producida por los testículos fetales a E17-18 puede afectar su expresión y si este efecto se encuentra bajo el control de los cromosomas sexuales. Para abordar este aspecto utilizamos el modelo *in vitro* de cultivo neuronal de amígdala anterior de embriones de E15. El efecto de los cromosomas sexuales sobre la expresión de aromatasa observado mediante inmunohistoquímica y qPCR en amígdala anterior fue también observado *in vitro*. Es decir, los cultivos neuronales provenientes de embriones XY de E15 presentaron mayor expresión de aromatasa que los cultivos XX independientemente del sexo gonadal (Figuras 28 y 29). Para determinar si los cromosomas sexuales pueden también afectar la regulación de aromatasa por las

hormonas gonadales, evaluamos el efecto del tratamiento con E2 o DHT en cultivos primarios de neuronas de amígdala y de esta forma imitar el efecto de los esteroides gonadales *in vivo* durante el período crítico. El tratamiento con E2 incrementó la expresión del ARNm de aromatasa únicamente en cultivos XX (XXM y XXH) mientras que no tuvo efecto en cultivos XY (XYM y XYH; Figura 28). Los resultados sugieren que los genes presentes en los cromosomas sexuales determinan el resultado final de la acción de E2 sobre aromatasa. Resulta interesante destacar que la diferencia basal entre cultivos XX y XY desaparece luego del tratamiento con E2, en un efecto regulado también por los cromosomas sexuales. Por otra parte, el efecto de DHT sobre la expresión de aromatasa también fue dependiente de los cromosomas sexuales ya que el tratamiento hormonal incrementó los niveles de aromatasa únicamente en neuronas XX independientemente del sexo gonadal (Figura 29). Al igual a lo observado en los cultivos tratados con E2, el agregado de DHT al medio de cultivo anuló las diferencias basales entre cultivos XX y XY en la expresión de aromatasa. En ambos casos el efecto de los tratamientos fue dependiente de los cromosomas sexuales. En base a estos resultados, podemos hipotetizar que la mayor expresión basal de aromatasa en cultivos XY podría evitar un incremento posterior por efecto de las hormonas gonadales. Esta interpretación sigue la línea de pensamiento presentada por De Vries (2004), quien propuso por primera vez que los factores sexo-específicos pueden estar actuando en forma compensatoria. A lo largo de los años se han acumulado evidencias que apoyan esta hipótesis y recientemente fue Arnold (2014) quién incorporó el efecto del complemento cromosómico sexual sobre el cerebro en desarrollo como un mecanismo compensatorio para prevenir o anular los efectos organizadores de las hormonas gonadales (Arnold, 2014). En línea con esta hipótesis, nuestros resultados sugieren que las diferencias sexuales en la expresión de aromatasa a E16 debidas al complemento cromosómico sexual podrían prevenir el aumento de aromatasa de individuos XY en respuesta a los dos picos de secreción de T que ocurren a E17-18 y luego del nacimiento en machos. Dado que la síntesis de E2 por los ovarios ocurre posnatalmente (Lamprecht y col., 1976), el cerebro de las hembras estaría expuesto a un ambiente estrogénico solo a partir de esteroides sintetizados *de novo*. Evidencias obtenidas en cerebro embrionario de rata muestran que no hay diferencias sexuales en los niveles de E2, T y DHT en hipocampo, corteza e hipotálamo a E19 (Konkle y McCarthy, 2011). Nuestros resultados sugieren que E2 y DHT en neuronas XX regulan la expresión de aromatasa para mantener un ambiente estrogénico adecuado durante el período crítico.

El gen de la aromatasa se ubica en el cromosoma 9 de ratón (MGI: 88587). La expresión diferencial de la aromatasa entre individuos XX y XY podría deberse a la expresión diferencial de genes ligados a los cromosomas X e Y que resulta de la herencia de diferente número de copias del cromosoma X (dos copias del X) o del tipo de cromosomas (presencia-ausencia del Y). Los resultados obtenidos hasta el momento permiten identificar al complemento cromosómico sexual como factor primario en las diferencias observadas pero se necesitarán estudios adicionales para identificar el o los genes de los cromosomas sexuales involucrados en la regulación de la aromatasa. El cromosoma Y es pequeño y relativamente escaso en genes, si consideramos que en humanos tiene 48 genes que codifican para proteínas y en ratones solo 12 (Wijchers y Festenstein, 2011). Algunos de estos genes se ubican en la región pseudoautosomal, por lo que sufren recombinación en meiosis con los genes homólogos presentes en el X (Wijchers y Festenstein, 2011) y por lo tanto su expresión no difiere entre individuos XX y XY por lo que podemos excluirlos como causantes de las diferencias observadas en nuestros resultados. El cromosoma Y también posee una región de genes específicos del Y, entre los que se encuentra el gen *Sry*, que no sufren recombinación y que contiene principalmente a los genes indispensables para la diferenciación gonadal y espermatogénesis (Graves, 2006). Sin embargo, se puede excluir al gen *Sry* como candidato responsable de las diferencias sexuales observadas ya que el cerebro de machos XYM expresó mayores niveles de aromatasa que el cerebro de machos XXM, ambos portadores del gen *Sry*. Por el contrario, la diferencia podría deberse a que los individuos XXM y XXH son ambos portadores de dos copias de cromosoma X de manera que poseen una mayor expresión de los genes del X que escapan a la inactivación, por lo que estaríamos en presencia de una diferencia debida a la dosis de genes del X (factor II en la Figura 6). Alrededor del 3% de los genes del X escapan a la inactivación en células de ratones (Yang y col., 2010) y si bien la inactivación de uno de los cromosomas X en cada célula es al azar, se ha postulado que es un proceso altamente regulado ya que durante el desarrollo estos genes escapan a la inactivación solo en momentos determinados (Xu y col., 2008a). Otro factor a tener en cuenta es que el cromosoma X inactivo representa una gran región de heterocromatina, ausente en las células XY, que podría estar ejerciendo alguna regulación sobre los genes presentes en los otros cromosomas (Factor IV en la Figura 6; Arnold, 2012; Arnold y col., 2012). Si las diferencias sexuales observadas en esta tesis son debidas a un efecto de dosis de los genes que escapan a la inactivación del X que están ejerciendo una regulación negativa

sobre la expresión de aromatasa podríamos inferir que se trata de genes con elementos de respuesta a estrógeno ya que el agregado de E2 o DHT al medio de cultivo incrementa los niveles de aromatasa únicamente en neuronas XX, mientras que no tiene efecto en los cultivos XY (Figura 28) cuyo nivel de expresión no registró cambios significativos.

Debido a que el tratamiento hormonal, tanto E2 como DHT, produjo un incremento en la expresión de aromatasa en los cultivos XX nos preguntamos si estas hormonas podían también afectar los niveles de expresión de sus receptores. En los cultivos tratados con E2 los niveles de ER- $\alpha$  no se modificaron por el tratamiento hormonal. Los cultivos XXH presentaron los niveles más altos de expresión del receptor con respecto a los cultivos XYH, XYM y XXM y esta expresión no cambió con el agregado de E2 (Figura 30A). Con respecto a la expresión de AR, los niveles de ARNm en neuronas de amígdala no fueron regulados por ninguno de los factores analizados (complemento cromosómico sexual x sexo gonadal x tratamiento). Sin embargo cuando evaluamos los niveles de ARNm para ER- $\beta$  bajo ambos tratamientos hormonales el efecto fue un aumento en la expresión del receptor en cultivos XX independientemente del sexo gonadal (Figura 31). El análisis de la interacción entre el tratamiento aplicado y el genotipo (hormona x complemento cromosómico sexual) indicó que la regulación de la expresión de ER- $\beta$  fue dependiente del complemento cromosómico sexual y a su vez el efecto de las hormonas fue anular las diferencias entre cultivos XX y XY controles. Si bien los resultados obtenidos hasta el momento no son concluyentes acerca de la implicancia funcional de esta regulación nos permiten plantear una hipótesis. El complemento cromosómico sexual determina la expresión sexualmente dimórfica de aromatasa y ER- $\beta$  en neuronas de amígdala anterior y a su vez regula el efecto organizador de E2 y DHT durante el periodo crítico de diferenciación sexual. Se necesitan estudios adicionales para evaluar si el incremento en la expresión de ER- $\beta$  en cultivos XXM y XXH luego del tratamiento con E2 o DHT implica que el ER- $\beta$  participa en el mecanismo por el cual las hormonas regulan aromatasa en neuronas de amígdala de individuos XX. Evidencias que apoyan esta hipótesis indican que DHT puede actuar en cerebro luego de su conversión a 5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (conocido como 3 $\beta$ -diol) quien a su vez es un agonista de ER- $\beta$  (Grassi y col., 2013; Handa y col., 2008; Zuloaga y col., 2012).

En vista de que los resultados indican que los cromosomas sexuales regulan la expresión y regulación de aromatasa durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro resultó interesante evaluar si el complemento cromosómico sexual podía afectar también la expresión de otras moléculas esteroideogénicas que posiblemente participan en la diferenciación sexual. De acuerdo a la hipótesis clásica (MacLusky y Naftolin, 1981) la T producida durante el desarrollo por los testículos fetales difunde al cerebro donde es localmente convertida a E2 por la enzima aromatasa. Sin embargo el cerebro de roedores expresa todas las moléculas y enzimas necesarias para producir T localmente a partir de colesterol. Al momento no se conocen evidencias de que la síntesis local de T participa en la diferenciación sexual del cerebro. El primer paso de la síntesis de neuroesteroides requiere el transporte del colesterol por StAR desde la membrana externa hacia la membrana interna de la mitocondria donde se encuentra la enzima P450scc encargada de convertir el colesterol en pregnenolona, precursor de todas las hormonas esteroideas (Baulieu y Robel, 1998). StAR y P450scc aparecen tempranamente en el desarrollo (Compagnone y col., 1995; Pezzi y col., 2003; Sierra y col., 2003). Nuestros resultados indican que StAR y P450scc se expresan en las regiones positivas para aromatasa en el cerebro de E16 lo que podría indicar un rol en la síntesis local de neuroesteroides particularmente en la generación de substratos para aromatasa. Sin embargo nuestros resultados en el cerebro FCG muestran que la expresión de StAR y P450scc en estra terminalis y amígdala no es sexualmente dimórfica y no está regulada por factores gonadales o del complemento cromosómico sexual (Figuras 22 y 23).

En algunas regiones del cerebro la generación de diferencias sexuales depende de la conversión de T a DHT por la enzima 5 $\alpha$ -Red durante el período crítico (Goto y col., 2005; Ribeiro y Pereira, 2005). En el cerebro la isoforma predominante de 5 $\alpha$ -Red es la tipo I, sin embargo la isoforma II también fue descrita en cerebro de rata durante la gestación tardía (Poletti y col., 1998). Nuestros resultados indican que la expresión del ARNm de las enzimas 5 $\alpha$ -Red tipo I y II no presenta diferencias sexuales y no está regulada por factores cromosómicos o gonadales en la estra terminalis y regiones amigdalinas del cerebro embrionario de E16 (Figuras 24 y 25). Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que no se encontraron diferencias sexuales en la expresión de 5 $\alpha$ -Red tipo I en el hipotálamo en desarrollo (Karolczak y col., 1998). Asimismo concuerdan con resultados recientes de Spanic y col. (2015) quienes

evaluaron la expresión de esta enzima durante la ontogenia en cerebro de ratones SF-1 KO, un modelo animal que permite estudiar las diferencias sexuales del cerebro en ausencia de las hormonas sexuales endógenas. Los niveles de ARNm de 5 $\alpha$ -Red tipo I fueron detectados en cerebro de embriones SF-1 KO desde E12 y su expresión aumentó significativamente a E18 (Spanic y col., 2015). Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados la expresión de 5 $\alpha$ -Red tipo I no presenta diferencias sexuales y no se ve afectada por la ausencia de esteroides gonadales en el ratón SF-1 KO (Spanic y col., 2015).

La diferenciación sexual del cerebro requiere la expresión adecuada de receptores de esteroides en regiones específicas del cerebro para activar las acciones organizadoras de E2 y DHT. E2 se une a los receptores de estrógeno y regula a nivel de la transcripción a los genes que tienen elementos de respuesta a estrógeno en la región del promotor (Gruber y col., 2004; Mangelsdorf y col., 1995). A su vez E2 también puede unirse a receptores asociados a la membrana plasmática y activar diferentes vías de señalización que finalmente regulan la transcripción génica involucrando distintos factores de transcripción (Arevalo y col., 2012). Asimismo se conoce que DHT es también capaz de regular la transcripción génica por medio de la unión a los AR (Claessens y col., 2008). El cerebro prenatal de rata presenta una fuerte señal de hibridación para el ER- $\alpha$  desde E18 en el núcleo estrio-hipotalámico, en la porción caudal del núcleo hipotalámico ventromedial, BST y en los núcleos arqueado del hipotálamo y cortical de la amígdala (DonCarlos, 1996). Asimismo, se encontraron diferencias sexuales en la expresión de ER- $\alpha$  en área preóptica a E20 indicando que su expresión es mayor en el cerebro de hembras (DonCarlos, 1996). Con respecto al AR, estudios previos indican que su expresión es mayor en machos a nivel del hipotálamo a E16 con respecto a hipotálamo de hembras (Young y Chang, 1998). En concordancia con estos estudios nuestros resultados indicaron que la expresión de ER- $\alpha$  y AR a E16 se encuentra regulada por factores gonadales sin influencia del complemento cromosómico sexual. La expresión del ARNm de ER- $\alpha$  fue mayor en estría terminalis y área amigdalina anterior de hembras gonadales (XXH y XYH) en relación a los machos gonadales (XXM y XYM; Figura 26). Por el contrario la expresión de AR en el área amigdalina anterior fue más alta en machos gonadales (XXM y XYM) con respecto a hembras gonadales (XXH y XYH; Figura 27). Las diferencias en la expresión de ER- $\alpha$  y AR entre las muestras obtenidas de *punch* y de cultivos neuronales podría atribuirse a

que estos receptores además de expresarse en neuronas se encuentran también en células gliales (Azcoitia y col., 2001; Lorenz y col., 2005; Pawlak y col., 2005).

## 2. ACCIONES NEURITOGÉNICAS DE E2 EN NEURONAS HIPOTALÁMICAS

Las acciones neuritogénicas de E2 durante el período crítico de diferenciación sexual han sido ampliamente estudiadas, especialmente en el hipotálamo (Cambiasso y Carrer, 2001; Cambiasso y col., 2000; Díaz y col., 1992; Lenz y McCarthy, 2010) donde se conoce que la hormona regula la neuritogénesis y controla la generación de diferencias sexuales en crecimiento y diferenciación neuronal. Nuestro laboratorio se ha dedicado ampliamente al estudio *in vitro* del efecto de E2 sobre la generación de diferencias sexuales en neuronas hipotalámicas antes del inicio del período crítico de diferenciación sexual del cerebro. Nuestros resultados previos indican que las neuronas hipotalámicas del cerebro de rata y ratón de E14-16 presentan diferencias sexuales en la respuesta a E2 *in vitro*. E2 produce un incremento en la longitud del axón únicamente en neuronas provenientes de cerebros macho (Cambiasso y Carrer, 2001; Cambiasso y col., 2000; Carrer y col., 2005; Scerbo y col., 2014) en un mecanismo que probablemente involucra la vía de señalización no clásica de E2 por medio de los ER- $\alpha$  ubicados en membrana plasmática (Gorosito y Cambiasso, 2008; Gorosito y col., 2008a). En cerebro de rata de E16 este efecto fue dependiente del cultivo con medio condicionado por células de la glía de mesencéfalo ventral, una región hacia la cual proyectan las neuronas hipotalámicas, sugiriendo que la secreción de factores tróficos por las células gliales está involucrada en el efecto axogénico de E2 en machos (Cambiasso y col., 2000). Siguiendo la línea de las diferencias sexuales entre neuronas hipotalámicas antes del período crítico de diferenciación sexual, resultados recientes de nuestro grupo de trabajo demuestran que los cultivos de hipotálamo de ratón hembra presentan mayor proporción de neuronas en estadios más avanzados del desarrollo en relación a los cultivos de macho (Scerbo y col., 2014). En cultivos de neuronas de hipotálamo de E14 de 4 DIV, la proporción de neuronas en estadios inmaduros (II) fue mayor en cultivos de machos mientras que la proporción de neuronas en estadios III y IV fue mayor en cultivos provenientes de embriones hembra. El tratamiento con E2



anuló estas diferencias sexuales (Scerbo y col., 2014). Los resultados obtenidos en esta tesis con cultivos FCG de 2 DIV concuerdan con una acción sexualmente dimórfica de E2 dependiendo del complemento cromosómico sexual. La utilización de cultivos transgénicos permitió desenmascarar el rol del complemento cromosómico sexual en la determinación del efecto axogénico de E2. La hormona incrementó la longitud axonal únicamente en cultivos XY (XYM y XYH) mientras que no tuvo efectos significativos en cultivos XX (XXM y XXH; Figura 32).

Nuestros resultados indican que el complemento cromosómico sexual regula el efecto axogénico de E2 en neuronas hipotalámicas. Sin embargo, algunas características morfológicas tales como la longitud total (axón + neuritas) y el área del soma no se vieron afectadas por los cromosomas sexuales. La longitud total incrementó en todos los cultivos tratados con E2 independientemente del complemento cromosómico sexual o del sexo gonadal mientras que el área del soma se vio afectada únicamente por el sexo gonadal independientemente del tratamiento o de los cromosomas sexuales (Tabla 4).

Ngn3 es un gen autosómico ubicado en el cromosoma 10 de ratón y humanos (MGI: XXXXX) y su expresión en neuronas de hipocampo de ratón de E17 incrementa por efecto de E2 (Ruiz-Palmero y col., 2011) en cultivos mixtos. Nuestros resultados previos en neuronas hipotalámicas separadas por sexo indican que la expresión de Ngn3 es sexualmente dimórfica antes del período crítico (Scerbo y col., 2014). Además, su implicancia en el crecimiento y diferenciación neuronal ha sido demostrada en cultivos de hipocampo e hipotálamo (Ruiz-Palmero y col., 2011; Scerbo y col., 2014) ya que el silenciamiento de Ngn3 por medio de ARN de interferencia en los cultivos anula estas diferencias sexuales (Scerbo y col., 2014). Debido a que las neuronas de cerebros hembra no solo expresan mayores niveles de Ngn3 sino que también presentan un mayor grado de desarrollo, propusimos que la expresión de Ngn3 en hembras es la causa de las diferencias sexuales encontradas en neuritogenesis y en la respuesta sexualmente dimórfica al E2. Debido a que estas diferencias sexuales fueron encontradas en neuronas provenientes de cerebros que aún no han estado expuestos a niveles significativos de T o E2 nos propusimos evaluar el rol del complemento cromosómico sexual sobre la expresión y regulación de Ngn3. Los resultados indicaron que no hay diferencias en la expresión de Ngn3 entre cultivos de embriones con el mismo complemento cromosómico sexual pero diferente sexo gonadal indicando que las hormonas gonadales producidas antes de E15 no afectan la expresión de Ngn3. Sin

embargo, se encontraron diferencias entre cultivos con distinto complemento cromosómico sexual independientemente del sexo gonadal (XX>XY; Figura 33). Curiosamente el efecto de E2 fue también regulado por el complemento cromosómico sexual, ya que los resultados mostraron un incremento en la expresión de Ngn3 luego del tratamiento con E2 únicamente en neuronas XY independientemente del sexo gonadal de los embriones (Figura 34). Este mismo efecto de la hormona fue observado en las diferencias sexuales encontradas en el crecimiento axonal (Figura 32) y diferenciación de neuronas hipotalámicas (Scerbo y col., 2014), sugiriendo que las neuronas provenientes de embriones hembra son programadas por los cromosomas sexuales para un desarrollo más rápido que las neuronas de los machos. Sin embargo, la testosterona de los testículos fetales, después de su conversión intracerebral a estradiol (Naftolin y col., 1975) durante el período crítico, podría reprogramar las neuronas de los machos para aumentar la diferenciación neuronal e igualar ambos sexos.

Nuestros resultados indican que la expresión del gen autosómico Ngn3 media las acciones sexo-específicas de los cromosomas sexuales sobre la generación de diferencias sexuales en diferenciación neuronal (Scerbo y col., 2014). Nuevamente la diferente expresión de Ngn3 entre células con distinto complemento cromosómico sexual podría deberse al desbalance en la expresión de genes de los cromosomas sexuales debido ya sea, a un efecto de dosis en los genes del X que escapan a la inactivación y se encuentran en mayor proporción en individuos XX, o a la presencia del cromosoma Y en machos. Algunos genes ligados al cromosoma X, tales como *Kdm6a* y *Kdm5c*, escapan a la inactivación (Berletch y col., 2010; Reinius y col., 2010) codifican para desmetilasas de histonas y se expresan en mayor proporción en cerebro de individuos 2X con respecto a individuos con una sola copia del X (Xu y col., 2002) antes (E11,5) y después (E18,5) de la diferenciación sexual mediada por hormonas gonadales (Wolstenholme y col., 2013). Se ha demostrado en cultivos primarios de neuronas de mamíferos que *Kdm5c* (también conocido como *Jarid1c* o *Smcx*) está involucrado en la muerte celular neuronal y en el crecimiento neurítico (Iwase y col., 2007). Debido a que hay algunos estudios que indican que *Kdm5c* se encuentra temporalmente inactivo durante el desarrollo (Lingenfelter y col., 1998) por lo que su expresión no difiere entre cerebros neonatales macho y hembra (Xu y col., 2008a) se necesitarían estudios adicionales que permitan determinar si antes del periodo crítico de diferenciación sexual su expresión es mayor en neuronas hipotalámicas XX y de esta

forma poder evaluar la expresión de *Kdm5c* en relación a la neuritogénesis mediada por la vía de señalización de Notch/Ngn3 en hipotálamo.

Otros genes, además de Ngn3, podrían estar involucrados en mediar los efectos de los cromosomas sexuales para inducir neuritogénesis (crecimiento axonal). Estudios sobre perfiles genéticos revelaron una serie de genes autosómicos expresados diferencialmente en ratones con diferente sexo y número de cromosomas X que podrían ser, al menos en parte, responsables de las diferencias sexuales encontradas. Entre ellos *Nptx2*, *Nedd9*, *Rorb*, *Cux2* y *Htr3a* están involucrados en el desarrollo neuronal o asociados con enfermedades neurológicas (Wolstenholme y col., 2013). Uno de estos genes, *Cux2* (en inglés, cut-like homeobox 2) regula los aspectos fundamentales de la diferenciación neuronal tardía y controla los mecanismos intrínsecos del desarrollo dendrítico, la formación de espinas y sinapsis de la corteza cerebral (Cubelos y col., 2010). Recientemente se ha identificado a *Cux2* corriente arriba y abajo de la señalización de Notch (Wittmann y col., 2014). El adecuado equilibrio en la expresión de los niveles de *Cux2* es necesario para la actividad de la señalización de Notch, ya que tanto la sobre-expresión de *Cux2* como su inhibición suprimen la señalización de Notch, reduciendo la proliferación celular y la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wittmann y col., 2014). Esto es relevante para nuestros resultados, ya que la expresión de Ngn3 está controlada negativamente por la actividad de Notch (Salama-Cohen y col., 2006). Se necesitan estudios adicionales para determinar si *Cux2* regula la señalización de Notch/Ngn3 durante la neuritogénesis en neuronas hipotalámicas. Asimismo sería interesante evaluar el rol del complemento cromosómico sexual en la expresión de *Cux2* en neuronas de hipotálamo ya que los estudios que evalúan su expresión se realizaron a partir de cerebro total (Wolstenholme y col., 2013).

Estudios del grupo del Dr. Garcia-Segura en cultivos mixtos de neuronas de hipocampo de E17 indican que la acción neuritogénica de E2 en hipocampo es dependiente de la activación del receptor de estrógeno de membrana asociado a proteína G (GPR30; Ruiz-Palmero y col., 2013). El tratamiento con G1, un agonista de GPR30, incrementa los niveles de Ngn3 y la neuritogénesis en hipocampo (Ruiz-Palmero y col., 2013). Nuestros resultados indican que la regulación de Ngn3 en neuronas hipotalámicas de cerebros macho de E15 es mediada por el ER- $\alpha$  ya que el tratamiento con un agonista de ER- $\alpha$  (PPT) imitó el incremento en la expresión de Ngn3 por E2. Por el contrario el tratamiento con un agonista de ER- $\beta$  (DPN) o con G1 no provocó

cambios significativos en los niveles de ARNm de Ngn3 (Figura 35). Para confirmar si ER- $\alpha$  es necesario para que E2 regule Ngn3 en neuronas hipotalámicas de macho tratamos los cultivos con el antagonista de ER- $\alpha$  MPP y observamos que MPP bloqueó el incremento en Ngn3 causado por E2 (Figura 36).

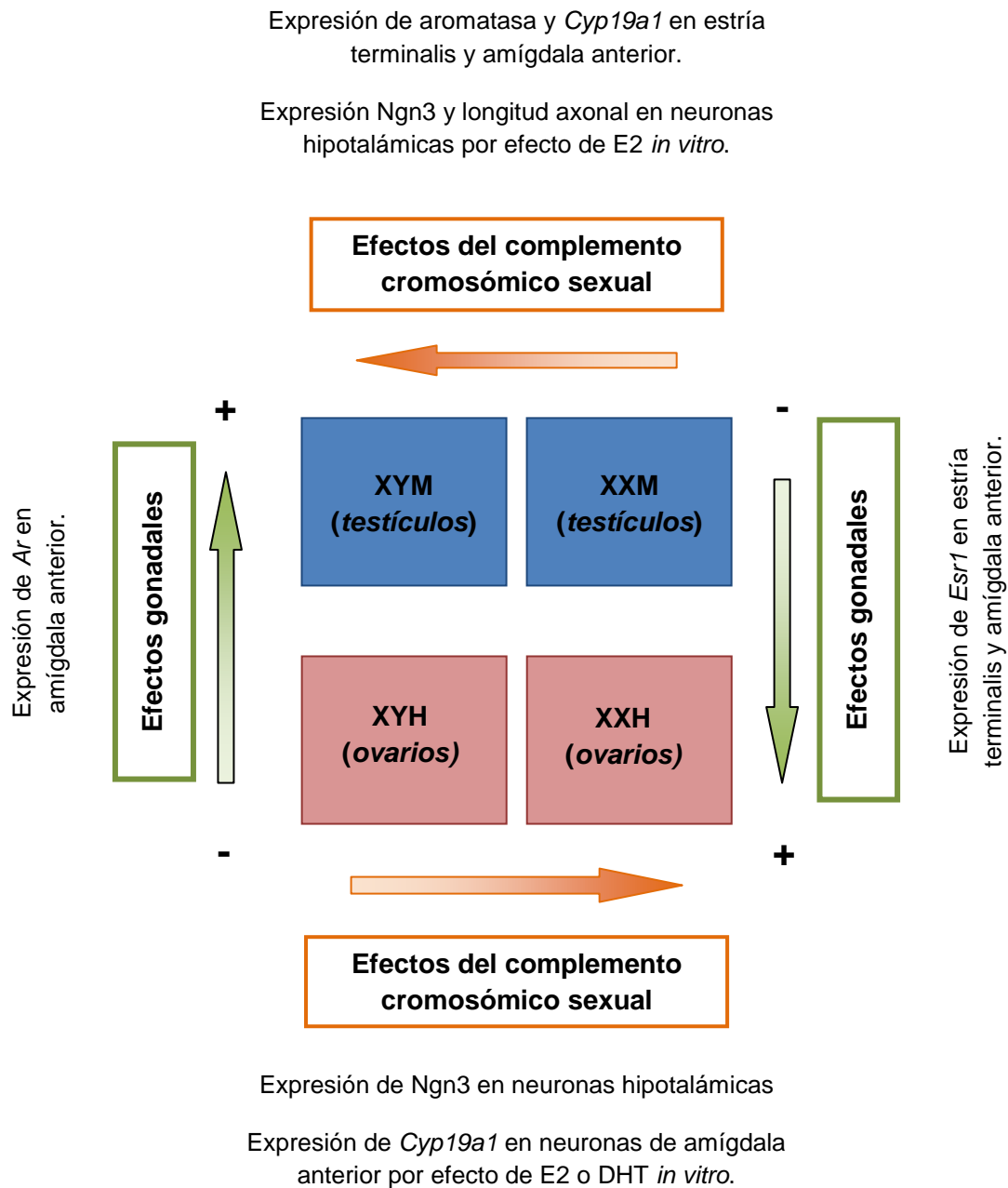
Nuestros resultados indican que el complemento cromosómico sexual regula la diferenciación de neuronas hipotalámicas antes del período crítico de diferenciación sexual del cerebro determinando una mayor longitud axonal en neuronas XX mediada por la mayor expresión en el gen autosómico Ngn3 en estas células. A su vez nuestros resultados sugieren que el posterior incremento en E2 producido por aromatización de la T gonadal después de E17-18 reprograma en las células XY las acciones neuritogénicas de E2 y el incremento en Ngn3 en un mecanismo mediado por los ER- $\alpha$ .

# CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

- El complemento cromosómico sexual determina las diferencias sexuales en la expresión de aromatasa en estría terminalis y en área amigdalina anterior del cerebro de embriones antes del periodo crítico.
- El efecto de E2 y DHT depende del complemento sexual ya que solo las neuronas de amígdala portadoras del complemento cromosómico sexual XX responden al ambiente hormonal incrementando la expresión de aromatasa.
- El ambiente hormonal compensa las diferencias sexuales en la expresión de aromatasa debidas al complemento cromosómico.
- La expresión de otras moléculas involucradas en la síntesis de neuroesteroides, tal como StAR, P450scc o 5 $\alpha$ -Red tipo I y II no se encuentra regulada por factores dependientes de los cromosomas sexuales ni del sexo gonadal en la estría terminalis y regiones amigdalinas del cerebro antes del período crítico.
- Las diferencias sexuales en la expresión de ER- $\alpha$  y AR en estría terminalis y amígdala anterior del cerebro de embriones de E16 no dependen de los cromosomas sexuales sino de la presencia del gen *Sry*.
- El complemento cromosómico sexual determina las diferencias sexuales en la expresión del gen neuritogénico Ngn3 antes del período crítico.
- El efecto neuritogénico de E2 depende del complemento sexual ya que solo las neuronas hipotalámicas portadoras del complemento cromosómico sexual XY responden al ambiente hormonal incrementando la longitud axonal.
- El efecto de E2 sobre el factor de transcripción neuritogénico Ngn3 depende del complemento sexual ya que solamente las neuronas hipotalámicas portadoras del complemento cromosómico sexual XY responden al ambiente hormonal incrementando la expresión de Ngn3.
- El ambiente hormonal compensa las diferencias sexuales en la expresión de Ngn3 debidas al complemento cromosómico.

- E2 regula la expresión de Ngn3 en neuronas hipotalámicas de embriones XY wt por un mecanismo dependiente de la activación de los ER- $\alpha$ .



**Figura 37: Esquema que resume el rol de los cromosomas sexuales en la determinación de los dimorfismos sexuales estudiados.** El modelo animal transgénico de los cuatro genotipos permite evaluar y comparar una característica sexualmente dimórfica en los cuatro genotipos: XYM y XXM: machos gonadales, XYH y XXH: hembras gonadales. La expresión de receptores de hormonas esteroides (*Esr1* y *Ar*) fue dependiente del sexo gonadal en estría terminalis y amígdala anterior mientras que la expresión de aromatasa y de Neurogenina 3 (Ngn3) en neuronas de amígdala anterior y de hipotálamo respectivamente fue dependiente del complemento cromosómico sexual. Asimismo el efecto *in vitro* de E2 y DHT sobre estos dimorfismos y sobre la longitud axonal también fue dependiente del complemento cromosómico sexual. E2: 17 $\beta$  estradiol; DHT: dihidrotestosterona

En conjunto este trabajo de tesis contribuye a aclarar los mecanismos celulares y moleculares de la diferenciación sexual del cerebro, tema de considerable importancia fisiológica y biomédica en vista de la existencia de diferencias sexuales en cuadros de epilepsia, Parkinson, depresión, enfermedad cardiovascular, entre otros. Dado que generalmente uno de los sexos se encuentra protegido en la manifestación de estas enfermedades, el estudio de los mecanismos sexo-específicos que protegen al organismo permitirá el descubrimiento de nuevos factores protectores y terapias. Nuestros resultados constituyen nuevas y excitantes evidencias que indican la participación de los cromosomas sexuales en la diferenciación sexual del cerebro a través de la regulación de fenotipos sexualmente dimórficos como la expresión de aromatasa, responsable de la conversión de testosterona a estradiol, y el crecimiento neurítico involucrado en el establecimiento y diferenciación de circuitos neuronales durante el desarrollo. Conocer el origen y los mecanismos determinantes de estas diferencias tiene importantes implicancias para la comprensión de muchas funciones del cerebro y para el desarrollo de terapias efectivas en enfermedades neurológicas y psiquiátricas.



# **BIBLIOGRAFÍA**

- Amateau, S.K., Alt, J.J., Stamps, C.L., McCarthy, M.M., 2004. Brain estradiol content in newborn rats: Sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology* 145, 2906-2917. doi:10.1210/en.2003-1363
- Andrews, G.K., Dziadek, M., Tamaoki, T., 1982. Expression and methylation of the mouse alpha-fetoprotein gene in embryonic, adult, and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* 257, 5148-53.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., Edlund, H., 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-81. doi:10.1038/23716
- Arevalo, M.-A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2014. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 17-29. doi:10.1038/nrn3856
- Arevalo, M.A., Ruiz-Palmero, I., Scerbo, M.J., Acaz-Fonseca, E., Cambiasso, M.J., Garcia-Segura, L.M., 2012. Molecular mechanisms involved in the regulation of neuritogenesis by estradiol: Recent advances. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 131, 52-56. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.09.004
- Arevalo, M.A., Ruiz-Palmero, I., Simon-Areces, J., Acaz-Fonseca, E., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2010. Estradiol meets notch signaling in developing neurons. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2, 2009-2012. doi:10.3389/fendo.2011.00021
- Armoskus, C., Moreira, D., Bollinger, K., Jimenez, O., Taniguchi, S., Tsai, H.W., 2014. Identification of sexually dimorphic genes in the neonatal mouse cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1562, 23-38. doi:10.1016/j.brainres.2014.03.017
- Arnold, A.P., 2014. Conceptual frameworks and mouse models for studying sex differences in physiology and disease: Why compensation changes the game. *Exp. Neurol.* 1-8. doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.021
- Arnold, A.P., 2012. The end of gonad-centric sex determination in mammals. *Trends Genet.* 28, 55-61. doi:10.1016/j.tig.2011.10.004

- Arnold, A.P., 2009. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm. Behav.* 55, 570-578. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.03.011
- Arnold, A.P., Burgoyne, P.S., 2008. Are XX and XY brain cells intrinsically different? *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 6-11.
- Arnold, A.P., Chen, X., 2009. What does the «four core genotypes» mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Front. Neuroendocrinol.* 30, 1-9. doi:10.1016/j.yfrne.2008.11.001
- Arnold, A.P., Chen, X., Itoh, Y., 2012. What a difference an X or Y makes: sex chromosomes, gene dose, and epigenetics in sexual differentiation. *Handb. Exp. Pharmacol.* 67-88. doi:10.1007/978-3-642-30726-3\_4
- Arnold, A.P., Chen, X., Link, J.C., Itoh, Y., Reue, K., 2013. Cell-autonomous sex determination outside of the gonad. *Dev. Dyn.* 242, 371-379. doi:10.1002/dvdy.23936
- Auger, A.P., Auger, C.J., 2011. Epigenetic turn ons and turn offs: chromatin reorganization and brain differentiation. *Endocrinology* 152, 349-353. doi:10.1210/en.2010-0793
- Azcoitia, I., Garcia-Ovejero, D., Chowen, J.A., Garcia-Segura, L.M., 2001. Astroglia play a key role in the neuroprotective actions of estrogen. *Prog. Brain Res.* 132, 469-78. doi:10.1016/S0079-6123(01)32096-4
- Bakker, J., Baum, M.J., 2008. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 1-16. doi:10.1016/j.yfrne.2007.06.001
- Barraclough, C.A., 1961. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68, 62-67. doi:10.1210/endo-68-1-62
- Barraclough, C.A., Gorski, R.A., 1961. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68, 68-79. doi:10.1210/endo-68-1-68

- Baulieu, E.E., Robel, P., 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4089-91.
- Baum, M.J., 1979. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3, 265-284.
- Bayer, S.A., 1987. Neurogenetic and morphogenetic heterogeneity in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 265, 47-64. doi:10.1002/cne.902650105
- Bayer, S.A., Altman, J., 1987. Development of the preoptic area: time and site of origin, migratory routes, and settling patterns of its neurons. *J. Comp. Neurol.* 265, 65-95. doi:10.1002/cne.902650106
- Berezovska, O., McLean, P., Knowles, R., Frosh, M., Lu, F.M., Lux, S.E., Hyman, B.T., 1999. Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience* 93, 433-9.
- Berletch, J.B., Yang, F., Disteché, C.M., 2010. Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biol.* 11, 213. doi:10.1186/gb-2010-11-6-213
- Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517-30. doi:10.1038/nrn874
- Beyer, C., Green, S.J., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Hutchison, J.B., 1994a. Aromatase-immunoreactivity is localised specifically in neurones in the developing mouse hypothalamus and cortex. *Brain Res.* 638, 203-210. doi:10.1016/0006-8993(94)90651-3
- Beyer, C., Green, S.J., Hutchison, J.B., 1994b. Androgens influence sexual differentiation of embryonic mouse hypothalamic aromatase neurons in vitro. *Endocrinology* 135, 1220-6. doi:10.1210/endo.135.3.8070366
- Beyer, C., Pilgrim, C., Reisert, I., 1991. Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: sex differences and effects of sex steroids. *J. Neurosci.* 11, 1325-1333.

- Beyer, C., Wozniak, A., Hutchison, J.B., 1993. Sex-specific aromatization of testosterone in mouse hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 58, 673-681.
- Blanco, G., Diaz, H., Carrer, H.F., Beaugé, L., 1990. Differentiation of rat hippocampal neurons induced by estrogen in vitro: effects on neuritogenesis and Na, K-ATPase activity. *J. Neurosci. Res.* 27, 47-54. doi:10.1002/jnr.490270108
- Bray, S.J., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678-89. doi:10.1038/nrm2009
- Breedlove, S.M., Arnold, A.P., 1981. Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: response to adult hormone manipulation, absence in androgen-insensitive rats. *Brain Res.* 225, 297-307.
- Breedlove, S.M., Jacobson, C.D., Gorski, R.A., Arnold, A.P., 1982. Masculinization of the female rat spinal cord following a single neonatal injection of testosterone propionate but not estradiol benzoate. *Brain Res.* 237, 173-181.
- Breedlove, S.M., Jordan, C.L., Arnold, A.P., 1983. Neurogenesis of motoneurons in the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus in rats. *Brain Res.* 285, 39-43.
- Brock, O., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2010. Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology* 151, 1814-1821. doi:10.1210/en.2009-1379
- Büdefeld, T., Grgurevic, N., Tobet, S.A., Majdic, G., 2008. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev. Neurobiol.* 68, 981-995. doi:10.1002/dneu.20638
- Burgoyne, P.S., 1998. The role of Y-encoded genes in mammalian spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 423-432. doi:10.1006/scdb.1998.0228
- Burgoyne, P.S., Thornhill, A.R., Boudrean, S.K., Darling, S.M., Bishop, C.E., Evans, E.P., 1995. The genetic basis of XX-XY differences present before gonadal sex differentiation in the mouse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 350, 253-260 discussion 260-261. doi:10.1098/rstb.1995.0159

- Caeiro, X.E., Mir, F.R., Vivas, L.M., Carrer, H.F., Cambiasso, M.J., 2011. Sex chromosome complement contributes to sex differences in bradycardic baroreflex response. *Hypertension* 58, 505-511. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175661
- Cambiasso, M.J., Carrer, H.F., 2001. Nongenomic mechanism mediates estradiol stimulation of axon growth in male rat hypothalamic neurons in vitro. *J. Neurosci. Res.* 66, 475-481.
- Cambiasso, M.J., Colombo, J. a., Carrer, H.F., 2000. Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2291-2298. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00120.x
- Cambiasso, M.J., Díaz, H., Cáceres, A., Carrer, H.F., 1995. Neuritogenic effect of estradiol on rat ventromedial hypothalamic neurons co-cultured with homotopic or heterotopic glia. *J. Neurosci. Res.* 42, 700-9. doi:10.1002/jnr.490420513
- Carrel, L., Willard, H.F., 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434, 400-404. doi:10.1038/nature03479
- Carrer, H.F., Cambiasso, M.J., Gorosito, S., 2005. Effects of estrogen on neuronal growth and differentiation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93, 319-323. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.007
- Carruth, L.L., Reisert, I., Arnold, A.P., 2002. Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. *Nat. Neurosci.* 5, 933-934. doi:10.1038/nn922
- Celotti, F., Melcangi, R.C., Martini, L., 1992. The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Front. Neuroendocrinol.* 13, 163-215.
- Celotti, F., Negri-Cesi, P., Poletti, A., 1997. Steroid metabolism in the mammalian brain: 5alpha-reduction and aromatization. *Brain Res. Bull.* 44, 365-375.
- Chen, X., Watkins, R., Delot, E., Reliene, R., Schiestl, R.H., Burgoyne, P.S., Arnold, A.P., 2008. Sex difference in neural tube defects in p53-null mice is caused by

- differences in the complement of X not Y genes. *Dev. Neurobiol.* 68, 265-273. doi:10.1002/dneu.20581
- Chung, W.C., Swaab, D.F., De Vries, G.J., 2000. Apoptosis during sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat brain. *J. Neurobiol.* 43, 234-243.
- Chung, W.C.J., Auger, A.P., 2013. Gender differences in neurodevelopment and epigenetics. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 465, 573-584. doi:10.1007/s00424-013-1258-4
- Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., Haelens, A., 2008. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl. Recept. Signal.* 6, e008. doi:10.1621/nrs.06008
- Colciago, A., Celotti, F., Pravettoni, A., Mornati, O., Martini, L., Negri-Cesi, P., 2005. Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats. *Dev. Brain Res.* 155, 107-116. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.12.003
- Colciago, A., Celotti, F., Pravettoni, A., Mornati, O., Martini, L., Negri-Cesi, P., 2005. Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 155, 107-116. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.12.003
- Compagnone, N. a, Mellon, S.H., 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front. Neuroendocrinol.* 21, 1-56. doi:10.1006/frne.1999.0188
- Compagnone, N.A., Bulfone, A., Rubenstein, J.L., Mellon, S.H., 1995. Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136, 2689-2696.
- Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J., Baulieu, E.E., 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4704-4707.

- Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Beccari, L., Calcagnotto, M.E., Cisneros, E., Kim, S., Dopazo, A., Alvarez-Dolado, M., Redondo, J.M., Bovolenta, P., Walsh, C. a., Nieto, M., 2010. Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron* 66, 523-535. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.038
- Dadam, F.M., Caeiro, X.E., Cisternas, C.D., Macchione, A.F., Cambiasso, M.J., Vivas, L., 2014. Effect of sex chromosome complement on sodium appetite and Fos-immunoreactivity induced by sodium depletion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R175-184. doi:10.1152/ajpregu.00447.2013
- De Vries, G.J., 2004. Minireview: Sex Differences in Adult and Developing Brains: Compensation, Compensation, Compensation. *Endocrinology* 145, 1063-1068. doi:10.1210/en.2003-1504
- De Vries, G.J., Rissman, E.F., Simerly, R.B., Yang, L.-Y., Scordalakes, E.M., Auger, C.J., Swain, A., Lovell-Badge, R., Burgoyne, P.S., Arnold, A.P., 2002. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J. Neurosci.* 22, 9005-9014.
- Dewing, P., Chiang, C.W.K., Sinchak, K., Sim, H., Fernagut, P.O., Kelly, S., Chesselet, M.F., Micevych, P.E., Albrecht, K.H., Harley, V.R., Vilain, E., 2006. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr. Biol.* 16, 415-420. doi:10.1016/j.cub.2006.01.017
- Dewing, P., Shi, T., Horvath, S., Vilain, E., 2003. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Mol. Brain Res.* 118, 82-90. doi:10.1016/S0169-328X(03)00339-5
- Díaz, H., Lorenzo, A., Carrer, H.F., Cáceres, A., 1992. Time lapse study of neurite growth in hypothalamic dissociated neurons in culture: sex differences and estrogen effects. *J. Neurosci. Res.* 33, 266-281. doi:10.1002/jnr.490330210
- Döhler, K.D., Hancke, J.L., Srivastava, S.S., Hofmann, C., Shryne, J.E., Gorski, R.A., 1984. Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain;



- neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. *Prog. Brain Res.* 61, 99-117. doi:10.1016/S0079-6123(08)64430-1
- DonCarlos, L.L., 1996. Developmental profile and regulation of estrogen receptor (ER) mRNA expression in the preoptic area of prenatal rats. *Dev. Brain Res.* 94, 224-233. doi:10.1016/0165-3806(96)00067-3
- Dotti, C.G., Sullivan, C. a, Banker, G. a, 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454-1468.
- Ferreira, A., Caceres, A., 1991. Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J. Neurosci.* 11, 392-400.
- Forger, N.G., 2006. Cell death and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroscience* 138, 929-938. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.07.006
- Furukawa, A., Miyatake, A., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., 1998. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* 71, 2231-8.
- Garcia-Segura, L.M., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rodriguez, J.R., Hutchison, R.E., Hutchison, J.B., 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89, 567-578.
- Gatewood, J.D., Wills, A., Shetty, S., Xu, J., Arnold, A.P., Burgoyne, P.S., Rissman, E.F., 2006. Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *J. Neurosci.* 26, 2335-2342. doi:10.1523/JNEUROSCI.3743-05.2006
- Gioiosa, L., Chen, X., Watkins, R., Klanfer, N., Bryant, C.D., Evans, C.J., Arnold, A.P., 2008. Sex chromosome complement affects nociception in tests of acute and chronic exposure to morphine in mice. *Horm. Behav.* 53, 124-130. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.09.003

- Goodfellow, P.N., Lovell-Badge, R., 1993. SRY and sex determination in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 27, 71-92. doi:10.1146/annurev.ge.27.120193.000443
- Gorosito, S. V, Cambiasso, M.J., 2008. Axogenic effect of estrogen in male rat hypothalamic neurons involves Ca(2+), protein kinase C, and extracellular signal-regulated kinase signaling. *J. Neurosci. Res.* 86, 145-57. doi:10.1002/jnr.21466
- Gorosito, S. V., Lorenzo, a. G., Cambiasso, M.J., 2008. Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. *Neuroscience* 154, 1173-1177. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.05.001
- Goto, K., Koizumi, K., Ohta, Y., Hashi, M., Fujii, Y., Ohbo, N., Saika, O., Suzuki, H., Saito, K., Suzuki, K., 2005. Evaluation of general behavior, memory, learning performance, and brain sexual differentiation in F1 offspring males of rats treated with flutamide during late gestation. *J. Toxicol. Sci.* 30, 249-59.
- Gotsiridze, T., Kang, N., Jacob, D., Forger, N.G., 2007. Development of sex differences in the principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis of mice: role of Bax-dependent cell death. *Dev. Neurobiol.* 67, 355-362. doi:10.1002/dneu.20353
- Grassi, D., Bellini, M.J., Acaz-Fonseca, E., Panzica, G., Garcia-Segura, L.M., 2013. Estradiol and testosterone regulate arginine-vasopressin expression in SH-SY5Y human female neuroblastoma cells through estrogen receptors- $\alpha$  and - $\beta$ . *Endocrinology* 154, 2092-2100. doi:10.1210/en.2012-2137
- Graves, J.A.M., 2006. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 124, 901-14. doi:10.1016/j.cell.2006.02.024
- Gruber, C.J., Gruber, D.M., Gruber, I.M.L., Wieser, F., Huber, J.C., 2004. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 73-8. doi:10.1016/j.tem.2004.01.008
- Gubbay, J., Koopman, P., Collignon, J., Burgoyne, P., Lovell-Badge, R., 1990. Normal structure and expression of Zfy genes in XY female mice mutant in Tdy. *Development* 109, 647-653.

- Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M.K., 2012. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 3-8. doi:10.1016/j.mce.2011.10.004
- Guo, J.U., Ma, D.K., Mo, H., Ball, M.P., Jang, M.-H., Bonaguidi, M.A., Balazer, J.A., Eaves, H.L., Xie, B., Ford, E., Zhang, K., Ming, G., Gao, Y., Song, H., 2011. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat. Neurosci.* 14, 1345-51. doi:10.1038/nn.2900
- Han, T.M., De Vries, G.J., 1999. Neurogenesis of galanin cells in the bed nucleus of the stria terminalis and centromedial amygdala in rats: a model for sexual differentiation of neuronal phenotype. *J. Neurobiol.* 38, 491-498.
- Handa, R.J., Pak, T.R., Kudwa, A.E., Lund, T.D., Hinds, L., 2008. An alternate pathway for androgen regulation of brain function: activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Horm. Behav.* 53, 741-52. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.09.012
- Hisasue, S., Seney, M.L., Immerman, E., Forger, N.G., 2010. Control of cell number in the bed nucleus of the stria terminalis of mice: role of testosterone metabolites and estrogen receptor subtypes. *J. Sex. Med.* 7, 1401-9. doi:10.1111/j.1743-6109.2009.01669.x
- Huhtaniemi, I., 1994. Fetal testis--a very special endocrine organ. *Eur. J. Endocrinol.* 130, 25-31.
- Itoh, Y., Mackie, R., Kampf, K., Domadia, S., Brown, J.D., O'Neill, R., Arnold, A.P., 2015. Four Core Genotypes mouse model: localization of the Sry transgene and bioassay for testicular hormone levels. *BMC Res. Notes* 8, 1-7. doi:10.1186/s13104-015-0986-2
- Ivanova, T., Beyer, C., 2000. Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell Tissue Res.* 300, 231-237.

- Iwase, S., Lan, F., Bayliss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, H.H., Whetstone, J.R., Bonni, A., Roberts, T.M., Shi, Y., 2007. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell* 128, 1077-88. doi:10.1016/j.cell.2007.02.017
- Jiang, P.-P., Hartl, D.L., Lemos, B., 2010. Y not a dead end: epistatic interactions between Y-linked regulatory polymorphisms and genetic background affect global gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 186, 109-118. doi:10.1534/genetics.110.118109
- Karolczak, M., Küppers, E., Beyer, C., 1998. Developmental expression and regulation of aromatase- and 5alpha-reductase type I mRNA in the male and female mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 10, 267-274.
- King, S.R., Manna, P.R., Ishii, T., Syapin, P.J., Ginsberg, S.D., Wilson, K., Walsh, L.P., Parker, K.L., Stocco, D.M., Smith, R.G., Lamb, D.J., 2002. An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain. *J. Neurosci.* 22, 10613-20.
- Konkle, A.T.M., McCarthy, M.M., 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology* 152, 223-235. doi:10.1210/en.2010-0607
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117-121. doi:10.1038/351117a0
- Kristensen, J.B.L., Nielsen, A.L., Jørgensen, L., Kristensen, L.H., Helgstrand, C., Juknaite, L., Kristensen, J.L., Kastrop, J.S., Clausen, R.P., Olsen, L., Gajhede, M., 2011. Enzyme kinetic studies of histone demethylases KDM4C and KDM6A: towards understanding selectivity of inhibitors targeting oncogenic histone demethylases. *FEBS Lett.* 585, 1951-1956. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.023
- Kudwa, A.E., Michopoulos, V., Gatewood, J.D., Rissman, E.F., 2006. Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior. *Neuroscience* 138, 921-928. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.10.018

- Lamprecht, S.A., Kohen, F., Ausher, J., Zor, U., Lindner, H.R., 1976. Hormonal stimulation of oestradiol-17 beta release from the rat ovary during early postnatal development. *J. Endocrinol.* 68, 343-344.
- Lauber, M.E., Sarasin, A., Lichtensteiger, W., 1997. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 359-364.
- Lauber, M.E., Sarasin, A., Lichtensteiger, W., 1997. Sex Differences and Androgen-dependent Regulation of Aromatase (CYP19) mRNA Expression in the Developing and Adult Rat Brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 359-364.
- Lee, J., Wu, Y., Qi, Y., Xue, H., Liu, Y., Scheel, D., German, M., Qiu, M., Guillemot, F., Rao, M., Gradwohl, G., 2003. Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord. *Dev. Biol.* 253, 84-98.
- Lemos, B., Branco, A.T., Hartl, D.L., 2010. Epigenetic effects of polymorphic Y chromosomes modulate chromatin components, immune response, and sexual conflict. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15826-15831. doi:10.1073/pnas.1010383107
- Lenz, K.M., McCarthy, M.M., 2010. Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 32, 2096-2104. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07511.x
- Lephart, E.D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 22, 1-26.
- Lephart, E.D., Lund, T.D., Horvath, T.L., 2001. Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37, 25-37.
- Lephart, E.D., Simpson, E.R., McPhaul, M.J., Kilgore, M.W., Wilson, J.D., Ojeda, S.R., 1992. Brain aromatase cytochrome P-450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and perinatal development in the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 16, 187-192. doi:10.1016/0169-328X(92)90224-Y

- Lingenfelter, P.A., Adler, D.A., Poslinski, D., Thomas, S., Elliott, R.W., Chapman, V.M., Distèche, C.M., 1998. Escape from X inactivation of Smcx is preceded by silencing during mouse development. *Nat. Genet.* 18, 212-3. doi:10.1038/ng0398-212
- Lorenz, B., Garcia-Segura, L.M., DonCarlos, L.L., 2005. Cellular phenotype of androgen receptor-immunoreactive nuclei in the developing and adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 492, 456-68. doi:10.1002/cne.20763
- Lorenzo, a, Díaz, H., Carrer, H., Cáceres, a, 1992. Amygdala neurons in vitro: neurite growth and effects of estradiol. *J. Neurosci. Res.* 33, 418-435. doi:10.1002/jnr.490330308
- Ma, W., Yan, R.-T., Mao, W., Wang, S.-Z., 2009. Neurogenin3 promotes early retinal neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 187-98. doi:10.1016/j.mcn.2008.10.006
- MacLusky, N.J., Naftolin, F., 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211, 1294-1302.
- Majdic, G., Tobet, S., 2011. Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 137-145. doi:10.1016/j.yfrne.2011.02.009
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-9.
- Matsuda, K.I., Mori, H., Nugent, B.M., Pfaff, D.W., McCarthy, M.M., Kawata, M., 2011. Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology* 152, 2760-2767. doi:10.1210/en.2011-0193
- McCarthy, M., 2010. Sex and the Developing Brain, Colloquium Series on The Developing Brain. Morgan & Claypool Publishers. doi:10.4199/C00018ED1V01Y201010DBR001

- McCarthy, M.M., 2008. Estradiol and the developing brain. *Physiol. Rev.* 88, 91-124. doi:10.1152/physrev.00010.2007
- McCarthy, M.M., Arnold, A.P., 2011. Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat. Neurosci.* 14, 677-683. doi:10.1038/nn.2834
- McCarthy, M.M., Auger, A.P., Bale, T.L., De Vries, G.J., Dunn, G.A., Forger, N.G., Murray, E.K., Nugent, B.M., Schwarz, J.M., Wilson, M.E., 2009. The epigenetics of sex differences in the brain. *J. Neurosci.* 29, 12815-12823. doi:10.1523/JNEUROSCI.3331-09.2009
- McCarthy, M.M., Schlenker, E.H., Pfaff, D.W., 1993. Enduring consequences of neonatal treatment with antisense oligodeoxynucleotides to estrogen receptor messenger ribonucleic acid on sexual differentiation of rat brain. *Endocrinology* 133, 433-439. doi:10.1210/endo.133.2.8344188
- McEwen, B.S., Lieberburg, I., Chaptal, C., Krey, L.C., 1977. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Horm. Behav.* 9, 249-263.
- McEwen, B.S., Plapinger, L., Chaptal, C., Gerlach, J., Wallach, G., 1975. Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the associations of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res.* 96, 400-406.
- Melcangi, R.C., Garcia-Segura, L.M., Mensah-Nyagan, A.G., 2008. Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cell. Mol. life Sci. C.* 65, 777-797. doi:10.1007/s00018-007-7403-5
- Menger, Y., Bettscheider, M., Murgatroyd, C., Spengler, D., 2010. Sex differences in brain epigenetics. *Epigenomics* 2, 807-821. doi:10.2217/epi.10.60
- Micevych, P., Dominguez, R., 2009. Membrane estradiol signaling in the brain. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 315-27. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.011
- Midzak, A., Rone, M., Aghazadeh, Y., Culty, M., Papadopoulos, V., 2011. Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 70-79. doi:10.1016/j.mce.2010.12.007

- Morgan, C.P., Bale, T.L., 2011. Early Prenatal Stress Epigenetically Programs Dymasculinization in Second-Generation Offspring via the Paternal Lineage. *J. Neurosci.* 31, 11748-11755. doi:10.1523/JNEUROSCI.1887-11.2011
- Murray, E.K., Hien, A., De Vries, G.J., Forger, N.G., 2009. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology* 150, 4241-4247. doi:10.1210/en.2009-0458
- Murray, E.K., Varnum, M.M., Fernandez, J.L., de Vries, G.J., Forger, N.G., 2011. Effects of neonatal treatment with valproic acid on vasopressin immunoreactivity and olfactory behaviour in mice. *J. Neuroendocrinol.* 23, 906-914. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02196.x
- Naftolin, F., Horvath, T.L., Jakab, R.L., Leranth, C., Harada, N., Balthazart, J., 1996. Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology* 63, 149-155.
- Naftolin, F., Ryan, K.J., Davies, I.J., Reddy, V. V, Flores, F., Petro, Z., Kuhn, M., White, R.J., Takaoka, Y., Wolin, L., 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog. Horm. Res.* 31, 295-319.
- Negri-Cesi, P., Colciago, A., Motta, M., Martini, L., Celotti, F., 2001. Aromatase expression and activity in male and female cultured rat hypothalamic neurons: Effect of androgens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 1-10. doi:10.1016/S0303-7207(01)00442-7
- Niu, X., Zhang, T., Liao, L., Zhou, L., Lindner, D.J., Zhou, M., Rini, B., Yan, Q., Yang, H., 2012. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates gene expression and tumor growth through histone demethylase JARID1C. *Oncogene* 31, 776-786. doi:10.1038/onc.2011.266
- Nordeen, E.J., Nordeen, K.W., Sengelaub, D.R., Arnold, A.P., 1985. Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229, 671-673.



- Nugent, B.M., McCarthy, M.M., 2011. Epigenetic underpinnings of developmental sex differences in the brain. *Neuroendocrinology* 93, 150-158. doi:10.1159/000325264
- Nugent, B.M., Wright, C.L., Shetty, A.C., Hodes, G.E., Lenz, K.M., Mahurkar, A., Russo, S.J., Devine, S.E., McCarthy, M.M., 2015. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat. Neurosci.* 18, 690-7. doi:10.1038/nn.3988
- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, a. M., Charlton, H.M., Huhtaniemi, I., 1998. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139, 1141-1146. doi:10.1210/en.139.3.1141
- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Johnston, H., 2006. The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation. *Int. J. Androl.* 29, 90-95; discussion 105-108. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00555.x
- Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501. doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.002321
- Palaszynski, K.M., Smith, D.L., Kamrava, S., Burgoyne, P.S., Arnold, A.P., Voskuhl, R.R., 2005. A yin-yang effect between sex chromosome complement and sex hormones on the immune response. *Endocrinology* 146, 3280-5. doi:10.1210/en.2005-0284
- Pawlak, J., Karolczak, M., Krust, A., Chambon, P., Beyer, C., 2005. Estrogen receptor-alpha is associated with the plasma membrane of astrocytes and coupled to the MAP/Src-kinase pathway. *Glia* 50, 270-5. doi:10.1002/glia.20162
- Pelling, M., Anthwal, N., McNay, D., Gradwohl, G., Leiter, A.B., Guillemot, F., Ang, S.L., 2011. Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus. *Dev. Biol.* 349, 406-416. doi:10.1016/j.ydbio.2010.11.007
- Pezzi, V., Mathis, J.M., Rainey, W.E., Carr, B.R., 2003. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 181-9.

- Pfaff, D.W., 2009. Hormones, brain and behavior Volume one, chapters 1-20. Academic Press/Elsevier, Amsterdam.
- Phoenix, C., Goy, R., Gerall, A., Young, W., 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65, 369-382.
- Poletti, A., Coscarella, A., Negri-Cesi, P., Colciago, A., Celotti, F., Martini, L., 1998. 5 Alpha-Reductase Isozymes in the Central Nervous System. *Steroids* 63, 246-251.
- Poletti, A., Negri-Cesi, P., Melcangi, R.C., Colciago, A., Martini, L., Celotti, F., 1997. Expression of androgen-activating enzymes in cultured cells of developing rat brain. *J. Neurochem.* 68, 1298-1303.
- Quinn, J.J., Hitchcott, P.K., Umeda, E.A., Arnold, A.P., Taylor, J.R., 2007. Sex chromosome complement regulates habit formation. *Nat. Neurosci.* 10, 1398-1400. doi:10.1038/nn1994
- Raab, H., Beyer, C., Wozniak, a, Hutchison, J.B., Pilgrim, C., Reisert, I., 1995. Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid and aromatase activity in the rat midbrain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 34, 333-336. doi:10.1016/0169-328X(95)00196-Y
- Raynaud, J.P., 1973. Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. *Steroids* 21, 249-258.
- Reinius, B., Shi, C., Hengshuo, L., Sandhu, K.S., Radomska, K.J., Rosen, G.D., Lu, L., Kullander, K., Williams, R.W., Jazin, E., 2010. Female-biased expression of long non-coding RNAs in domains that escape X-inactivation in mouse. *BMC Genomics* 11, 614. doi:10.1186/1471-2164-11-614
- Reisert, I., Pilgrim, C., 1991. Sexual differentiation of monoaminergic neurons--genetic or epigenetic? *Trends Neurosci.* 14, 468-473.
- Ribeiro, C.M., Pereira, O.C.M., 2005. 5alpha-reductase 2 inhibition impairs brain defeminization of male rats: reproductive aspects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 228-35. doi:10.1016/j.pbb.2005.08.015

- Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2011. Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *J. Child Psychol. Psychiatry.* 52, 398-408. doi:10.1111/j.1469-7610.2010.02282.x
- Ruiz-Palmero, I., Hernando, M., Garcia-Segura, L.M., Arevalo, M.A., 2013. G protein-coupled estrogen receptor is required for the neurotogenic mechanism of 17 $\beta$ -estradiol in developing hippocampal neurons. *Mol. Cell. Endocrinol.* 372, 105-115. doi:10.1016/j.mce.2013.03.018
- Ruiz-Palmero, I., Simon-Areces, J., Garcia-Segura, L.M., Arevalo, M. a., 2011. Notch/Neurogenin 3 Signalling is Involved in the Neurotogenic Actions of Oestradiol in Developing Hippocampal Neurons. *J. Neuroendocrinol.* 23, 355-364. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02110.x
- Russell, D.W., Wilson, J.D., 1994. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 25-61. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.000325
- Salama-Cohen, P., Arévalo, M.-A., Grantyn, R., Rodríguez-Tébar, A., 2006. Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3. *J. Neurochem.* 97, 1269-78. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03783.x
- Salama-Cohen, P., Arévalo, M.-A., Meier, J., Grantyn, R., Rodríguez-Tébar, A., 2005. NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch. *Mol. Biol. Cell* 16, 339-47. doi:10.1091/mbc.E04-05-0438
- Santos-Rebouças, C.B., Fintelman-Rodrigues, N., Jensen, L.R., Kuss, A.W., Ribeiro, M.G., Campos, M., Santos, J.M., Pimentel, M.M.G., 2011. A novel nonsense mutation in KDM5C/JARID1C gene causing intellectual disability, short stature and speech delay. *Neurosci. Lett.* 498, 67-71. doi:10.1016/j.neulet.2011.04.065
- Scerbo, M.J., Freire-Regatillo, A., Cisternas, C.D., Brunotto, M., Arevalo, M.A., Garcia-Segura, L.M., Cambiasso, M.J., 2014. Neurogenin 3 mediates sex chromosome effects on the generation of sex differences in hypothalamic neuronal development. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1-13. doi:10.3389/fncel.2014.00188

- Schambra, 2008. Prenatal Mouse Brain Atlas - Color images and annotated diagrams of: Gestational Days 12, 14, 16 and 18 Sagittal, coronal and horizontal section. Springer, New York. doi:10.1007/978-0-387-47093-1
- Schambra, U.B., 2008. Prenatal Mouse Brain Atlas: Color images and annotated diagrams of: Gestational Days 12, 14, 16 and 18 Sagittal, coronal and horizontal section. Springer.
- Scott, H.M., Mason, J.I., Sharpe, R.M., 2009. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr. Rev.* 30, 883-925. doi:10.1210/er.2009-0016
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., Rakic, P., 1999. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286, 741-6.
- Shibuya, K., Takata, N., Hojo, Y., Furukawa, A., Yasumatsu, N., Kimoto, T., Enami, T., Suzuki, K., Tanabe, N., Ishii, H., Mukai, H., Takahashi, T., Hattori, T., Kawato, S., 2003. Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 301-316.
- Shinoda, K., 1994. Brain aromatization and its associated structures. *Endocr. J.* 41, 115-138. doi:10.1507/endocrj.41.115
- Shinoda, K., Nagano, M., Osawa, Y., 1994. Neuronal aromatase expression in preoptic, striatal, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *J. Comp. Neurol.* 343, 113-129. doi:10.1002/cne.903430109
- Sierra, A., 2004. Neurosteroids: the StAR protein in the brain. *J. Neuroendocrinol.* 16, 787-793. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01226.x
- Sierra, A., Lavaque, E., Perez-Martin, M., Azcoitia, I., Hales, D.B., Garcia-Segura, L.M., 2003. Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1458-67.

- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294, 76-95. doi:10.1002/cne.902940107
- Simon-Areces, J., Dopazo, A., Dettenhofer, M., Rodriguez-Tebar, A., Garcia-Segura, L.M., Arevalo, M.-A., 2011. Formin1 mediates the induction of dendritogenesis and synaptogenesis by neurogenin3 in mouse hippocampal neurons. *PLoS One* 6, e21825. doi:10.1371/journal.pone.0021825
- Simon-Areces, J., Membrive, G., Garcia-Fernandez, C., Garcia-Segura, L.M., Arevalo, M.-A., 2010. Neurogenin 3 cellular and subcellular localization in the developing and adult hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 518, 1814-24. doi:10.1002/cne.22304
- Smith-Bouvier, D.L., Divekar, A.A., Sasidhar, M., Du, S., Tiwari-Woodruff, S.K., King, J.K., Arnold, A.P., Singh, R.R., Voskuhl, R.R., 2008. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 205, 1099-1108. doi:10.1084/jem.20070850
- Spanic, T., Fabjan, T., Majdic, G., 2015. Expression levels of mRNA for neurosteroidogenic enzymes 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase, 3 $\alpha$ -HSD and cytochrome P450 aromatase in the fetal wild type and SF-1 knockout mouse brain. *Endocr. Res.* 40, 44-48. doi:10.3109/07435800.2014.933974
- Terasawa, E., Noel, S.D., Keen, K.L., 2009. Rapid action of oestrogen in luteinising hormone-releasing hormone neurones: the role of GPR30. *J. Neuroendocrinol.* 21, 316-21. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01839.x
- Tint, G.S., Yu, H., Shang, Q., Xu, G., Patel, S.B., 2006. The use of the Dhcr7 knockout mouse to accurately determine the origin of fetal sterols. *J. Lipid Res.* 47, 1535-1541. doi:10.1194/jlr.M600141-JLR200
- Toran-Allerand, C.D., 2005. Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1052, 136-144. doi:10.1196/annals.1347.009

- Toran-Allerand, C.D., 1987. Neuronal uptake of alpha-fetoprotein (AFP) synthesized and secreted by hepatocytes in liver/brain co-cultures. *Neurosci. Lett.* 83, 35-40.
- Toran-Allerand, C.D., 1984. On the genesis of sexual differentiation of the general nervous system: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of alpha-fetoprotein. *Prog. Brain Res.* 61, 63-98.
- Toran-Allerand, C.D., 1980. Coexistence of alpha-fetoprotein, albumin and transferrin immunoreactivity in neurones of the developing mouse brain. *Nature* 286, 733-735.
- Tsai, H.-W., Grant, P.A., Rissman, E.F., 2009. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics.* 4, 47-53.
- Tsuruo, Y., 2005. Topography and function of androgen-metabolizing enzymes in the central nervous system. *Anat. Sci. Int.* 80, 1-11. doi:10.1111/j.1447-073x.2005.00098.x
- Tsuruo, Y., Ishimura, K., Fujita, H., Osawa, Y., 1994. Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre- and postnatal development. *Cell Tissue Res.* 278, 29-39.
- Tsuruo, Y., Ishimura, K., Osawa, Y., 1995. Presence of estrogen receptors in aromatase-immunoreactive neurons in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* 195, 49-52.
- Turner, J.M., Mahadevaiah, S.K., Benavente, R., Offenberg, H.H., Heyting, C., Burgoyne, P.S., 2000. Analysis of male meiotic «sex body» proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions. *Chromosoma* 109, 426-32.
- Wagner, C.K., Xu, J., Pfau, J.L., Quadros, P.S., De Vries, G.J., Arnold, A.P., 2004. Neonatal Mice Possessing an Sry Transgene Show a Masculinized Pattern of Progesterone Receptor Expression in the Brain Independent of Sex Chromosome Status. *Endocrinology* 145, 1046-1049. doi:10.1210/en.2003-1219

- Wallen, K., 2009. The Organizational Hypothesis: Reflections on the 50th anniversary of the publication of Phoenix, Goy, Gerall, and Young (1959). *Horm. Behav.* 55, 561-565. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.03.009
- Wang, Y., Sousa, K.M., Bodin, K., Theofilopoulos, S., Sacchetti, P., Hornshaw, M., Woffendin, G., Karu, K., Sjövall, J., Arenas, E., Griffiths, W.J., 2009. Targeted lipidomic analysis of oxysterols in the embryonic central nervous system. *Mol. Biosyst.* 5, 529-541. doi:10.1039/b819502a
- Whalen, R.E., 1964. Hormone-induced changes in the organization of sexual behavior in the male rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 57, 175-182.
- Whalen, R.E., Olsen, K.L., 1981. Role of aromatization in sexual differentiation: effects of prenatal ATD treatment and neonatal castration. *Horm. Behav.* 15, 107-122.
- Wijchers, P.J., Festenstein, R.J., 2011. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends Genet.* 27, 132-140. doi:10.1016/j.tig.2011.01.004
- Wijchers, P.J., Yandim, C., Panousopoulou, E., Ahmad, M., Harker, N., Saveliev, A., Burgoyne, P.S., Festenstein, R., 2010. Sexual dimorphism in mammalian autosomal gene regulation is determined not only by Sry but by sex chromosome complement as well. *Dev. Cell* 19, 477-484. doi:10.1016/j.devcel.2010.08.005
- Wittmann, W., Iulianella, A., Gunhaga, L., 2014. Cux2 acts as a critical regulator for neurogenesis in the olfactory epithelium of vertebrates. *Dev. Biol.* 388, 35-47. doi:10.1016/j.ydbio.2014.01.026
- Wolstenholme, J.T., Rissman, E.F., Bekiranov, S., 2013. Sexual differentiation in the developing mouse brain: Contributions of sex chromosome genes. *Genes, Brain Behav.* 12, 166-180. doi:10.1111/gbb.12010
- Xu, J., Burgoyne, P.S., Arnold, A.P., 2002. Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1409-1419.

- Xu, J., Deng, X., Disteché, C.M., 2008a. Sex-specific expression of the X-linked histone demethylase gene *Jarid1c* in brain. *PLoS One* 3, 1-6. doi:10.1371/journal.pone.0002553
- Xu, J., Deng, X., Watkins, R., Disteché, C.M., 2008b. Sex-specific differences in expression of histone demethylases *Utx* and *Uty* in mouse brain and neurons. *J. Neurosci.* 28, 4521-4527. doi:10.1523/JNEUROSCI.5382-07.2008
- Xu, J., Taya, S., Kaibuchi, K., Arnold, A.P., 2005. Sexually dimorphic expression of *Usp9x* is related to sex chromosome complement in adult mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 21, 3017-3022. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04134.x
- Yague, J.G., Azcoitia, I., DeFelipe, J., Garcia-Segura, L.M., Muñoz, A., 2010. Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain Res.* 1315, 41-52. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.111
- Yague, J.G., Wang, A.C.-J., Janssen, W.G.M., Hof, P.R., Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., Morrison, J.H., 2008. Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Res.* 1209, 115-127. doi:10.1016/j.brainres.2008.02.061
- Yang, F., Babak, T., Shendure, J., Disteché, C.M., 2010. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res.* 20, 614-22. doi:10.1101/gr.103200.109
- Young, W.J., Chang, C., 1998. Ontogeny and autoregulation of androgen receptor mRNA expression in the nervous system. *Endocrine* 9, 79-88. doi:10.1385/ENDO:9:1:79
- Zhang, T.-Y., Meaney, M.J., 2010. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu. Rev. Psychol.* 61, 439-466, C1-3. doi:10.1146/annurev.psych.60.110707.163625
- Zuloaga, K.L., Swift, S.N., Gonzales, R.J., Wu, T.J., Handa, R.J., 2012. The androgen metabolite,  $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol, decreases cytokine-induced cyclooxygenase-2, vascular cell adhesion molecule-1 expression, and P-



glycoprotein expression in male human brain microvascular endothelial cells.  
Endocrinology 153, 5949-60. doi:10.1210/en.2012-1316

# **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

**Los resultados obtenidos en la tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos.**

### **Publicaciones**

- Scerbo MJ, Freire-Regatillo A, **Cisternas CD**, Brunotto M, Arevalo MA, Garcia-Segura LM and Cambiasso MJ Neurogenin 3 mediates sex chromosome effects on the generation of sex differences in hypothalamic neuronal development. *Front Cell Neurosci.* 8:188. 2014.
- **Cisternas CD**, Tome K, Caeiro XE, Dadam FM, García-Segura LM, Cambiasso MJ. Sex chromosome complement determines sex differences in aromatase expression and regulation in the developing brain. En revisión en *Mol Cell Endocrinol*. Manuscrito número: MCE-D-15-00256R1.

### **Presentaciones a congresos**

- **Cisternas CD**; Caeiro X; Mir F; Scerbo MJ; Cambiasso MJ. Participation of sex chromosome complement in the dimorphic expression of brain aromatase. II Reunión Conjunta de Neurociencias. II Reunión Conjunta de Neurociencias. XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN) and XII Taller Argentino de Neurociencias (TAN). Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 6-10 de Octubre de 2010.
- **Cisternas CD**; Caeiro X; Mir F; Scerbo MJ; Garcia-Segura LM; Cambiasso MJ. Participation of sex chromosome complement in the dimorphic expression of embryonic brain aromatase. Society for Neuroscience 2011 Annual Meeting. Washington DC, USA, Noviembre de 2011.
- **Cisternas CD**; Tomé K; Scerbo MJ; Cambiasso MJ. Sex differences in Ngn3 expression in primary hypothalamic neurons is determined by sex chromosomes. XXVIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Huerta Grande, Córdoba. Argentina, 30 de septiembre-4 de Octubre 2013.
- **Cisternas CD**; Caeiro X.; Mir F.; Cambiasso M. Diferencias sexuales en la expresión de los genes de aromatasa y de receptores de andrógeno y estrógeno en cerebro en desarrollo antes de la masculinización por esteroides gonadales *in utero*: rol del complemento cromosómico sexual. LVIII Reunión científica anual, Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión científica anual 2013 Sociedad Argentina de Fisiología y XLV Reunión científica anual Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mar del Plata, Argentina, 20-23 de Noviembre de 2013.

- **Cisternas CD**, Tome K, Cambiasso MJ. Expression of key steroidogenic enzymes in developing brain: hormonal compensation of sex chromosomes-induced sex differences. XXIX Annual Meeting and SAN-ISN Small Conference and course. Córdoba, Argentina, 29 de septiembre-3 de Octubre 2014.
- Tome K; **Cisternas CD**; Scerbo MJ; Cambiasso MJ. Abolition of the Sex Difference in Ngn3 by Estradiol is Depending on Sex Chromosome Complement. XXIX Annual Meeting and SAN-ISN Small Conference and course. Córdoba, Argentina, 29 de septiembre-3 de Octubre 2014.