



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL
Identificación de los marcadores de muerte por apoptosis mediante
Inmunohistoquímica y la prueba de TÚNEL en el periodo crítico de la
diferenciación sexual hipotalámica de ratas

José Elián Morales Collado
PRESTADOR DE SERVICIO SOCIAL
MATRÍCULA: 2202036568

LUGAR DE REALIZACIÓN: Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco /
Hospital de Especialidades- Unidad de Investigación Médica en Bioquímica-
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS
FECHA DE INICIO Y TÉRMINO: 18 de Enero 2023- 18 Julio 2024.

Asesor Externo

Dra. Clara Ortega Camarillo

Cédula: 1815406

Asesor Interno

Dr. Ricardo Chávez García

No. Eco. 900069

Introducción

La diabetes gestacional (DMG) es una alteración metabólica caracterizada por hiperglucemia materna, que puede generar complicaciones tanto para la madre como para el feto. Entre sus consecuencias se encuentran un mayor riesgo de preeclampsia, hipertensión inducida por el embarazo y partos por cesárea (Landon et al., 2009). Además, la exposición intrauterina a la hiperglucemia ha sido identificada como un factor de riesgo para la obesidad infantil y alteraciones metabólicas a largo plazo (Dabelea, 2007; Damm, 2009). Se ha reportado que la DMG podría influir en ciertos dimorfismos sexuales fetales, particularmente en los niveles de leptina y adiponectina en el cordón umbilical, aunque el impacto de esta condición en la diferenciación sexual aún no está completamente definido (Basu et al., 2009; Yang et al., 2020). El dimorfismo sexual es una característica presente en muchas especies de mamíferos y se refiere a las diferencias morfológicas entre machos y hembras, que se establecen en etapas tempranas del desarrollo. Estas discordancias surgen a partir de la diferenciación del hipotálamo en periodos críticos específicos, que incluyen la fertilización, el desarrollo gonadal y la diferenciación cerebral. Durante estos periodos, los cambios morfológicos son inducidos por eventos fisiológicos complejos que coordinan el desarrollo celular y aseguran que el comportamiento del organismo esté alineado con su fenotipo y genotipo gonadal, promoviendo el éxito reproductivo en la adultez (Wilson & Davies, 2007; McCarthy, de Vries & Forger, 2017; Mazzei, 2023). A nivel cerebral, se han identificado diferencias estructurales en regiones clave como el núcleo sexualmente dimórfico (SDN) y el núcleo periventricular anteroventral (AVPV), que desempeñan un papel crucial en la regulación hormonal y reproductiva (Herbison, 2008; Gregor, 2011). Las hormonas gonadales tienen un papel fundamental en la regulación de comportamientos diferenciados entre sexos, promoviendo la masculinización a través de la formación de circuitos neuronales específicos y la desfeminización mediante la eliminación de aquellos circuitos que responden a hormonas ováricas (Arnold et al., 2004; Gegenhuber, 2020). La testosterona secretada por los testículos durante el período perinatal es el principal factor de masculinización cerebral, ya que se convierte localmente en estradiol a través de la acción de aromatasas en regiones específicas. Este estradiol interactúa con receptores de estrógenos y

andrógenos, regulando la transcripción génica y determinando diferencias funcionales en el cerebro adulto (Negri, et al., 2008; DeVries & Simerly, 2002; O'Malley & Tsai, 1992). Además, los efectos organizativos de las hormonas gonadales en el desarrollo prenatal y postnatal tienen consecuencias irreversibles en la adultez, influyendo en la reactividad al estrés y en la susceptibilidad diferencial al estrés según el sexo (Lagunas et al., 2022). Dado que la DMG puede alterar la regulación hormonal fetal, es relevante investigar si esta condición influye en el desarrollo de dimorfismos sexuales. Comprender esta posible relación podría proporcionar información clave sobre los efectos metabólicos y endocrinos de la diabetes gestacional en la adultez.

Objetivo General

Determinar el grado de apoptosis mediante la prueba de TÚNEL en el tejido hipotalámico durante el periodo crítico de la diferenciación sexual de ratas.

Objetivos Particulares

- Realizar el seguimiento del ciclo estral de las hembras hasta la gestación.
- Evaluar el efecto de la administración de hormonas sintéticas (tamoxifeno y propionato de testosterona) en el tejido hipotalámico de crías recién nacidas.
- Identificar la presencia de apoptosis en las regiones hipotalámicas relacionadas con el proceso de diferenciación sexual.

Metas

El estudiante se desarrollará en el ámbito de la investigación básica, aprendiendo técnicas tanto de histología, TUNEL y manejo de animales de laboratorio. Probablemente con la participación de sus resultados en un congreso en la modalidad de cartel. Además de despertar su interés para realizar estudios de posgrado cuando logre titularse.

Material y Métodos

El material biológico de estudio se obtuvo del Bioterio del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Se utilizaron 10 ratas

hembra y 3 machos de la cepa Sprague Daley de edad reproductiva, así como a las respectivas crías que se alojaron bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo de 12:12 a una temperatura ambiente de 21° C, con una sanitización programada (2 días por semana) y se administró agua y alimento Lab Diet 5010 “*ad libitum*”.

Manejo y selección de las madres. A las ratas hembra primíparas, se les evaluará la capacidad reproductiva, mediante el análisis del ciclo estral por citología vaginal diaria, durante al menos tres ciclos reproductivos. Las hembras que se encuentren en estro se alojarán con un macho con el fin de permitir el apareamiento. A la mañana siguiente se verificará la presencia de espermatozoides mediante citología vaginal, a partir de este momento se inició la cuenta de la gestación, con una duración aproximada de 502 ± 3 horas.

Manejo y tratamiento de las crías. Con el propósito de estudiar a las crías a tiempos muy cercanos al nacimiento, se llevará un control y vigilancia constante de las madres. La hora del parto se registrará como hora cero del nacimiento de cada una de las crías y realizará el sexado de toda la camada (Krinke, 2000). Una hora después del nacimiento, se administrará el tratamiento a las ratas, vía subcutánea en la zona dorsal se cubrirá el sitio de inyección con vaselina. Tanto las crías de las madres con hiperglucemia y de las control, se asignaran a uno de 3 grupos: : Grupo Tamoxifen (TM): Machos tratados con 200 µg de tamoxifeno en 20 µl de aceite de sésamo; grupo Propionato de Testosterona (PT): Hembras tratadas con 30 µg de propionato de testosterona en 20 µl de aceite de sésamo (HP); grupo control acetite (AS): Machos y hembras tratadas con 20 µl de aceite de sésamo (vehículo); grupo control (SS): Machos y Hembras tratadas con 20 µl de solución salina (Arai & Gorski, 1968; Döler *et al.*, 1986).

Obtención de muestras (Consideraciones bioéticas). Las muestras de hipotálamo se obtendrán a las 1, 3, 6 horas y 90 días de edad, previa anestesia con zoletil y xilacina (DOSIS) de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995.

Extracción de Hipotálamo. Se realizará mediante una incisión en la piel del cráneo a nivel de la fosa del foramen magnum, después con unas pinzas hemostáticas, se fracturará el cráneo desde la región occipital hacia la región frontal, el cerebro será

disecado y colocado sobre su superficie dorsal, se aislará a 4 °C (Vangala, 1973). El hipotálamo se fijará con formalina 4%.

Inmunofluorescencia. Una vez que se obtuvieron los cortes histológicos se separaron los tejidos para realizar la prueba inmunohistoquímica. Dichos cortes fueron fijados en portaobjetos con Poli-L-Lisina. Una vez que se hidrataron los tejidos se recuperó el antígeno mediante una inmersión de los tejidos en un coplin con una solución de Antigen Retrieval CitraPlus (10x) manteniéndolos en baño María durante 30 minutos, una vez que se alcanzó este tiempo, se dejó enfriar la muestra durante 20 minutos, posteriormente se realizó un lavado con PBS-Tween; al momento de secar la muestra se seccionó con un marcador de cera por cada corte presente en la laminilla, seguido de esto se agregó el bloqueador de proteínas Power Block Universal Blocking Reagent (10x) a modo de permitir el bloqueo de los epítomos no deseables y se dejó reposar durante 20 minutos en una cámara húmeda, al culminar este tiempo se adicionó el anticuerpo primario en una dilución de 1:50 a cada tejido durante 12 horas en incubación a 4° C. Una vez que transcurrieron las 12 horas, los tejidos se realizó un lavado en PBS-Tween y se aplicaron 25 µl del anticuerpo secundario dejándolo incubar durante 4 horas, seguido de esto se realizaron 3 lavados en PBS-Tween en lapsos de 5 minutos, posteriormente se adicionó DRAQ-7 durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados más en PBS-Tween, una vez realizado esto se aplicó el medio de montaje a las laminillas que consistió de una mezcla de 1:1 de PBS: Glicerol, una vez hecho esto se cubrieron las laminillas y se sellaron con esmalte para posteriormente ser revisadas en un microscopio confocal ZEISS Axiovert 100 M con el software LSM Browser-ZEN2009 a una longitud de onda de excitación de 488 nm y la emisión a 543 nm. Las secciones se examinaron y fotografiaron digitalmente con un microscopio de fluorescencia. Se compararon los patrones de distribución de las proteínas de interés (Bax, Bcl-2) de las células inmunorreactivas de las diferentes poblaciones.

TUNEL. Para realizar la prueba de TUNEL se considerarán las recomendación del *KIT ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S700*. Los tejidos serán desparafinados y rehidratados, para realizar la recuperación de antígeno. como en la inmunohistoquímica, Se lavarán los tejidos cerebrales con PBS- Tritón,

posteriormente se incubarán los tejidos con proteinasa K durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con PBS Tritón, se adicionarán 75 µl de buffer de equilibrio durante 10 segundos por cada tejido, se utilizarán 35 µl enzima TdT mezclándola con 75 µl de buffer de reacción para incubar los tejidos a 37 °C en una cámara de incubación durante 1 hora, al término de esto se realizará un lavado con PBS Tritón y se aplicará la anti-dioxigenina en una proporción de 1: 10 en PBS Tritón dejándolo incubar toda la noche. Una vez finalizada la incubación se lavará con PBS Tritón, se aplicó DRAQ 7 como marcador de núcleos durante 20 minutos, se realizará un último lavado y se sellará con PBS/glicerol. Las muestras serán analizadas de la misma manera que las inmunofluorescencias.

Actividades realizadas

- Manejo de Rata de laboratorio (*Rattus norvegicus albinus*) cepa Wistar

Se puso en práctica la toma de muestras, sutura, administración de fármacos, manejo y enriquecimiento ambiental, así como también la eutanasia y extracción de tejidos. Se realizó el análisis de citología vaginal para determinar la etapa del ciclo estral y sincronizar a las hembras para reproducción.

APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS. Se aplicaron tratamientos con hormonas sintéticas a los recién nacidos de madres Normoglucémicas e Hiperglucémicas, a las 1, 3 y 6 horas post nacimiento.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS. Las muestras obtenidas postmortem de Hígado, Corazón, Cerebro, Gónadas y Riñón se licuaron para realizar la técnica de Western Blot y determinar la presencia de proteínas por peso molecular.

TÉCNICA DE TUNEL. Se realizó la técnica en tejido hipotalámico para identificar las células positivas a apoptosis y localizar proteínas específicas y determinar la relación existente entre la supervivencia y la muerte celular.

Metas alcanzadas

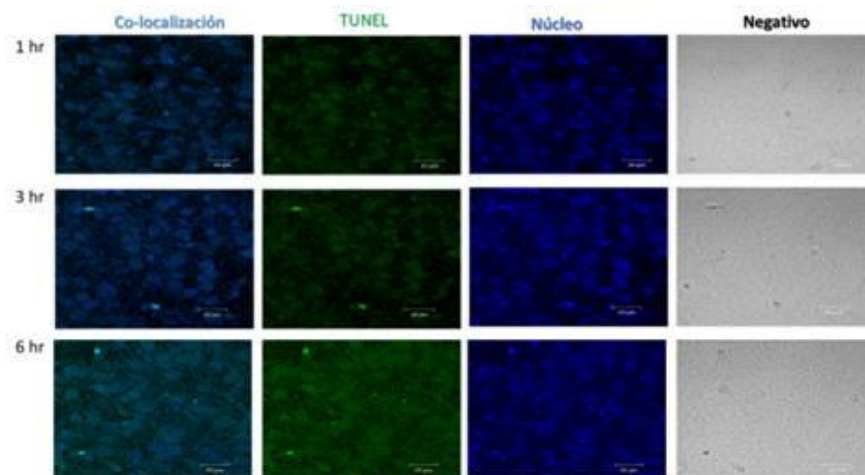
Se acreditó el curso de manejo de animales de laboratorio impartido por el Bioterio del Centro Médico Nacional siglo XXI. De igual manera se realizó la redacción de un

ensayo sobre la presencia de receptores alfa y beta estrogénicos con la administración de fitoestrógenos presentes en el aceite de soya durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata hembra, que fue presentado en el 1er congreso de reproducción animal en el colegio de postgraduados 2024 (Anexo 1).

Resultados

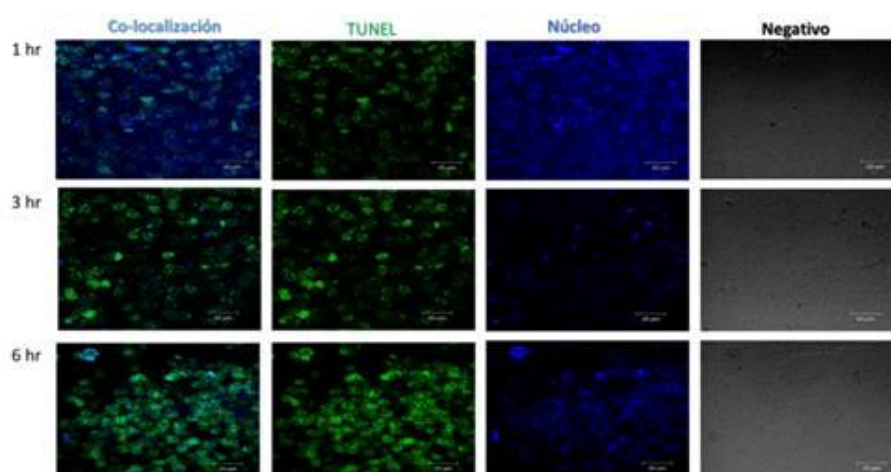
- Resultados. TÚNEL. Controles Hembras PT

Figura 1. Control hembras PT (Propionato de Testosterona)



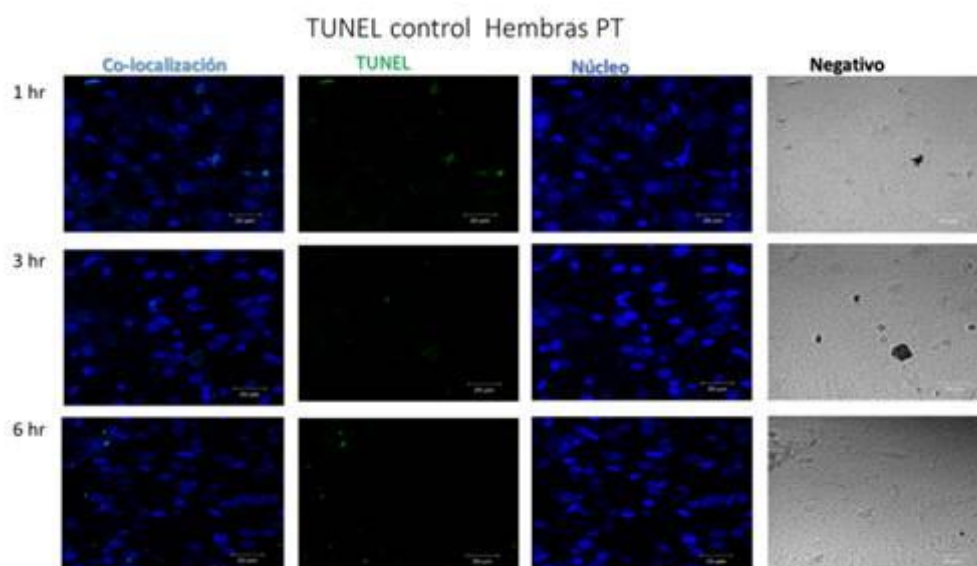
Prueba TUNEL en tejido hipotalámico analizadas a las 1, 3 y 6 horas de nacimiento. No se observa una señal positiva para apoptosis. Los núcleos celulares se visualizan claramente teñidos en azul con DRAQ 7. La co-localización muestra únicamente señal nuclear, sin presencia de fluorescencia verde indicativa de fragmentación de ADN. Las imágenes correspondientes al fondo claro no presentan señal de fluorescencia.

Figura 2. Tx con DNAasa Hembra PT (Propionato de testosterona)



Muestras de tejido hipotalámico analizadas a las 1, 3 y 6 horas mediante microscopía confocal. Se observa una señal positiva para apoptosis en la prueba TUNEL. En la primera hora se detecta una señal de TÚNEL tenue con núcleos celulares visibles en azul con DRAQ 7. A las 3 y 6 horas se hace visible el aumento de tinción en TÚNEL y disminuye la tinción azul con DRA Q7 conforme aumenta el tiempo. La co-localización de las señales permite observar que la fragmentación del ADN ocurre en células nucleadas. El fondo claro no muestra señal de fluorescencia.

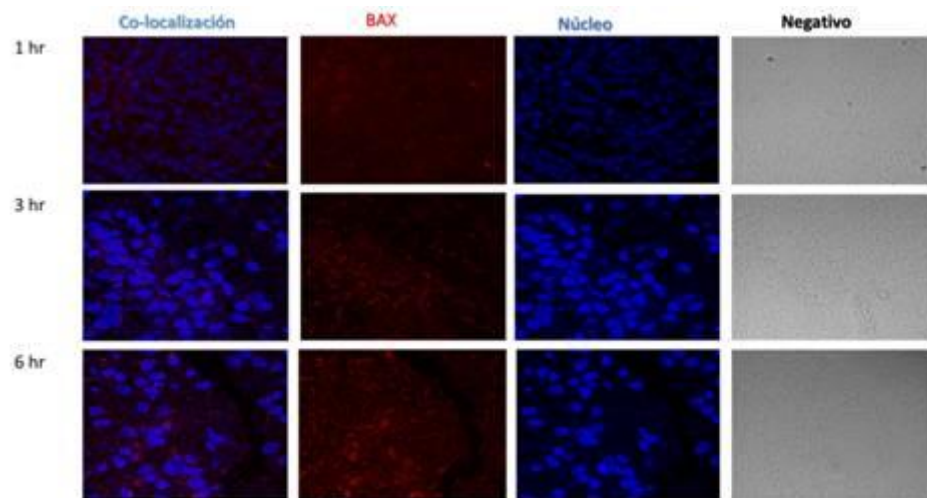
Figura 3. Control hembras PT (Propionato de Testosterona)



Al análisis de las laminillas de tejido hipotalámico en el microscopio confocal a las 1, 3 y 6 horas, se observa una señalización negativa a apoptosis en la prueba TUNEL. Los núcleos celulares son visibles y claros en color azul con DRAQ7. La co-localización muestra únicamente los núcleos sin señal de apoptosis detectable. El fondo claro no muestra señal de fluorescencia.

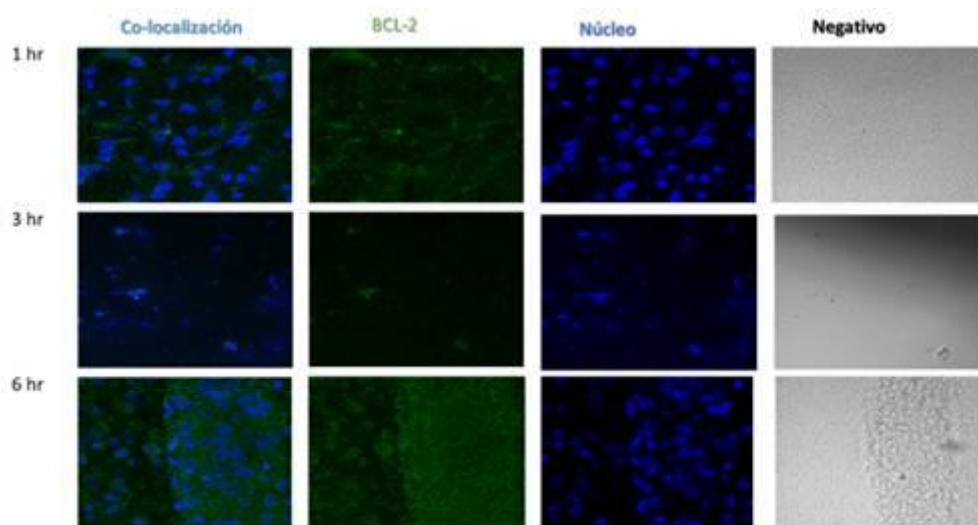
Resultados. TÚNEL. Presencia de BAX vs Bcl-2 Hembras PT

Figura 4. Presencia de BAX en hembras PT (Propionato de Testosterona)



Al análisis de las laminillas de tejido hipotalámico en el microscopio confocal a las 1, 3 y 6 horas se observa una presencia positiva para BAX en las zonas con color azul correspondientes a los núcleos celulares. Los núcleos celulares se visualizan claramente teñidos en azul con DRAQ7. A la 1 hora se aprecia una débil emisión roja en algunos núcleos. A las 3 horas, la fluorescencia aumenta y se observa una distribución más evidente incluso a nivel citoplasmático. A las 6 horas, se identifica una intensa señal tanto en núcleo como en citoplasma. La co-localización creciente a las 3 y 6 horas sugiere una activación progresiva de la vía apoptótica, con una mayor presencia y translocación de BAX hacia las zonas donde se localizan los núcleos celulares dañados. El fondo claro no muestra señal de fluorescencia.

Figura 5. Presencia de Bcl-2 en hembras PT (Propionato de Testosterona)



Al análisis de las laminillas de tejido hipotalámico en el microscopio confocal a las 1, 3 y 6 horas se tiene la presencia DE Bcl-2 correspondiente a las zonas color verde. Los núcleos celulares se visualizan claramente teñidos en azul con DRAQ 7. A la 1 hora se observa una expresión moderada de Bcl-2. A las 3 horas la señal de Bcl-2 disminuye considerablemente, sin embargo, a las 6 horas, la señal verde vuelve a intensificarse. La co-localización a las 6 horas muestra una mayor relación entre la presencia de Bcl-2 con la tinción de núcleos intactos. El fondo claro no muestra señal de fluorescencia.

Recomendaciones y Conclusión

En las imágenes del control, es decir, aquellas muestras donde no se esperaba señal, no se observó fluorescencia ni fondo, lo que indica que las técnicas utilizadas fueron específicas y confiables. Los resultados de este estudio muestran que el tratamiento con propionato de testosterona (PT) provoca cambios importantes en el hipotálamo de hembras, relacionados con la muerte celular programada o apoptosis. Usando la prueba TÚNEL y la detección de dos proteínas clave (BAX y Bcl-2). Se utilizó un tratamiento con DNAsas para inducir roturas en el ADN y poder contar con una comparativa entre tejidos dañados y no dañados. Se realizó este tratamiento en 3 tiempos: 1 hora, 3 horas y 6 horas para poder observar si el daño incrementaba en función del tiempo. La fragmentación del ADN fue visible desde la primera hora, y se vio un aumento notable a las 3 y 6 horas. El DRAQ7 es un colorante fluorescente de ADN que se utiliza en combinación con el TUNEL para mejorar la detección de apoptosis. Una de las ventajas que tiene utilizar este colorante es la capacidad de excluir células vivas, ya que solo es permeable en aquellas células que han sufrido un deterioro notable en sus membranas a causa de apoptosis. Los núcleos celulares que son teñidos con DRAQ 7 se aprecian de un color azul. Las proteínas involucradas en el proceso apoptótico son conocidas como BAX y Bcl-2. Bax es proapoptótica mientras que Bcl-2 es antiapoptótica, esto permite que se regulen una a la otra a nivel mitocondrial mediando la respuesta apoptótica. BAX mostró una mayor presencia a las 3 y 6 horas, no solo en el núcleo de las células, sino también en el citoplasma. Esto sugiere que esta proteína juega un papel importante en la activación del proceso de muerte celular en respuesta al tratamiento. En cambio, Bcl-2, tuvo una expresión más variable: fue moderada a la 1 hora, bajó a las 3 horas y volvió a aumentar a las 6 horas. Esta variación podría indicar que las células intentan defenderse del daño y evitar la muerte celular en las fases más tardías. La relación entre la fragmentación del ADN y la presencia de BAX refuerza la idea de que esta proteína es clave en la respuesta al daño, mientras que los cambios en Bcl-2 podrían representar un intento del organismo por mantener el equilibrio ante el daño provocado por la hormona.

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de participación en el 1er congreso de reproducción animal COLPOS 2024.



Bibliografía

- 1) AE Herbison, Retroalimentación positiva de estrógeno a las neuronas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el roedor: el caso del área periventricular rostral del tercer ventrículo (RP3V), Brain Res. Rev. 57 (2008) 277–287.
- 2) Arnold AP. Rethinking sex determination of non-gonadal tissues. Current topics in developmental biology/Current Topics in Developmental Biology [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2024 Apr 19];289–315. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0070215319300031>
- 3) Arnold, AP (2017). Una teoría general de la diferenciación sexual. Diario de Investigación en neurociencia, 95,291–300.
- 4) Arnold, J. Xu, W. Grisham, X. Chen, Y.-H. Kim, Y. Itoh, Minireview: cromosomas sexuales y diferenciación sexual del cerebro, Endocrinology 145 (2004) 1057 -- 1062.866-72.
- 5) Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: Critical control points. Cell, 116, 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7).
- 6) Basu, A., Dalla Man, C., Basu, R., Toffolo, G., Cobelli, C. & Rizza, R. A. 2009. Effects of type 2 diabetes on insulin secretion, insulin action, glucose

- effectiveness, and postprandial glucose metabolism. *Diabetes Care*: 32: Dabelea D. (2007). The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes care*, 30 Suppl 2, S169–S174. <https://doi.org/10.2337/dc07-s211>
- 7) Damm P. (2009). Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 104 Suppl 1, S25–S26. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2008.11.025>
 - 8) De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger CJ, Swain A, Lovell-Badge R, Burgoyne PS, Arnold AP. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci*. 2002 Oct 15;22(20):9005-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-20-09005.2002. PMID: 12388607; PMCID: PMC6757680.
 - 9) Eggers, S. y Sinclair, A. (2012). Determinación del sexo de los mamíferos: ideas de humanos y ratones. *Investigación cromosómica*, 20, 215–238.
 - 10) Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
 - 11) Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S., & Liang, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
 - 12) Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>.
 - 13) Gegenhuber B, Tollkuhn J. Epigenetic Mechanisms of Brain Sexual Differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* a039099–9. Available from: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/14/11/a039099.long>
 - 14) Gregor Majdic, & Tobet, S. (2011). Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(2), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.02.009>
 - 15) Grinstein G., Muzumdar R., Aponte L., Vuguin P., Saenger P., DiMartino-Nardi J. 2003. Presentation and 5-year follow-up of type 2 diabetes mellitus in African-American and Caribbean-Hispanic adolescents. *Hormone Research*: 60: 121–126
 - 16) Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23, 1625–1637. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>.
 - 17) Guicciardi, ME y Gores, GJ (2009). Vida y muerte por receptores de muerte. *La FASEB Diario*, 23, 1625–1637. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>.
 - 18) Herold, MJ, McPherson, KG y Reichardt, HM (2006). Glucocorticoides en la apoplejía de células T. apoptosis y función. *Ciencias de la vida celulares y moleculares*, 63, 60–72. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5390-y>.
 - 19) Kashyap D, Vivek Kumar Garg, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in protein chemistry and structural biology* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Apr 15];73–120. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1876162321000134?via%3Dihub>
 - 20) Kashyap, D., Tuli, H. S., Sak, K., et al. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression. *Current Pharmacology Reports*, 5, 79–86.
 - 21) Kammel LG, Correa SM. Selective sexual differentiation of neurone populations may contribute to sex-specific outputs of the ventromedial

- nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2020 Jan;32(1):e12801. doi: 10.1111/jne.12801. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31605642; PMCID: PMC6982598.
- 22) Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25, 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
 - 23) Kawamoto Y, Nakajima YI, Kuranaga E. Apoptosis in Cellular Society: Communication between Apoptotic Cells and Their Neighbors. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 20;17(12):2144. doi: 10.3390/ijms17122144. PMID: 27999411; PMCID: PMC5187944.
 - 24) Lagunas, N., Fernández-García, J. M., Blanco, N., Ballesta, A., Carrillo, B., Arévalo, M.-A., Collado, P., Pinos, H., & Grassi, D. (2022). Organizational Effects of Estrogens and Androgens on Estrogen and Androgen Receptor Expression in Pituitary and Adrenal Glands in Adult Male and Female Rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16, 902218. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.902218>
 - 25) Landon, M. B., Spong, C. Y., Thom, E., Carpenter, M. W., Ramin, S. M., Casey, B., Wapner, R. J., Varner, M. W., Rouse, D. J., Thorp, J. M., Jr, Sciscione, A., Catalano, P., Harper, M., Saade, G., Lain, K. Y., Sorokin, Y., Peaceman, A. M., Tolosa, J. E., Anderson, G. B., & Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network (2009). A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *The New England journal of medicine*, 361(14), 1339–1348. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902430>
 - 26) Mazzei M. Sexual dimorphism. Salem Press Encyclopedia of Science [Internet]. 2023 [cited 2024 Apr 10]; Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=119214374&lang=es&site=eds-live&scope=site>
 - 27) McCarthy, MM, de Vries, GJ y Forger, NG (2017). Diferenciación sexualción del cerebro: una nueva mirada al modo, los mecanismos y el significado. En DW Pfaff y M. Joels (Eds.), *Hormonas, cerebro y comportamiento* (págs. 3–32). Cambridge, MA: Prensa académica
 - 28) McCarthy MM. Sexual differentiation of the brain in man and animals: of relevance to Klinefelter syndrome? *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013 Feb 15;163C(1):3-15. doi: 10.1002/ajmg.c.31351. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23335108; PMCID: PMC5320421.
 - 29) McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656–a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
 - 30) Negri-Cesi, P., Colciago, A., Pravettoni, A., Casati, L., Conti, L., & Fabio Celotti. (2008). Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: Hormonal and environmental influences. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology/the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3-5), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.003>
 - 31) Newton K, Strasser A, Nobuhiko Kayagaki, Dixit VM. Cell death. *Cell* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2024 Apr 14];187(2):235–56. Available from: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(23\)01332-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867423013326%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(23)01332-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867423013326%3Fshowall%3Dtrue)
 - 32) O'Malley, BW y Tsai, MJ (1992). Vías moleculares de los receptores de esteroides. *acción tor.Biología de la Reproducción*, 46,163–167.

- 33) Ordyan, N. E., & Pivina, S. G. (2005). Effects of Prenatal Stress on the Activity of an Enzyme Involved in Neurosteroid Synthesis During the "Critical Period" of Sexual Differentiation of the Brain in Male Rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 35(9), 931–935. <https://doi.org/10.1007/s11055-005-0148-4>
- 34) Park, K.-J., Lee, C.-H., Kim, A., et al. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature*, 369, 321–333.
- 35) Sakahira H, Enari M y Nagata S. Escisión del inhibidor de CAD en la activación de CAD y degradación del ADN durante la apoptosis. *Naturaleza* 1998;391:96-9
- 36) Schile, AJ; García-Fernández, M.; Steller, H. Regulación de la apoptosis por la actividad de ubiquitina-ligasa XIAP. *Desarrollo de genes*. 2008;22, 2256–2266.
- 37) Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>
- 38) Shields, W., Thompson, K. E., Grice, G. A., Harrison, S. A. & Coyle, W. J. 2009. The effect of metformin and standard therapy versus standard therapy alone in nondiabetic patients with insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A pilot trial. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*: 2: 157-163.
- 39) Slee EA, Adrian C y Martin SJ. Las caspasas-3, -6 y -7 ejecutoras desempeñan funciones distintas y no redundantes durante la fase de demolición de la apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:7320-6
- 40) Sominsky, L., Jasoni, C. L., Twigg, H. R., & Spencer, S. J. (2018). Hormonal and nutritional regulation of postnatal hypothalamic development. *Journal of Endocrinology/Journal of Endocrinology*, 237(2), R47–R64. <https://doi.org/10.1530/joe-17-0722>
- 41) Stringer JM, Alesi LR, Winship AL, Hutt KJ. Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life. *Human reproduction update* [Internet]. 2023 Feb 28 [cited 2024 Apr 17];29(4):434–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36857094/>
- 42) Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 43, 95–118
- 43) Wei, Y., Fan, T., and Yu, M. 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 40: 278 – 289.
- 44) Williams, AB y Schumacher, B. (2016). p53 en el proceso de reparación de daños en el ADN. *Frío Perspectivas de Spring Harbor en Medicina*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>.