

# Expresión génica relacionada con el ciclo celular, apoptosis, sinaptogénesis y diferenciación celular en la diferenciación sexual de la rata

## Genetic expression associated to cell cycle, apoptosis, synaptogenesis and cell differentiation during sex differentiation in rats

Héctor Herrera Gutiérrez<sup>a</sup>, Adolfo Rosado García<sup>b</sup>, Marcela Vergara Onofre<sup>a</sup>, Mauricio Salcedo Vargas<sup>c</sup>, Angel Miliar García<sup>d</sup>, Yvonne Heuze de Icaza<sup>a</sup>, Ana María Rosales-Torres<sup>a</sup>

### RESUMEN

Existen diferencias anatómico-funcionales importantes entre los hipotálamos de las ratas machos y hembras, las cuales son reguladas por esteroides sexuales durante un periodo crítico del desarrollo hipotalámico, especialmente por el estradiol; por ejemplo, en la rata macho, el núcleo dimórfico sexual del área preóptica es seis veces más grande que en la hembra, y en el núcleo arqueado de la hembra son más abundantes las conexiones sinápticas que en los machos. En este estudio se investigaron algunas diferencias entre machos y hembras en la expresión de genes relacionados con la apoptosis, neurogénesis y sinaptogénesis en ratas de 4 h de nacidas, además se evaluó el efecto de la administración temprana de propionato de testosterona (PT) a hembras y tamoxifen (Tx) a machos, sobre el patrón de expresión del grupo de genes referidos, para lo cual se usó un análisis con microarreglos de DNA, combinado con qPCR; se encontraron diferencias en la expresión de los genes en hipotálamos de hembras y machos. En las hembras, hubo una mayor expresión de genes relacionados con la apoptosis: *IL-24*, *Smpd3*, *Tpa*, *Pp4*, *Map3k1*, *Pge* y *Naca3*; con la diferenciación celular, *Neurod2*, *Zic1* y *Epo* y con la sinapsis y el control del ciclo celular; *Syt7*, *Tgfbr1*, *Ptf1a* y *Cox2*. También se muestra que la aplicación de Tx en los machos provocó un patrón de expresión génica similar al de las hembras testigo, mientras que el PT en las hembras no modificó la expresión de genes.

**PALABRAS CLAVE:** Diferenciación sexual hipotalámica, Microarreglos, Expresión de genes, Apoptosis, Diferenciación celular.

### ABSTRACT

Important anatomical-functional differences are found between hypothalamus of male and female rats which appear and are regulated by sexual steroids during the critical hypothalamic development period. This is especially true of estradiol's involvement. In this study, several genetic differences between male and female rats were assessed. These differences are related to gene expression to apoptosis, neurogenesis and synaptogenesis in four-hour old rats. The effect of early administration of testosterone propionate (TP) to female rats, and tamoxifen (Tx) to male rats on the gene pattern expression was reviewed using DNA microarray analysis combined with qPCR. Gene expression differences were found in female and male hypothalamus. In female rats, there was greater gene expression related to apoptosis: *IL-24*, *Smpd3*, *Tpa*, *Pp4*, *Map3k1*, *Pge* and *Naca3*; to cell differentiation, *Neurod2*, *Zic1* and *Epo*; and to synapsis and the control of the cell cycle, *Syt7*, *Tgfbr1*, *Ptf1a* and *Cox2*. It was also shown that administration of Tx to male rats caused similar genetic expression to that of female rats, while TP given to female rats was not as effective in modifying gene expression. These results clearly show that in the absence of estradiol in female rats, genes favoring cell death are expressed which may explain size differences in certain hypothalamic areas in male and female rats. This may be due too to the fact that in male hypothalamus, certain areas are provided with greater estradiol alpha type receptors and therefore with manifest neuroprotection and other areas with beta receptors where apoptosis predominates.

**KEY WORDS:** Hypothalamic sexual differentiation, Microarrays, Gene expression, Apoptosis, Cell differentiation.

Recibido el 8 de marzo de 2012. Aceptado el 14 junio de 2012.

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso # 1100 Col. Villa Quietud 04960 Delg. Coyoacán. México DF. Tel (52) 55 54837000 ext. 3082. anamaria@correo.xoc.uam.mx. Correspondencia al último autor.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México DF.

<sup>c</sup> Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional S XXI. IMSS, México, DF.

<sup>d</sup> Escuela Superior de Medicina, IPN. México DF.

## INTRODUCCIÓN

Las diferencias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento entre machos y hembras se denominan, en su conjunto, dimorfismo sexual; éste involucra cambios en algunos núcleos o circuitos cerebrales<sup>(1,2,3)</sup>. Por ejemplo, el tamaño del núcleo dimórfico sexual del área preóptica de la rata, es seis veces mayor en machos que en hembras<sup>(4)</sup>; el núcleo paraventricular es más grande en las ratas hembras que en las macho<sup>(5)</sup>. Hay un mayor desarrollo dendrítico del área preóptica en el macho<sup>(6)</sup> que en la hembra y en éstas, además hay un menor número de sinapsis en las espinas dendríticas del área preóptica del hipotálamo<sup>(5)</sup>. En cuanto a la función bioquímica, las neuronas de los machos tienen una mayor expresión y actividad de aromatización en comparación con las hembras<sup>(7)</sup>. La expresión del sistema calcio calmodulina, es mayor en las ratas macho que en las hembras<sup>(8)</sup>. Phoenix *et al*<sup>(9)</sup>, propusieron que el estradiol puede actuar fundamentalmente en dos formas diferentes: primero en una etapa "organizacional" durante el periodo prenatal y postnatal temprano, y en una etapa "activacional" en la edad adulta. El efecto organizacional del estradiol conduce a la diferenciación sexual del hipotálamo y regula activamente los circuitos neuronales sexualmente dimórficos<sup>(3)</sup>.

Durante el desarrollo, el cerebro de los machos está expuesto a altos niveles de testosterona de origen testicular que incrementan al final de la gestación y aproximadamente a las 2 h de nacidos; en contraste, la circulación de testosterona es consistentemente baja en ratas hembras perinatales. En ratas recién nacidas, los niveles de estradiol son relativamente bajos, pero en el macho son elevados debido a la aromatización de testosterona en neuronas de la periferia. Las alfa-fetoproteínas circulantes en el feto, se unen de manera específica al estradiol y en el caso del cerebro de las hembras, éstas lo protegen del efecto masculinizante del estradiol<sup>(10)</sup>; de esta manera se asume que los altos niveles de estrógenos

## INTRODUCTION

Morphological, physiological, biochemical and behavioral differences between males and females are known as sexual dimorphism, which involves changes in some brain nuclei and circuits<sup>(1,2,3)</sup>. For example, size of the sexual dimorphic nucleus in the preoptic area in rats is six times bigger in males than in females<sup>(4)</sup>, while the paraventricular nucleus is bigger in females<sup>(5)</sup>. A greater dendritic development of the preoptic area is seen in males<sup>(6)</sup> and in females less dendritic spine synapsis in the hypothalamus preoptic area are found<sup>(5)</sup>. Relative to biochemical functions, male neurons show greater aroma expression and activity than females<sup>(7)</sup>. Besides, calcium calmodulin system expression is greater in male than in female rats<sup>(8)</sup>. Phoenix *et al*<sup>(9)</sup> suggest that estradiol can act in two ways, one within an organizational phase in both prenatal and early postnatal periods and another in an "activity" phase in the adult period. The organizational effect of estradiol leads to sexual differentiation of the hypothalamus and actively regulates sexually dimorphic neuronal circuits<sup>(3)</sup>.

During development the male rat brain is exposed to high testicular testosterone levels which increase in the final phases of gestation, especially at two hours postpartum. On the other hand, testosterone circulation is consistently low in prenatal female rats. Estradiol levels are relatively low in newborn female rats but high in male rats because of testosterone aromatization in peripheral neurons. Alpha-fetoproteins that flow in fetuses bond in a specific manner to estradiol, and in female rat brains, these compounds protect against estradiol's male effects<sup>(10)</sup>. Like this, it can be accepted that the high plasmatic estrogen levels present in newborn female rats are trapped through bonds to these estrogen capturing proteins. On the other hand, in male rats, low testosterone concentrations can induce androgenization of the hypothalamus<sup>(11,12,13)</sup>. Dörner and Hinnz<sup>(14)</sup> found that presence of testosterone in male's critical period, which can

plasmáticos presentes en la rata recién nacida se encuentran secuestrados por su unión a estas proteínas fijadoras de estrógenos. Por el contrario, en el macho concentraciones bajas de testosterona, pueden ser capaces de provocar la androgenización del hipotálamo<sup>(11,12,13)</sup>. Dörner and Hinzn<sup>(14)</sup>, encontraron que la presencia de testosterona durante el periodo crítico en el macho, la cual puede ser de origen gonadal en el macho intacto o por la administración exógena de propionato de testosterona (PT) a una hembra o macho castrado, provoca la masculinización permanente. La participación fundamental que tienen los estrógenos en el proceso de diferenciación sexual se ha comprobado por diversos autores con el uso de antiestrógenos como el tamoxifen<sup>(15,16,17)</sup>; éste interfiere para que el estradiol interactúe con su receptor en el hipotálamo, además produce un efecto inhibitorio sobre aromatasas, que impide la transformación de los andrógenos testiculares a estrógenos<sup>(18)</sup>.

Las diferencias en el número de neuronas y conexiones sinápticas entre machos y hembras, pueden deberse a tres posibilidades: a la regulación de la sinaptogénesis, neurogénesis, o bien, a la participación del estradiol en la sobrevivencia, prevención o muerte neuronal<sup>(3,19)</sup>. Se ha propuesto que el efecto genómico del estradiol ocasiona en algunas áreas hipotalámicas diferencias sexuales en cuanto a los niveles de expresión de algunos genes<sup>(3,19,20)</sup>, que pueden modificar el desarrollo de núcleos hipotalámicos, por ejemplo el gen *Otp* puede alterar la neurogénesis; *Otp* y *SF-1*, la migración celular y los genes *Brn2*, *Sim1* y *Arnt2* median el proceso de muerte celular<sup>(19)</sup>.

El papel de los estrógenos es evidente como regulador de la intercomunicación neuronal, mediante su participación en dos tipos de procesos, en primera instancia la participación de los esteroides gonadales influyen en la determinación del número de neuronas que componen algunos núcleos dimórficos centrales, particularmente del Núcleo Dimórfico Sexual del

be gonadal in males or exogenous through administration of testosterone propionate (TP) to female rats and castrated males, originates permanent masculinization. The crucial participation of estrogens in the sexual differentiation process has been confirmed by several authors through use of androstrogens, like tamoxifen<sup>(15,16,17)</sup>, which affect interaction of estradiol with its receptor in the hypothalamus, besides producing a constraining effect on aromatase, which obstructs transformation of testicular androgens to estrogens<sup>(18)</sup>.

Differences in both neuron number and synaptic connections between male and female rats could be due to three possibilities, to regulation of synaptogenesis, or to neurogenesis, or to estradiol participation in neuron survival, prevention and death<sup>(3,19)</sup>. It has been suggested that estradiol's genomic effect causes sexual differences in some areas of the hypothalamus relative to expression of some genes<sup>(3,19,20)</sup>, which can modify the development of hypothalamic nuclei. For example, gene *Otp* can alter neurogenesis; genes *Otp* and *SF-1* cell migration and genes *Bm2*, *Sim1* and *Amt2* mediate the cell death process<sup>(19)</sup>.

Estrogen role is evident as a regulator of neuronal intercommunication, through its participation in two types of processes, the first being participation of gonadal steroids which influence in determining the number of neurons that integrate some central dimorphic nuclei, especially the Sexual Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area (SDN-POA) in the adult male rat and in the ventromedial in the female, and the second in organizing the dendritic tree in some neuronal areas. Besides, these hormones can stimulate neurogenesis or lengthen the period in which it takes place or modulate migration of newly formed neurons to the preoptic area (POA) and promote survival along this process, preventing cell death and at the same time participating in the specificity of neurons in terms of functionality and neurochemical identification. With the purpose of explaining differences in size and functionality of the

Área Pre-Óptica (SDN-APO) de la rata macho adulta y el núcleo ventromedial en la hembra, las hormonas gonadales también participan en la organización del árbol dendrítico de algunas regiones neuronales. Estas hormonas además pueden estimular la neurogénesis o prolongar el periodo en el que ocurre, o bien pueden modular la migración de neuronas recientemente formadas a las regiones del área preóptica (APO) y promover la sobrevivencia durante este proceso, previniendo la muerte celular, y a su vez participar en la especificidad de las neuronas en términos de funcionalidad o identificación neuroquímica. Con el propósito de explicar diferencias en tamaño y funcionalidad del hipotálamo de machos y hembras, en este trabajo se propuso conocer la expresión de algunos genes relacionados con muerte celular, apoptosis, neurogénesis, diferenciación y sinaptogénesis en hipotálamos de ratas machos y hembras recién nacidas y, conocer si la manipulación hormonal en la primera hora del nacimiento en ambos sexos modifica los niveles de expresión de estos grupos de genes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Obtención de muestra*

Ratas gestantes de la cepa Wistar, se mantuvieron en jaulas en un ambiente controlado (21° C de temperatura, 14 h de luz, 10 h de oscuridad), con agua y alimento *ad libitum*, hasta el parto. Se consideró como hora cero, el nacimiento de cada una de las crías de una camada. Las ratas recién nacidas, se distribuyeron al azar en los grupos experimentales de acuerdo al sexo. Se conformaron cuatro grupos; dos grupos de machos y dos de hembras con ocho animales cada uno. Una hora después del nacimiento, un grupo de hembras y uno de machos fueron tratados con 20 µl de aceite de girasol (grupos testigo), y los grupos restantes fueron los tratados; al grupo de ratas machos con el propósito de inducirles feminización, se le trató con 200 µg de tamoxifen (Tx), ya que se ha visto que, no solo actúa para impedir la aromatización de los andrógenos testiculares a

hypothalamus in both female and male rats, the authors of the present study set out to identify the expression of some genes related to cell death, apoptosis, neurogenesis, hypothalamus differentiation and synaptogenesis in both neonatal female and male rats and also ascertaining if hormonal manipulation in the first hour postpartum in both sexes can modify expression levels in these gene groups.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sample collection*

Gestating rats of the Wistar strain were kept in cages in a controlled environment (21 °C, 14 h light, 10 h darkness) and provided with water and feed *ad libitum*. The time of birth of each animal of a litter was taken into account as zero hour. Newborn rats were distributed at random in experimental groups in accordance with their sex. Four groups were formed, two groups of males and two females with eight animals each. One hour after birth, one group of females and one group of males were treated with 20 µl sunflower oil (control) and the other groups were treated in accordance with the following pattern: males were injected subcutaneously with 200 µg tamoxifen (Tx) diluted in 20 µl sunflower oil with the purpose of inducing feminization, because this drug not only inhibits aromatization of testicular androgens to estrogens but acts too on the subsequent interaction of these estrogens with nuclear material<sup>(20)</sup>; and females were injected subcutaneously with 30 µg testosterone propionate (PT) diluted in 20 µl sunflower oil for masculinization<sup>(21)</sup>. Rats in the four groups were beheaded 3 h post-treatment and their hypothalamus were dissected immediately following Vangala's method (modified), applying the following boundaries: optic chiasm at front, mammillary bodies at the rear end and hypothalamic grooves at both sides. Hypothalamus were stored at -70 °C until RNA isolation. Eight hypothalamus of each group were pooled and total RNA was extracted through the Chomczynski and Sacchi<sup>(23)</sup> method.

estrógenos, sino también a la subsecuente interacción de estos estrógenos con el material nuclear<sup>(20)</sup>, en 20  $\mu$ l de aceite de girasol; y al grupo de hembras, para masculinizarlas se le trató con 30  $\mu$ g de propionato de testosterona (PT) en 20  $\mu$ l de aceite de girasol por vía subcutánea<sup>(21)</sup>. Las ratas de los cuatro grupos se decapitaron a las 3 h post-tratamiento, e inmediatamente se realizó la disección de los hipotálamos mediante una modificación del método de Vangala<sup>(22)</sup>, utilizando los siguientes límites: anterior al quiasma óptico; posterior, los cuerpos mamilares, y lateralmente los surcos hipotalámicos de ambos lados. Los hipotálamos se almacenaron a -70 °C hasta el aislamiento del RNA. Se formaron pooles con los ocho hipotálamos de los animales de cada grupo y de ellos se extrajo el RNA total mediante la técnica de Chomczynski and Sacchi<sup>(23)</sup>.

#### *Microarreglos*

Se obtuvo cDNA a partir de 0.5  $\mu$ g de RNA total del pool de cada grupo, con el uso de un estuche comercial (Amersham RPN620 Cyscript). La identificación de la expresión de genes se realizó mediante el uso de microarreglos de cDNA 5k pan rat de MGW con 5,760 genes en laminillas de cristal. El marcaje y la hibridación del cDNA se realizó por competencia, de acuerdo a lo siguiente: a) en el microarreglo uno, se comparó la expresión de genes entre machos y hembras testigo, el cDNA de los machos se marcó con Cy5 y el de las hembras con Cy3; b) en el segundo microarreglo se compararon hembras testigo con hembras tratadas, en este caso se marcó con Cy5 el cDNA de las hembras testigo y con Cy3 a las hembras tratadas; c) en el tercer microarreglo, se compararon machos testigo con machos tratados, el cDNA de los machos testigo, se marcó con Cy5 y un escaner ScanArray 4000 Packard BioChips Technologies (Packard Co., Manning Road Billerica USA). La lectura del fluoróforo Cy3 se obtuvo a 532 nm y a 635 nm la de Cy5.

El análisis de las imágenes obtenidas de cada microarreglo, se realizó con el programa ARRAY-

#### *Microarrays*

cDNA was obtained from 0.5  $\mu$ g total RNA of each pool, by means of a commercial kit (Amersham RPN620 Cyscript). Gene expression was identified through cDNA 5k MGW Panrat microarrays in crystal slides. cDNA tagging and hybridization was carried out by means of competition in accordance with the following: a) In microarray 1 gene expression between control females and males, female cDNA was tagged with Cy3 and males with Cy5; b) In the second microarray control and treated females were compared, treated females were tagged with Cy3 and control with Cy5; c) In the third microarray treated and control males were compared, treated males were tagged with Cy3 and control with Cy5. Readings were obtained with the aid of a ScanArray 4000 Packard BioChips Technologies Scanner (Packard BioChip Technologies LLC, 39 Manning Rd, Billerica MA, USA). Cy3 fluorophore readings were obtained at 532 nm and Cy5 readings at 635 nm.

Images of each microarray were analyzed through the ARRAY-PRO ANALYZER software (Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD, USA), which was used for performing normalization and data analysis. Student's t test was employed for identifying natural logarithm distribution of the proportions of each gene regarding zero. Besides, probability ( $P < 0.05$ ) was estimated for determining statistical significance of the differential expression of each gene in each DNA matrix type.

Results obtained in the present study represent data of two independent measurements. It is worth mentioning that differences between results never went beyond 10-15 %, so averages are shown. The criterion followed for evaluating gene expression was: when a base 2 logarithm of the quotient of fluorescence values between problem and basal densities was greater than 1.2, it was considered overexpression and underexpression when below 1.2. Gene expression increases or drops were performed through comparison of fluorescence coefficients between control

PRO ANALIZER (Media Cybernetics, Inc. East-West Bethesda MD USA) que fue utilizado para realizar la normalización y el análisis de los datos. Se realizó una prueba de t-student para conocer la distribución de los logaritmos naturales de las proporciones de cada gen con respecto a 0, además se calculó el valor de la probabilidad ( $P < 0,05$ ) para determinar la significación estadística de la expresión diferencial de cada gen en cada tipo de matriz de ADN.

Los resultados de este estudio, representan los datos de dos determinaciones independientes, cabe señalar que en ningún caso, las diferencias entre los resultados fueron mayores a 10-15 %, por lo que se presentan los promedios. El criterio que se aplicó para evaluar la expresión de un gen, se hizo con respecto a lo siguiente: cuando el logaritmo base 2 del cociente de los valores de la fluorescencia que existe entre la densidad problema y la basal fue mayor a 1.2, se consideró expresado a la alta, y a la baja cuando el valor fue menor a -1.2 unidades. Los incrementos o disminuciones en la expresión de los genes se realizó comparando los coeficientes de fluorescencia entre hembras testigo (HT): machos testigo (MT), hembra testigo (HT): hembras tratadas con PT (HPT): machos testigo (MT) y machos tratados con Tx (MTx).

#### *Validación de la expresión mediante q-PCR y Universal Probe Library*

Para validar o corroborar la confiabilidad de los resultados de expresión génica obtenidos de los microarreglos, se calculó la expresión cuantitativa de los genes *Map3k1*, *Smpd3*, *Naca3* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), los genes se eligieron con base en los cambios importantes que mostraron en los microarreglos y porque representan procesos de muerte, supervivencia y control del ciclo celular respectivamente. Se verificó la pureza e integridad del RNA por electroforesis, se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de RNA total empleando hexámeros al azar con un estuche

females (CF) and control males (CM), of females treated with PT (FPT) with control females (CF) and of Tx treated males (MTx) with control males (CM).

#### *Expression validation through qPCR and Universal Probe Library*

For either validating or corroborating reliability of genic expression results obtained from the microarrays, quantitative expression of the *Map3k1*, *Smpd3*, *Naca3* genes was estimated through realtime polymerase chain reaction (qPCR). Genes were chosen based on important changes shown in microarrays and because they represented death, survival and cell cycle control process, respectively. RNA purity and integrity were verified through electrophoresis. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using hexamers at random with a commercial kit (Transcriptor cDNA Synthesis Kit, Roche Applied Science, Deutschland). qPCR was performed in a LightCycler 1.5 kit from Roche using specific designs for the already mentioned genes and *β-actin* as reference gene, by means of a TaqMan type universal probe system (Roche Applied Sciences, Universal ProbeLibrary Set, Rat, Cat. No. 04683650001), which uses a pattern of primers for PCR combined to a short 8-9 RNA nucleotide probe tagged with FAM reporter fluorochrome and switched off with DHQ. Reaction was performed in accordance with manufacturer's guidelines: 1 µl cDNA, primers 200 nM, 100 nM probe and 1X of the master mixture of the amplification commercial kit (LightCycler TaqMan Master, Cat. No. 04535286001, Roche Applied Sciences). Primer sequence and probe for each gene is shown in Table 1. The amplification program was recommended by the manufacturer which designed both probe and primers, that is to say 10 min at 95° activation and 40 PCR cycles followed by 95° for 10 sec, 60° for 30 sec and finally 72° for 1 sec. Amplification linearity and efficiency was assessed for every gene. Relative quantification statistical analysis ( $\Delta\Delta$  Ct) of genic expression of genes selected for validation was performed through the LightCycler 4.0

Cuadro 1. Iniciadores usados en la qPCR

Table 1. Starters used in qPCR

Gene bank	Gene	Gene Alias	UPLProbe	Starter sequence ggg
NM_031144	Rattus norvegicus actin, beta	<i>Actb</i>	#17	Forward 5'3'cccgcgagtagacaacc ttct Reverse 5'3'cgatcatcatgg cgaact
NM_019268	Rattus norvegicus solute carrier family 8 (sodium/ calciumexchanger), member 1	<i>Naca3</i>	#22	Forward 5'3'ttcttattgagattgga gaacc Reverse 5'3'tcatttaaca acagggccttc
NM_053605	Rattus norvegicus sphingomyelin phosphodiesterase 3 neutral	<i>Smpd3</i>	#97	Forward 5'3' acgctgaagagggc tgtg Reverse 5'3'gacagctgggt gataaaactga
NM_053887	Rattus norvegicus mitoge activated protein kinase kinase 1	<i>Map3k1</i>	#68	Forward 5'3'catccacatctagtcca gaaaaca Reverse 5'3'ccaaca agcagatgggaca

comercial (Transcriptor cDNA synthesis kit de Roche, Germany). La q-PCR se realizó en un equipo Roche LightCycler 1.5 utilizando diseños específicos para los genes mencionados y como gen de referencia  $\beta$ -actina, empleando el sistema de sondas universales tipo TaqMan (Roche, Universal Probe Library Rat set, cat. 04683650001), mismo que emplea un diseño de iniciadores para PCR en combinación con una sonda corta de 8-9 nucleótidos de RNA, marcada con el fluorocromo reportero FAM y apagada con DHQ. La reacción se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante: 1  $\mu$ l de cDNA, iniciadores 200 nM, sonda 100 nM y 1X de mezcla maestra del estuche comercial de amplificación LightCycler TaqMan Master (cat. 04535286001). La secuencia de iniciadores y sonda para cada gen se presenta en el Cuadro 1. El programa de amplificación fue el recomendado por la casa comercial que diseñó la sonda y los iniciadores, el cual consistió en: 10 min a 95 °C de activación y 40 ciclos de PCR seguido por 95° por 10 seg, 60° en 30 seg y por último 72° durante 1 seg, la linealidad y la eficiencia de la amplificación se evaluó para todos los genes. El análisis de cuantificación relativa ( $\Delta\Delta$  Ct) de la expresión génica de los genes seleccionados para la

software. Results are shown as changes of number of times that mRNA is expressed in a sample relative to  $\beta$ -actin (reference gene).

## RESULTS

Comparisons between results obtained in qPCR analysis of the three selected genes and those obtained through microarrays indicate that a correspondence greater than 90 % (Table 2) was found, which provides certitude to genic expression of every gene analyzed in microarrays.

Genes associated to death, survival and cell cycle control, which in accordance with established criteria either overexpress or underexpress themselves in rat hypothalamus in the groups being studied are shown in Table 3. Comparison between groups MC and HC indicate that the HC group shows overexpression in 24 genes, of which ten (*IL-24*, *No13*, *Ptgs2*, *Smpd3*, *Map3k1*, *Pge*, *Tpa*, *Pp4*, *Naca3*, *Bcl2l1*) are involved in cell death by apoptosis; four are related to cell differentiation (*Ptf1a*, *Neurod2*, *Zic1*, *Epo*); two to synaptogenesis (*Neurod2*, *Syt7*); six to cell proliferation (*Nri3*, *Strn3*, *Odc1*, *Cox2*, *Tgfbr1*,

Cuadro 2. Comparación entre la expresión cuantitativa por qPCR de tres genes y el análisis de la expresión realizado por microarreglos

Table 2. Comparison between quantitative expression by qPCR of three genes and expression analysis through microarrays

Gene	qPCR analysis				Microarrays analysis		
	CM	FPT	CF	MTx	FPT <sup>2</sup>	CF <sup>3</sup>	MTx <sup>1</sup>
MAP3K1	1.00	0.99	1.53	2.00	0.09	1.85	1.22
NACA3	1.00	0.86	1.30	1.13	0.15	1.48	2.38
SMPD3	1.00	1.08	1.29	1.15	0.94	2.00	2.23

Relative mRNA level; control males (CM)= 1.

<sup>1</sup>Control males vs Tx treated males; <sup>2</sup>Control females vs PT treated females;

<sup>3</sup>Control females vs control males.

Values indicate Log<sub>2</sub>.

MC=Control males; HPT= PT treated females; HC= control females; MTx= Tx treated males.

validación, se realizó empleando el software LightCycler 4.0. Los resultados se presentan como el cambio en el número de veces que un RNAm se expresa en una muestra con respecto al calibrador o gen constitutivo, en este caso  $\beta$ -actina.

## RESULTADOS

La comparación entre los resultados obtenidos del análisis de cuantificación relativa por qPCR de los tres genes seleccionados y los obtenidos por microarreglos indican que existe una correspondencia mayor al 90 % (Cuadro 2), lo cual le da certidumbre a la expresión génica de todos los genes analizados en los microarreglos.

Los genes asociados a los procesos de muerte, supervivencia y control del ciclo celular que de acuerdo a los criterios establecidos se expresaron a la alta y a la baja en hipotálamos de los grupos de ratas estudiados se presentan en el Cuadro 3. La comparación entre los grupos MC y HC indica que el grupo HC presenta una expresión a la alta en 24 genes, de los cuales 10 (*IL-24*, *No13*, *Ptgs2*, *Smpd3*, *Map3k1*, *Pge*, *Tpa*, *Pp4*, *Naca3* y *Bcl2l1*) están involucrados en la muerte celular por apoptosis; cuatro relacionados con diferenciación celular; (*Ptf1a*, *Neurod2*, *Zic1*, *Epo*), dos con sinaptogénesis

*Epo*) and four more (*Pf4*, *Vegfb*, *Rgn*, *Ss100a6*) to other activities. It should be noted that *Neurod2* participates in both cell differentiation and synaptogenesis, and *Epo* in both cell proliferation and differentiation. Comparison between the CM and MTx groups endorses that treatment with Tx in male rats caused overexpression in 17 genes (*IL-24*, *No13*, *Smpd3*, *Map3k1*, *Pge*, *Tpa*, *Pp4*, *Naca3*, *Ptf1a*, *Syt7*, *Nrli3*, *Strn3*, *Epo*, *Pf4*, *Vegfb*, *Rgn*, *S100a6*) which overexpressed too in control female rats. Besides, in the MTx group three genes related to cell proliferation and differentiation overexpressed (*Neurod1*, *Cspg4*, *Nos3*), which did not come about in the CF group. In accordance with results of the comparison between the CF and the FPT groups, treatment with PT in females did not significantly modify expression of the majority of genes of interest in the present study, opposite to what took place in males treated with Tx. The exception was gene *Vegfb* which controls angiogenesis. No other differences were found between these groups.

## DISCUSSION

Results obtained in the present study point out significant differences between the male and female hypothalamus in rats. Hypothalamus of



Cuadro 3. Análisis de la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, apoptosis, sinaptogénesis y diferenciación celular durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata

Table 3. Expression analysis of genes involved in cell cycle, cell differentiation, synaptogenesis and apoptosis across rat hypothalamic sexual differentiation

Access number	Gene	Function	CM vs CF	CM vs MTx	CF vs FPT
AF269251	<i>Il-24</i>	Induction of GADD family indicate p38 path MAPK .	1.47	1.22	-0.44
NM_022941	<i>Nr1i3</i>	Transcription regulation	1.32	1.37	0.17
M15254	<i>Pf4</i>	Angiogenesis negative regulation	2.64	1.45	0.69
AJ011115	<i>Nos3</i>	Response to estradiol stimulus	0.49	1.60	0.06
NM_031546	<i>Rgn</i>	Regulation of response mediated by calcium	1.41	1.40	0.66
NM_019218	<i>Neurod1</i>	Positive regulation of neural differentiation	0.44	1.45	-0.16
NM_053964	<i>Ptf1a</i>	Cell differentiation	1.50	1.86	0.71
AY026526	<i>Strn3</i>	Cell cycle	1.50	1.29	0.36
NM_053516	<i>No13</i>	Apoptosis regulation	1.64	1.46	-0.35
NM_017232	<i>Ptgs2</i>	Apoptosis positive regulation	1.85	1.01	0.29
NM_031022	<i>Cspg4</i>	Cell proliferation	0.58	1.31	0.27
NM_012615	<i>Odc1</i>	Cell proliferation regulation	1.35	1.01	0.94
NM_053605	<i>Smpd3</i>	Cell death induced by ceramides	2.00	2.23	0.94
NM_053887	<i>Map3k1</i>	Member of the kinase protein family activated by ceramides	1.85	1.22	0.09
NM_019326	<i>Neurod2</i>	Plays a critical role in synapsis. Neural differentiation inductor	1.34	0.57	0.25
NM_053485	<i>S100a6</i>	Calcicline activation. Besides participates in p53 dependent path	1.45	1.25	0.38
D88752_1	<i>Pge</i>	PGE regulation, apoptosis inductor in en neurons.	1.56	1.41	-0.02
NM_013151	<i>Tpa</i>	Related to microtubule destabilization and apoptosis	2.12	1.53	0.34
NM_017232	<i>Cox-2</i>	Conversion of arakidonic acid to prostaglandins. Participates in mitosis, angiogenesis	1.85	1.01	0.29
M58443	<i>Pp4</i>	Apoptosis, FNT signaling, c-Jun N-terminal kinases activation	1.62	1.33	1.16
NM_019268	<i>Naca3</i>	Ion interchange as Na <sup>+</sup> /Ca <sup>++</sup> , neural apoptosis, in neurodegenerative ailments	1.48	2.38	0.15
NM_022677	<i>Zic 1</i>	Neural development and differentiation	1.59	0.99	0.48
AF022952	<i>Vegfb</i>	Related to angiogenesis	2.91	1.95	1.41
NM_053733	<i>Bcl2l</i>	Apoptosis inhibitor, neuroprotection	1.74	1.13	0.17
AF336858	<i>Syt7</i>	Participates in synaptic enzymes fusion during neuronal transmission	1.65	1.47	0.97
NM_012775	<i>Tgfbr1</i>	Involved with transforming growth factor	2.4	1.09	1.06
NM_017001	<i>Epo</i>	Neural development and differentiation	1.80	1.59	-0.18

Fluorescence coefficient distribution analysis between densities and basal values in the three studied groups is represented expressed in log<sub>2</sub> of the Cy3:Cy5 ratio in neonatal rats' hypothalamus in accordance with the following comparisons: CM vs CF, CM vs MTx and CF vs FPT.

CF= control females; HPT= FPT treated females; MTx = Tx treated males; CM= control males.

(*Neurod2* y *Syt7*) y seis con proliferación celular (*Nri3*, *Strn3*, *Odc1*, *Cox2*, *Tgfbr1* y *Epo*), así como cuatro genes más con actividades diversas (*Pf4*, *Vegfb*, *Rgn*, *Ss100a6*), cabe señalar que *Neurod2* participan en la diferenciación y sinaptogénesis, y *Epo* en proliferación y diferenciación. La comparación entre los grupos

control female rats when compared to that of male control rats showed greater expression to genes related to cell death, cell proliferation, cell differentiation and synaptogenesis (24 overexpressed genes). In addition it is shown that rat hypothalamus, especially of males, responds at a very early age (1 hour

MT y MTx, permite observar que el tratamiento a ratas macho con Tx provocó la expresión al alta de 17 genes (*IL-24, No13, Smpd3, Map3k1, Pge, Tpa, Pp4, Naca3, Ptf1a, Syt7, Nrli3, Strn3, Epo, Pf4, Vegfb, Rgn, S100a6*), los cuales cabe señalar que también fueron expresados a la alta en las hembras testigo. En el grupo MTx, además se expresaron a la alta tres genes relacionados con proliferación y diferenciación celular (*Neurod1, Cspg4* y *Nos3*), lo cual no ocurrió en el grupo HC. Según los resultados de la comparación entre el grupo HT y HPT, indican que a diferencia del efecto del tratamiento con Tx que presentaron los machos, en las hembras el tratamiento con PT, no se modificó de forma significativa la expresión de la gran mayoría de los genes de interés en este trabajo, de manera que con excepción del gen *Vegfb*, que regula la angiogénesis, no hubo más diferencias entre estos grupos.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo señalan diferencias importantes entre el hipotálamo de hembras y machos en la rata. Los hipotálamos de las hembras sin tratamiento comparados con los machos en la misma condición tuvieron una mayor expresión de genes relacionados con la muerte celular, proliferación, sinaptogénesis y diferenciación celular (24 genes expresados a la alta). Adicionalmente se demuestra que el hipotálamo de las ratas, especialmente el de los machos, responde a muy temprana edad (una hora de nacidas) al tratamiento hormonal. El hipotálamo de los machos tratados con Tx, en términos de expresión de los genes estudiados en este trabajo, se acercó mucho al número de genes expresados a la alta (17 de 24 genes) en el hipotálamo de las hembras testigo. Mientras tanto, las hembra tratadas en comparación con las testigo, sólo expresaron a la alta un gen, *Vegfb*.

En este trabajo se demostró por primera vez la expresión de 10 genes relacionados con la apoptosis en las hembras testigo, cuatro de los cuales (*IL-24, No13, Smpd3* y *Naca3*) participan

postpartum) to hormone treatments. Male hypothalamus treated with Tx, in terms of expression of genes analyzed in the present study, was very close to the number of overexpressed genes (17 out of 24) in hypothalamus of control female rats, while only one gene (*Vegfb*) overexpressed itself in hypothalamus of treated female rats when compared to those of control.

In the present study it is shown for the first time expression of ten genes related to apoptosis in control female rats, four of which (*IL-24, No13, Smpd3, Naca3*) take part in signaling the beginning of apoptosis<sup>(24,25,26)</sup>, which provides support to findings relative to cell death that could help explain the smaller volume found in some hypothalamic areas or nuclei reported by other authors in female rats<sup>(19,27,28)</sup>. It should be noted that that up to now that presence of apoptosis only had been reported in hypothalamic cells in very late times in sexual differentiation of the hypothalamus (from 25 h to 6 d postpartum)<sup>(27,28)</sup>, while expression of genes related to signaling apoptosis at an early stage (4 h postpartum) is clearly shown in the present study .

It is widely known that estradiol holds an important role in establishing sexual dimorphism<sup>(11,12)</sup> in males. Estrogens, product of aromatization of testosterone produced in gonads are necessary for masculinization and defeminization of brain circuits that modulate behavior and gonadotrophic secretion, typical of their sex. This process is circumvented in females because of lower testosterone levels and estrogens present in female fetuses bond with great affinity to the alpha-fetus protein thus avoiding their arrival to the central nervous system (SNC)<sup>(29)</sup>. Estradiol participates in cell differentiation and proliferation and also in cell death prevention in SNC<sup>(30)</sup>. This functional difference of estradiol is basically due to its capacity to interact with two types of receptors in cells of the hypothalamus:  $\alpha$  receptors ( $ER\alpha$ ) and  $\beta$  receptors ( $ER\beta$ ), and although both present the same affinity for estrogens, their

en la señalización del inicio del proceso de la apoptosis<sup>(24,25,26)</sup>, lo cual da fundamento a los hallazgos encontrados sobre muerte celular que pueden ser la explicación al menor volumen en algunas áreas o núcleos hipotalámicos que otros autores han reportado en las hembras<sup>(19,27,28)</sup>. Es importante señalar que hasta ahora sólo se había reportado la presencia de apoptosis en las células hipotalámicas en tiempos muy tardíos de la diferenciación sexual del hipotálamo (de 25 h a 6 días después del nacimiento)<sup>(27,28)</sup>, mientras que en este trabajo se demuestra la expresión de genes relacionados con la señalización de la apoptosis en una etapa muy temprana del nacimiento (4 h post nacimiento).

Es ampliamente conocido que el estradiol participa de manera muy importante en el establecimiento del dimorfismo sexual<sup>(11,12)</sup>, en el macho, los estrógenos, producto de la aromatización de la testosterona que producen sus gónadas, son necesarios para masculinizar y desfeminizar los circuitos cerebrales que regulan el comportamiento y la secreción gonadotrófica típicas de su sexo, lo cual en la hembra, es evitado porque maneja niveles mucho más bajos de testosterona que el macho, y los estrógenos presentes en el feto hembra se unen con alta afinidad a la alfa-feto proteína evitando su llegada al sistema nervioso central (SNC)<sup>(29)</sup>. El estradiol, participa en la diferenciación, proliferación y prevención de la muerte celular en el SNC<sup>(30)</sup>; esta diferencia funcional del estradiol se debe básicamente a que puede interactuar con dos tipos de receptores en las células hipotalámicas: los receptores  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y los receptores  $\beta$  (ER $\beta$ ) y aunque ambos presentan la misma afinidad por los estrógenos, la respuesta que produce cada uno es diferente<sup>(31)</sup>, La unión de estradiol a ER $\alpha$  o al heterodímero ER $\alpha$ -ER $\beta$  ejercen un efecto neuroprotector, mientras que la interacción con el receptor ER $\beta$ , sin la presencia de ER $\alpha$  potencializa la apoptosis<sup>(32)</sup>. Los receptores alfa y beta están distribuidos en el hipotálamo y otras áreas dimórficas del cerebro, de manera que durante la etapa sensible al estradiol, la presencia de ER $\alpha$  en áreas como

response is different<sup>(31)</sup>. Bonding of estradiol to ER $\alpha$  and to the heterodimer ER $\alpha$ -ER $\beta$  has a neuroprotector effect, while interaction with ER $\beta$ , in absence of ER $\alpha$  potentiates apoptosis<sup>(32)</sup>. Alpha and beta receptors are distributed throughout the hypothalamus and other dimorphic brain areas in such a way that during the estradiol sensitive stage, presence of ER $\alpha$  in areas as SDN-APO reduces apoptosis causing a greater development of this area in males than in females, and apoptosis could therefore be encouraged in such areas as the dimorphic periventricular preoptic nucleus (AvPVN), so this area is smaller in males<sup>(33)</sup>. It has been seen too that in the non-genomic aspects of estradiol throughout sexual differentiation of the hypothalamus, the role of Ca<sup>++</sup>/calmodulin, which mediates inflammatory, metabolic and apoptotic processes, besides regulating intracellular movement and growth of nervous cells, interacts too with a wide range of enzymes and components of the cell skeleton setting off highly specific biochemical reactions that take place through these proteins. In addition the Ca<sup>++</sup>/calmodulin complex activates a series of kinases that in the last instance phosphorylate transcription factors, which regulate genic expression. The AMPc phosphodiesterase enzyme is regulated by this complex, which is a bond between the action of two second messengers, calcium and AMPc, besides participating in GMPc production. Information is available that confers an important role to the Ca<sup>++</sup>/calmodulin system in sexual differentiation in the hypothalamus. In the male rat, higher levels of this complex than in females are found, as well as greater expression levels of this protein in the right region, thus presenting a functional symmetry across this period<sup>(9,21,34)</sup>.

Results shown in the present study point out that when Tx is applied to males one hour postpartum and sacrificed 3 h after, genic expression pattern is very similar to that of control females, which indicates that this treatment feminizes the male hypothalamus and highlights the importance of estradiol in its

el SDN-APO reduce la apoptosis provocando un mayor tamaño de esta área en machos que en hembras y, puede verse favorecida la apoptosis en áreas como el núcleo dimórfico anteroventral periventricular (AvPVN), por eso, es más pequeña esta área en los machos<sup>(33)</sup>. También se ha visto que dentro de los aspectos no genómicos del estradiol durante la diferenciación sexual del hipotálamo está el papel que juega el sistema de  $Ca^{2+}$ /calmodulina el cual media procesos inflamatorios, metabólicos, apoptóticos, además de regular el movimiento intracelular y el crecimiento de células nerviosas; asimismo interactúa con un amplio rango de enzimas y componentes del citoesqueleto disparando respuestas bioquímicas altamente específicas que se ejercen a través de las proteínas. Adicionalmente el complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina activa una serie de cinasas que en última instancia fosforilan factores de transcripción, que regulan la expresión génica. La enzima fosfodiesterasa de AMPc es regulada por este complejo, lo que significa un nexo de unión entre la actuación de dos segundos mensajeros, el calcio y el AMPc, además participa en la producción de GMPc. Existe información que confiere al sistema  $Ca^{2+}$ /calmodulina en hipotálamo un papel importante en la diferenciación sexual; en la rata macho los niveles de este complejo son mayores que en la hembra, así como mayor nivel de expresión de la proteína en machos en la región derecha, presentando entonces una simetría funcional durante este periodo<sup>(9,21,34)</sup>.

Nuestros resultados indican que cuando se aplica Tx a machos de una hora de nacidos y sacrificados 3 h después, el patrón de expresión génica es muy similar al de las hembras testigo, lo cual indica que el tratamiento feminiza el hipotálamo del macho y resalta la importancia del estradiol en el proceso de diferenciación sexual del hipotálamo. Sin embargo la expresión génica de las hembras tratadas con PT dejó claro que esta hormona aplicada una hora después del nacimiento, no cambia de manera sustancial la expresión de genes de las hembras sacrificadas tres horas después, estos resultados

sexual differentiation process. However, genic expression of females treated with PT one hour postpartum and sacrificed three hours later did not change substantially. These results differ from what is reported by other authors on the effect of this treatment in adult animals. For example, Phoenix *et al.*<sup>(9)</sup> and Barraclough<sup>(15)</sup> point out that administration of 1.25 mg PT to females in the prenatal stage and early postnatal stage, induces anovulation, persistent estrus and masculine traits in the adult age. However, other studies report changes in gene c-fos mRNA expression in female rats 2 h post treatment with PT<sup>(35)</sup>. In other studies it has been stated that when female rats are treated with testosterone a male stereotypic development can be induced, but only when doses are high and for long periods. In addition, negative qualitative and quantitative changes have been reported in conduct of females treated with PT<sup>(36,37)</sup>.

The present authors suggest that PT treated females do not show changes of importance in genic expression, because the female hypothalamus is less efficient than that of males for aromatizing testosterone. It is known that androgens are aromatase inductors in hypothalamus, so the difference in aromatase activity between males and females could be due to a lower estrogen amount in circulation in females. It has been shown too that presence of aromatase mRNA in the first two days of life is greater in males than in females in several hypothalamic dimorphic nuclei and that this difference shrinks on d 15<sup>(38,39)</sup> approximately. Likewise, it has been reported that estradiol level in males is higher in males than in females 2 h postpartum and too, that estradiol administration to females does not result in an increase of estradiol levels in their hypothalamus because aromatase concentration in the female hypothalamus is very low when compared to that of males<sup>(40,41)</sup>.

As it has been said before, besides neuroprotection, estradiol has been attributed with having effects on neural growth and

difieren al menos en lo que otros autores han reportado del efecto de este tratamiento evaluado en la vida adulta, por ejemplo: Phoenix *et al*<sup>(9)</sup> y Barraclough<sup>(15)</sup> señalaron que la administración de 1.25 mg PT a hembras durante la etapa fetal y los primeros días después del nacimiento, provocan anovulación, estro persistente y características masculinas en la edad adulta. Sin embargo otros estudios han reportado cambios en la expresión de mRNA del gen c-fos a las 2 h después del tratamiento con PT a ratas hembras<sup>(35)</sup>. En otros trabajos, se ha demostrado que el tratamiento a hembras con testosterona puede inducir un desarrollo estereotípico de macho, pero sólo cuando la hormona es administrada en altas dosis y en periodos largos de exposición, adicionalmente se ha reportado que existen cambios negativos cualitativos y cuantitativos en la conducta de las hembras tratadas con PT<sup>(36,37)</sup>.

Nosotros proponemos que las hembras tratadas con PT, no mostraron cambios importantes en la expresión génica, debido a que el hipotálamo de la hembra es menos eficiente que el del macho para aromatizar la testosterona. Se conoce que los andrógenos son los inductores de la aromatasa en el hipotálamo, por lo que la diferencia en la actividad de la aromatasa en las hembras puede ser debida a la menor cantidad de andrógenos circulantes que éstas manejan. Se ha demostrado que la presencia de RNAm de la aromatasa durante los primeros dos días de vida son mayores en el macho que en la hembra en varios núcleos dimórficos hipotalámicos y esta diferencia sólo disminuye alrededor del día 15 de vida<sup>(38,39)</sup>. También se ha reportado que el nivel de estradiol en machos es mayor que en hembras a las 2 h de nacidos y que la administración de PT a hembras no tiene ningún efecto en los niveles de estradiol en el hipotálamo debido a que la concentración de aromatasa en el hipotálamo de hembras es muy bajo comparado con el de machos<sup>(40,41)</sup>.

Como se dijo, además de la neuroprotección, al estradiol se le han atribuido efectos en el crecimiento y diferenciación neuronal<sup>(42,43)</sup>, sin

differentiation<sup>(42,43)</sup>. However, results obtained in the present study do not endorse this notion, because genes *Neurod2*, *Zic1*, *Epo*, *Tgf1a*, whose function is related to synaptogenesis and differentiation, overexpressed themselves in the hypothalamus of the female rat. Moreover, when gene expression was compared in control and Tx treated male rats no differences in expression were found for genes *Neurod2*, *Zic1*, *Tgf1a*, which supports the notion that estrogens are not directly responsible for expression of genes linked to neural differentiation, as other authors state<sup>(44)</sup>.

The present authors propose a route that involves some genes detected in the present study and could help explain functional anatomical differences in the hypothalamus of males and females: overexpression of gene *1124 (Mda-7)* exerts its involvement through apoptosis induction mediating both function and expression of the Gadd (growth arrest and DNA damage) family. At the same time this family has effects on decrease of both *bcl2* expression and function<sup>(26,45)</sup> and in sphingomyelin increase, such as sphingomyelin phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) that mediates both ceramidase and Fas-fas ligand system activation<sup>(24,25,32)</sup> which trigger a flow of events that block the cell cycle (PI3K, PKA) and leads to neuron apoptosis as mentioned by other authors<sup>(46)</sup>. Besides, expression of genes that regulate calcium levels in cells, such as *Naca*, are involved in the death process through increases in the calcium level, which have an important function in apoptosis. For example, calcium necessity for activation of endonucleases which break down DNA and produces the classic image of a ladder when it is made to slide across agarose gel is well known<sup>(47)</sup>, or for genes *TPA* and *PP4* overexpression which can modulate cell death too through activation of a Bad proapoptotic protein, besides inhibiting some growth factors, such as NGF<sup>(48)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The rat brain 4 h postpartum presents considerable differences between sexes

embargo nuestros resultados, no apoyan esta idea, ya que en los hipotálamos de las hembras se expresaron a la alta los genes *Neurod2*, *Zic1*, *Syt7*, *Epo* y *Tgf1a*, cuya función está relacionada con diferenciación y sinaptogénesis. Adicionalmente cuando se comparó la expresión de genes entre hipotálamos de machos control y tratados con Tx, no se vieron diferencias en la expresión de los genes *Neurod2*, *Zic1* y *Tgf1a*, lo cual apoya que los estrógenos no son los responsables directos de la expresión de genes que están ligados a la diferenciación neuronal como otros lo indican<sup>(44)</sup>.

Nosotros proponemos una ruta en la cual se involucran a algunos de los genes detectados en este trabajo y que puede ayudar a explicar las diferencias anatomo funcionales en el hipotálamo de machos y hembras: la sobreexpresión del gen *1124 (Mda-7)*, ejerce su participación con la inducción de la apoptosis mediando la expresión y función de la familia Gadd (growth arrest and DNA damage), a su vez esta familia tiene efectos sobre la disminución en la función y expresión de *bcl-2*<sup>(26,45)</sup> y en el aumento de las esfingomielinas como la sphingomyelin phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) la cual media la activación de las ceramidasa y la activación del sistema Fas-Fas ligand<sup>(24,25,32)</sup> y con ello se desencadena la cascada de eventos que llevan al bloqueo del ciclo celular (PI3K, PKA) y lleva a la apoptosis de las neuronas tal como otros lo mencionan<sup>(46)</sup>. Además, la expresión de genes que regulan los niveles de calcio en la célula como el gen *Naca* están involucrados en el proceso de muerte al aumentar los niveles de calcio, los cuales tienen una importante participación durante la apoptosis; por ejemplo, se conoce ampliamente la necesidad del calcio para activar a las endonucleasas que rompen el DNA y provocan la clásica imagen de escalera cuando éste se hace correr a través de un gel de agarosa<sup>(47)</sup>, o bien se aumentan los niveles de expresión de los genes *TPA* y *PP4* que también pueden modular la muerte, al activar a Bad que es una proteína proapoptótica, además de inhibir a algunos factores de crecimiento como NGF<sup>(48)</sup>.

regarding expression of genes that participate in apoptosis, cell cycle and cell differentiation. Results of the present study suggest too that female brain organizational establishment is an active process because the number of overexpressed genes control the effect of Tx in gene over expression levels and too that these increases involve an active change which feminizes males. It should be mentioned that it has been suggested that the brain is bipotential and that depending on the type of stimulus for developing patterns in the first four hours after birth, rat hypothalamus is more sensitive to hormonal changes, particularly in males because inhibition of estradiol action by administration of Tx caused hypothalamic feminization. On the other hand, the female hypothalamus did not modify substantially its genic expression when treated with an estradiol source, such as PT. In female rats, low concentration or absence of estradiol is necessary for feminization of the hypothalamus, so estrogen requirements in males relative to females are more quantitative than qualitative in character. Besides, it is deemed necessary to go beyond in identifying the proactive role of estradiol on hypothalamic structures, as well as on the role of  $\beta$  receptors that predominate in females and their postpartum permanence.

## ACKNOWLEDGMENTS

The present study could have not been possible without support provided by the Education Ministry to the academic staff of Applying Molecular Biology to animal reproduction studies. The authors also wish to thank MSc Fausto Sánchez for his help on carrying out qPCR (Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco) and also to the Unidad de Microarreglos of the Instituto de Fisiología Celular (UNAM) for microarrays analysis.

*End of english version*

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

En conclusión, se observó que el hipotálamo de la rata de 4 h de nacida presenta diferencias sexuales importantes en cuanto a la expresión de genes que participan en la apoptosis, el ciclo celular y la diferenciación celular. Los resultados además sugieren que el establecimiento organizacional del cerebro de la hembra es un proceso activo, dado el número de genes expresados a la alta en la hembra control y el efecto que tiene el Tx en el aumento de los niveles de expresión de genes y que estos aumentos involucren un cambio activo que feminiza al macho. Cabe mencionar que se ha propuesto que el cerebro es bipotencial y que depende del tipo de estímulo para desarrollar patrones de las primeras cuatro horas del nacimiento, las ratas tienen un hipotálamo más sensible a los cambios hormonales, especialmente en los machos dado que la inhibición de la acción del estradiol por la aplicación de Tx, les ocasionó la feminización hipotalámica. Por el contrario el hipotálamo de la hembra, no modificó de forma sustancial su expresión génica cuando se le aplicó una fuente de estradiol como es el PT. En el caso de las hembras, se ha establecido que la ausencia o concentraciones bajas de estradiol son necesarias para feminizar al hipotálamo de ratas, por lo que los requerimientos de estrógenos en el macho con respecto a la hembra son más de carácter cuantitativo que cualitativo, además es conveniente ir más allá en identificar la acción proactiva del estradiol sobre las estructuras hipotalámicas, así como el papel de los receptores  $\beta$  predominante en las hembras, y su permanencia postparto.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias a los recursos proporcionados por el Ministerio de Educación Pública para el cuerpo académico de "Aplicación de la biología molecular en el estudio de la reproducción animal". Los autores también desean agradecer al MSc. Fausto Sánchez por

su ayuda en la realización de la q-PCR (Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco) y a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para el análisis de los microarreglos.

## LITERATURA CITADA

1. MacLuski N, Naftolin F. Differentiation of the central nervous system. *Science* 1981;211:1294-1302.
2. Gorski R. Sexual dimorphism of the brain. *J Anim Sci* 1985;61:1001-1004.
3. Simerly R. Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Ann Rev Neurosci* 2002;25:507-536.
4. Gorski R. Evidence for morphological sex differences within the medial preoptic area for the rat brain. *Brain Res* 1978;148:333-346.
5. Raisman G, Field P. Sexual dimorphism in the neuropil area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res* 1973;54:1-29.
6. Greenough W, Carter C, Steerman C, DeVoogd T. Sex differences in dendritic patterns in hamster preoptic area. *Brain Res* 1977;126:63-72.
7. Lephart E, Simpson E, Ojeda S. Brain aromatase enzyme activity during prenatal development in the rat. *J Neuroendocrinol* 1992;4:29-36.
8. Rodríguez M, Vergara O, Chavarría M, Rosado A, Reyes A. Changes in hypothalamic calmodulin concentration induced by perinatal hormone manipulation in the rat. *Pharm Biochem Behav* 1998;61:1-6.
9. Phoenix C, Goy R, Young W. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissue mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 1959;65:369-382.
10. Anne T, Konkle M, Margaret M, McCarthy M. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology* 2011;152:223-235.
11. Weisz J, Gunsalus P. Estrogen levels immature rats. True spurious-ovarian or adrenal. *Endocrinology* 1973;93:57-65.
12. Babichev V, Shishkina I, Peryshkova T. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomed Sci* 1990;1:189-192.
13. Nuñez E, Sayu L, Engelmann F, Benassayg C, Crepy O, Jayle M. Origine embryonnaire de la protéine sérique fixant l'estradiol chez la ratte impubère. *Acad Sci Paris* 1971;273:242-245.
14. Dörner G, Hinnz G. Homosexuality of neonatally castrated male rats following androgen substitution in adulthood. *Ger Med Mon* 1967;12:281-283.
15. Barraclough A. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In: *Neuroendocrinology*. Martini L, Ganong WF, editors. New York and London Academic Press; 1967:61-99.

16. Dörner G, Staudt J. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology* 1968;3:136-140.
17. Döhler K, Srivastava S, Shryne J, Jarzab B, Sipos A, Gorski R. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology* 1984;38:297-301.
18. Döhler K, Hines M, Coquelin A, Davis F, Shryne J, Sickmöler P, Jarzab B, Gorski R. Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology* 1985;42:443-448.
19. Tobet S. Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation. *Eur J Neurosci* 2002;16:373-376.
20. Herrera G, Vergara O, Rosado-García A, Rosales T. Diferenciación sexual en el sistema nervioso central. *Vet Méx* 2005;36:339-360.
21. Rodríguez M, Reyes A, Chavarria M, Vergara M, Canchola E, Rosado A. Asymmetric calmodulin distribution in the hypothalamus role of sexual differentiation in the rat. *Pharm Bioch Beh* 2001;72:1-7.
22. Vangala V, Naftolin R, Ryan K. Aromatization in the central nervous system of rabbits: effects of castration and hormone treatment. *Endocrinology* 1973;92:589-596.
23. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
24. Ruey-Hwa C, Ming-Cheng C, Yi-Hsien S, Yuh-Tyng T, Min-Liang K. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 1999;274:23013-23019.
25. Hofmann K, Tomiuk S, Wolff G, Stoffel W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Nat Acad Sci* 2000;97:5895-5900.
26. Sarkar D, Zao-Zhong S, Lebedeva V, Sauane M, Gopalkrishnan V, Valerie K, Dent P, Fisher B. mda-7 (IL-24) mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Nat Acad Sci* 2002;99:10054-10059.
27. Davis E, Popper P, Gorski R. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res* 1996;734:10-18.
28. Yoshida M, Yuri K, Kizaki Z, Sawada T, Kawata M. The distributions of apoptotic cells in the medial preoptic areas of male and female neonatal rats. *Neurosci Res* 2000;36:1-7.
29. Toren-Allerand C. On the sexual differentiation of the central nervous system morphogenetic consequences of the steroidal exposure and possible role of  $\alpha$ -protein. *Prog Brain Res* 1984;61:63-97.
30. McEwen B. Steroid hormones: effect on brain development and function. *Horm Res* 1992;3:(Suppl)1-10.
31. Shughrue P, Scrimo P, Merchenthaler I. Evidence for the colocalization of estrogen receptor  $\alpha$  mRNA and estrogen receptor  $\alpha$  immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology* 1998;139:5267-5270.
32. Nielsen J, Mor G, Naftolin F. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J Neurobiol* 2000;43:64-78.
33. Murakami S, Ari Y. Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neurosci Letters* 1989;102:185-190.
34. Wilson CA, Davies DC. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 2007;133:331-359.
35. Giannakopoulou M, Bozas E, Philippidis H. Protooncogen c-fos involvement in the molecular mechanism of rat brain sexual differentiation. *Neuroendocrinology* 2001;73:387-396.
36. Beach F. *Hormones and Behavior*. New York: Hoeber 1948.
37. McCarthy M. Estradiol and the Developing Brain. *Physiol Rev* 2008;88:91-134.
38. Lauber M, Saraasin A, Lichtensteiger. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (Cyp 19) mRNA expression in developing and adult rat brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997;359-364.
39. Amateau S, Alt J, Stamps C, McCarthy M. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology* 2004;145:2906-2917.
40. Schwarz J, McCarthy M. Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109:300-306.
41. Lenz K, McCarthy M. Organized for sex-steroid hormones and the developing hypothalamus. *Eur J Neurosci* 2010;32:2096-2104.
42. Amateau SK, McCarthy MM. Induction of PGE<sub>2</sub> by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nature Neurosci* 2004;7:643-650.
43. Romeo RD. Puberty: a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. *J Neuroendocrinol* 2003;15:1185-1192.
44. Zhang L, Chang Y, Barker J, Hu Q, Maric D, Li B, Rubinow D. Testosterone and estrogen affect neuronal differentiation but not proliferation in early embryonic cortex of the rat: the possible roles of androgen and estrogen receptors. *Neurosci Lett* 2000;281:57-60.
45. Connor J, Weiser C, Li S, Hallenbeck M, Shenolikar S. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Assembles a Novel Signaling Complex Containing Protein Phosphatase 1 and Inhibitor 1. *Mol Cell Biol* 2001;21:6841-6850.
46. Gerling N, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J. The tyrosine inhibitor orthovanadate mimics NGF induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int* 2004;44:505-520.
47. Díaz-Horta O, Kamagate A, Herchuelz A, Van Eylen F. NA/CA exchanger over expression induces endoplasmic reticulum-related apoptosis and caspase-12 activation in insulin releasing BRIN-BD11 cells. *Diabetes* 2002;51:1815-1824.
48. Trayner I, Farzaneh F, Williams G. Functional expression cloning reveals proapoptotic role for protein phosphatase 4. *Cell Death Differ* 2003;10:1016-1024.