



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 DE TERMINACIÓN DE SERVICIO SOCIAL
**PAPEL DE LAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX Y P53 DURANTE EL PERIODO CRÍTICO
EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA DE LA RATA**

PRESTADORA DE SERVICIO SOCIAL
XIMENA RATIA MARTÍNEZ
MATRÍCULA: 2182033078

ASESORES
INTERNO:

DRA. MARCELA VERGARA ONOFRE
NÚM. ECONÓMICO: 16356

EXTERNO:

DR. RICARDO CHÁVEZ GARCÍA
NÚM. ECONÓMICO: 900069

LUGAR DE REALIZACIÓN
UAM Xochimilco/Hospital Infantil de México "Federico Gómez"
PERIODO DE REALIZACIÓN
Del 30 de octubre 2023 al 30 de abril 2024

1. Introducción

La diferenciación sexual, hace referencia una serie de eventos que incluyen: la determinación genética del sexo mediante el gen SRY cuando existe un cromosoma Y (factor cromosomal), la activación de la cascada hormonal que tiene influencia sobre la gónadas (factor hormonal) y por último, el cerebro (hipotálamo) (Wright *et al.*, 2010). En la rata, se reconocen dos períodos críticos; el primero durante la gestación y el segundo durante el periodo postnatal temprano cuando la sensibilidad a hormonas gonadales es alta, ocasionando una programación cerebral determinada hacia un comportamiento característico, masculino o femenino (Wolf, 2002; Seale *et al.*, 2005). Por ejemplo, un estudio realizado por Herrera *et al.*, (2013) demostró que el hipotálamo de la rata a las 4 horas de nacida ya presenta diferencias sexuales importantes que residen en la expresión génica e involucran diversos procesos como el de apoptosis.

Además, la secreción de andrógenos, estrógenos y progesterona también impacta en el sistema nervioso de los animales mediante el proceso de dimorfismo sexual, que se define como el conjunto de diferencias bioquímicas, morfológicas y conductuales entre machos y hembras, regulado por la acción del estradiol para establecer estructuras sexualmente dimórficas en etapas tempranas del nacimiento. Dentro de estas diferencias estructurales se encuentran los circuitos neuronales sexualmente específicos que tienen influencia durante el desarrollo del sistema nervioso, como por ejemplo, el núcleo del área preóptica (APO), el núcleo ventromedial (NVM), el núcleo supraquiasmático (NSQ), la amígdala y la estría terminal (ST), entre otros, que están relacionados directamente al hipotálamo y a funciones endocrinas y conductuales, que impactan en los procesos reproductivos, incluyendo el comportamiento de apareamiento (Herrera *et al.*, 2005).

El desarrollo de vías neurales que rigen la activación de estos circuitos neuronales, está controlado por reguladores internos como las hormonas y algunas señales externas que se perciben por los sistemas sensoriales (Johansen *et al.*, 2004). Por ejemplo, se conoce que el estradiol (E2) también cumple un papel fundamental en el proceso de muerte neuronal por apoptosis, un mecanismo que determina la forma y tamaño del sistema nervioso central (SNC) mediante el equilibrio ideal del número de células (Herrera *et al.*, 2002; Becerra, 2009). Además, este proceso, se produce en patrones temporales, espaciales y sexo específicos en la corteza cerebral durante el periodo postnatal temprano, debido a que durante este tiempo tanto en los roedores como en el humano, el cerebro es particularmente sensible a factores externos. La apoptosis ocurre en dos etapas primordiales durante la diferenciación sexual: la primera ocurre durante la etapa embrionaria, y se describe como la fase con mayor densidad de células apoptóticas en zonas de proliferación celular, tanto ventriculares como subventriculares, eliminando a las células precursoras neuronales en cuestión de horas tras el nacimiento. La segunda, también se define por el aumento de células apoptóticas pero, esta vez, durante las primeras dos semanas del periodo postnatal. Esta fase también es conocida como “muerte celular postmitótica”, y se produce en todo el cerebro eliminando aproximadamente al 50% de las neuronas que ya han migrado, se han diferenciado y que han comenzado a tener conexiones axónicas. Este proceso, no sólo influencia la formación de los circuitos neuronales, sino que puede identificar una ventana de vulnerabilidad durante la cual la exposición a lesiones, infecciones o variaciones en los factores ambientales, tienen un mayor impacto. Es importante mencionar que este proceso también puede ser regulado por hormonas gonadales, hecho que se ha evidenciado en los núcleos hipotalámicos, donde ocurren diferentes tasas de apoptosis entre sexos y que están influenciadas por el entorno hormonal gonadal perinatal, conduciendo a dimorfismos sexuales (Mosley *et al.*, 2016; Sellinger *et al.*, 2021). Por lo tanto, durante la diferenciación sexual hipotalámica en los roedores, que ocurre desde el tercer trimestre de gestación hasta el periodo postnatal temprano, la cantidad y fenotipo neuronal de los núcleos sexualmente dimórficos están regulados por procesos del desarrollo

neurrológico, incluido el proceso de apoptosis. La exposición del cerebro de roedor hembra a hormonas gonadales es baja, mientras que el testículo fetal del macho produce niveles altos de testosterona, aromatizando al estradiol local en el cerebro del macho. Se debe dar importancia al vínculo entre la exposición a hormonas esteroideas y el proceso apoptótico, pues dependiendo de la región cerebral, existen receptores de estrógenos unidos a ligandos (ER α principalmente) que pueden unirse a elementos de respuesta nuclear con el objetivo de promover la transcripción de factores que estimulan o inhiben la apoptosis del desarrollo (Dickerson *et al.*, 2011).

Existen genes que regulan el proceso apoptótico, dentro de los cuales se encuentran: la familia de proteasas conocida como caspasas, la proteína Apaf1 que pertenece al apoptosoma y la familia de las proteínas BCL-2. Esta última, se caracteriza por tener cuatro dominios de homología estructuralmente conservados conocidos como BH1, BH2, BH3 necesarios para interactuar con otros miembros de Bcl-2 y el BH4, encargado de regular las funciones del ciclo celular. Además, se divide en dos grupos principales, de los cuales el primero está constituido por proteínas que actúan como factores de supervivencia o proteínas anti-apoptóticas (bcl-2, bcl-Xs, bcl-W, entre otros) ubicadas en la mitocondria y proteínas pro-apoptóticas (bax, bad, bak, bok, bid, bim, bik y blk) que se encuentran en el citosol. La capacidad antiapoptótica de esta familia de proteínas está dada por la presencia de un dominio BIR que se une directamente a inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP). Mientras que en el caso de las proteínas pro-apoptóticas o proteínas efectoras multidominio, se conoce que Bax se encuentra como monómero en el citosol y ante señales de daño, se somete a un cambio conformacional que conjunto con Bak, ubicado en la mitocondria, permiten la liberación de citocromo c mitocondrial y se genere el proceso de apoptosis. En este sentido, bcl-2 puede bloquear la muerte neuronal durante el desarrollo cerebral y la sobreexpresión de esta proteína puede conducir a una mayor resistencia celular a los estímulos de muerte (Herrera *et al.*, 2002; Lossi & Merighi, 2003; Jutinico *et al.*, 2015).

Otra de las proteínas relacionadas a este proceso, es p53, particularmente en la apoptosis inducida por daño al ADN. Tras su activación por la fosforilación, ocurre una translocación de la proteína p53 al núcleo por lo que, al igual que bcl-2, es considerada reguladora central de las vías de señalización de la apoptosis. Sin embargo, p53 también regula la actividad de la familia Bcl-2 a través de vías dependientes e independientes de la transcripción pues, como factor de transcripción nuclear, p53 activa la expresión de genes proapoptóticos que incluyen a bax (Lindenboim *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2023). Además de esta capacidad transcripcional, se conoce que p53 ejerce una actividad apoptótica independiente de la transcripción en el citosol y/o en las mitocondrias, es decir, se ha demostrado que la sobreexpresión de una forma mutante de p53, que carece de la mayor parte del dominio de unión al ADN y, por lo tanto, es defectuosa en la función de transactivación, puede desencadenar apoptosis (Lindenboim *et al.*, 2010). El estudio de los genes involucrados en el proceso apoptótico durante este periodo crítico, es fundamental para entender los mecanismos moleculares que median las diferencias sexuales en el sistema nervioso central de los animales.

1. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo General:

- Determinar la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y p53 en el periodo crítico de la diferenciación sexual hipotalámica de la rata mediante técnicas de biología molecular.

Objetivos específicos:

- Identificar las proteínas bcl-2, bax y p53 mediante inmunohistoquímica en el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral.
- Analizar la expresión de los genes bcl-2, bax y p53 mediante qPCR- RT.
- Conocer la participación de bcl-2, bax y p53 durante el período crítico de la diferenciación sexual hipotalámica de la rata

2. METODOLOGÍA

El material biológico de estudio se obtuvo del Bioterio del Hospital Infantil de México- Federico Gómez. Se utilizaron 10 ratas hembras y 3 machos de la cepa Wistar 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 proporcionó agua y alimento Lab Diet 5010 “ad libitum”.

Manejo y selección de las madres

En las ratas hembras con una edad por arriba de los 60 días, se evaluó la capacidad reproductiva, mediante el análisis del ciclo estral mediante citología vaginal diaria, durante al menos tres ciclos reproductivos. Las ratas que presentaron su ciclo estral con características normales, se colocaron con un macho durante 3 horas con el fin de permitir el apareamiento, una vez terminado este tiempo se verificó la presencia de espermatozoides, así como la aparición del tapón vaginal mediante citología vaginal, a partir de este momento se inició la cuenta de la gestación, con una duración aproximada de 502 ± 3 horas. Se realizó 1 pool de 6 individuos para cada grupo y tiempo para la extracción de genes mientras que para las pruebas histológicas e Inmunohistoquímicas se realizó 1 pool de 3 individuos.

Manejo y tratamiento de las crías

Con el propósito de estudiar a las crías a tiempos muy cercanos al nacimiento, se llevó un control y vigilancia constante de las madres. La hora del parto se registró como hora cero del nacimiento de cada una de las crías y realizó el sexado de toda la camada. Una hora después del nacimiento, se administró el tratamiento a las ratas, vía subcutánea en la zona dorsal cubriendo el sitio de inyección con vaselina. A las hembras control, se les administraron los siguientes tratamientos: a una proporción de la progenie masculina se les administró 200 µg de tamoxifen en 20 µl de aceite de sésamo (MT), a la otra porción de machos solo se les aplicó 20 µl de aceite de sésamo (MC), mientras que a una parte

de las hembras se les suministró 30 µg de propionato de testosterona en 20 µl de aceite de sésamo (HP) y el resto de las hembras se les aplicó 20 µl de aceite de sésamo (HC).

Sacrificio de los animales y obtención de muestras (Consideraciones bioéticas)

Las muestras de hipotálamo se obtuvieron a las 1, 3, 6 horas post-tratamiento. El sacrificio de los animales se realizó mediante la dislocación cervical, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Extracción de Hipotálamo

La extracción de los hipotálamos se realizó mediante una incisión en la piel del cráneo a nivel de la fosa del foramen magnum, después con unas pinzas hemostáticas, se fracturó el cráneo desde la región occipital hacia la región frontal, se realizó la disección del cerebro, se colocó sobre su superficie dorsal y se aisló a 4° C.

Procedimiento Histológico

Una vez realizada la extracción del tejido hipotalámico, se conservó en formaldehído al 10% durante 72 horas. Los tejidos se fijaron en parafina en moldes histológicos colocando los tejidos de manera transversal. Los tejidos fijados en parafina se cortaron a 5 mm con un microtomo LKB; una vez obtenidos los cortes se montaron en portaobjetos, agregándoles alcohol al 70% para sumergirse en baño María durante 3 a 5 minutos, fijándose en portaobjetos con gelatina al 1%. Posteriormente, estos cortes se sometieron a la tinción de Hematoxilina-eosina (H&E).

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, un 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 (p53, Bax, Bcl-2; Santa Cruz Biotechnology) de las células inmunorreactivas de las diferentes poblaciones.

Extracción ARN

Las muestras de tejido hipotalámico se trataron conforme a la metodología y especificidades del reactivo de Trizol: Se homogeniza la muestra con el reactivo, para romper células y liberar componentes celulares. Se añade cloroformo para crear fases acuosas y orgánicas. El ARN se encuentra en fase acuosa superior y el ADN y proteínas en las fases inferiores y el precipitado de ARN se lava para eliminar impurezas y se re-suspendió para diversas aplicaciones. El reactivo TRIzol mantiene la integridad del ARN gracias a la inhibición altamente eficaz de la actividad ARNasa, al tiempo que destruye las células y disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de muestras (Invitrogen™ Reactivo TRIzol™).

Gel de Agarosa

Se realizaron geles de agarosa al 1% en buffer TAE (1x) para revisar la integridad de las bandas en el 18S y 28S. Se utilizó como agente intercalante 1 µl de SYBR Green por cada 10 ml de solución TAE. Como buffer de carga se empleó el 6X Orange DNA Loading Dye. Se mantuvieron en una cámara de electroforesis durante 30 minutos a 80 Volts. Se analizarán los geles bajo una cámara UV.

Preparación de ADN complementario

El ADN complementario se sintetizó a partir de la enzima M- Mult-RT. Una vez que a las muestras se les adicionó el ARN, los dNTP's y los hexámeros aleatorios, cuyos fragmentos de 6 pares de bases y una sola hebra de ADN se podrán unir a cualquier región de ARN, éstas se llevaron a un termociclador para iniciar con un ciclo de 5 minutos a una temperatura de 70° C, posteriormente se mantuvieron en hielo durante 3 minutos y se agregó la Master Mix con la enzima RT, el buffer y la ARNasa. Seguido de esto se llevaron a un ciclo de 60 minutos a 42° C, seguido de otro ciclo de 10 minutos a 90° C y al final a un ciclo de 4° C hasta retirarlo del termociclador. Una vez que finalizó la síntesis de ADNc, se alojaron en congelación a -80° C hasta su uso para la PCR.

PCR- Transcriptasa reversa en Tiempo Real.

La RT-PCR en tiempo real se realizó mediante las especificaciones del Syber Green. Las condiciones para el termociclador fueron de la siguiente manera: fase de desnaturalización 1 ciclo de 10 minutos a 95° C, seguido de 1 ciclo de 15 segundos a 95° C para la alineación, para la elongación de 40 ciclos de 1 minuto a 54° C, seguido de 1 ciclo de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 55° C y finalizando con 1 ciclo de 30 segundos a 95° C.

Tabla 1. Primers estudiados.

GEN	Primer Forward (FW)	Primer Reverse (RW)
TP53 (protein p53)	ACATGACTGAGGTCGTGAGA (628-648)	GATTCCTTCCACCCGGATAAG (705-727)
Bax (3' bax mRNA)	TGCAGACGGCAACTTCAA (194-212)	GATCAGCTCGGGCACTTTAG (274-294)

BCL2 associated X, apoptosis regulator (Bax)mRNA	TGCAGACGGCAACTTCAA (389-407)	GATCAGCTCGGGCACTTTAG (469-489)
Beta-actin (Actb) mRNA Rattus norvegicus	CAACTGGGACGATATGGAGAAG	GTTGGCCTTAGGGTTCAGAG

Análisis Estadístico

La base de datos se analizó con el programa SPSS versión 6.1 (IBM, NY, USA). Se realizó un análisis de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) mediante el programa JMP versión 9 (Base SAS®, SAS institute, Carolina del Norte, USA). La diferencia entre las expresiones de proteínas y RNA mensajero se establecieron mediante un ANOVA paramétrico, mientras que la correlación entre las variables se analizó por modelo de Pearson o Spearman.

3. ACTIVIDADES REALIZADAS

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

Se realizó análisis histológico en tejido hipotalámico de rata mediante laminillas del tejido hipotalámico, teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E) para la observación de la morfología celular. Así mismo, se realizaron inmunofluorescencias para la localización de proteínas específicas y por último, se realizó expresión de genes para evaluar su papel en la regulación del proceso apoptótico y la relación existente entre la supervivencia y la muerte celular.

- **Murciélago vampiro (Desmodus rotundus)**

Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) en gónadas de machos y hembras tratados con un fitoestrógeno, con la finalidad de evaluar posibles alteraciones morfológicas y hacer inferencias en cuanto a la función gonadal de los individuos tratados. Además, se llevaron a cabo inmunofluorescencias específicas para la determinación de los receptores estrogénicos alfa y beta, para estudiar tanto su expresión como su localización celular en respuesta al tratamiento.

4. METAS ALCANZADAS

Se realizó la redacción de una revisión bibliográfica sobre los efectos del heptacloro en la salud de los animales expuestos a esta sustancia, con el objetivo de publicarse en la revista Abanico Veterinario.

Se realizó la redacción de un artículo sobre el efecto de un fitoestrógeno sobre la función reproductiva del *Desmodus rotundus* y el impacto que genera en las poblaciones silvestres de esta especie. De igual manera, el trabajo se presentó en formato cartel y en formato de presentación para conferencia en el Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Montecillo, en Texcoco con motivo del 1er Congreso de Reproducción Animal celebrado los días 24 y 25 de Octubre del 2024 (Anexo 1).

Se realizaron cortes histológicos de los tejidos estudiados que se tiñeron con la tinción H&E con el fin de, más adelante, identificar las zonas en las que se expresaron las proteínas.

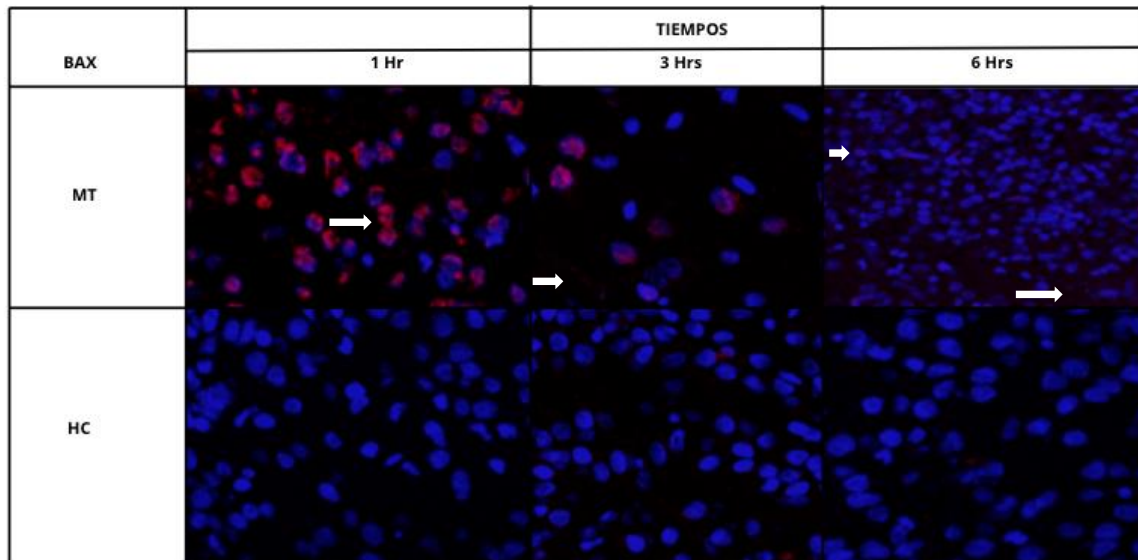
5. RESULTADOS

1. MACHOS FEMINIZADOS (MT) vs HEMBRAS CONTROL (HC)

- INMUNOFLORESCENCIA
- Niveles de intensidad de la fluorescencia

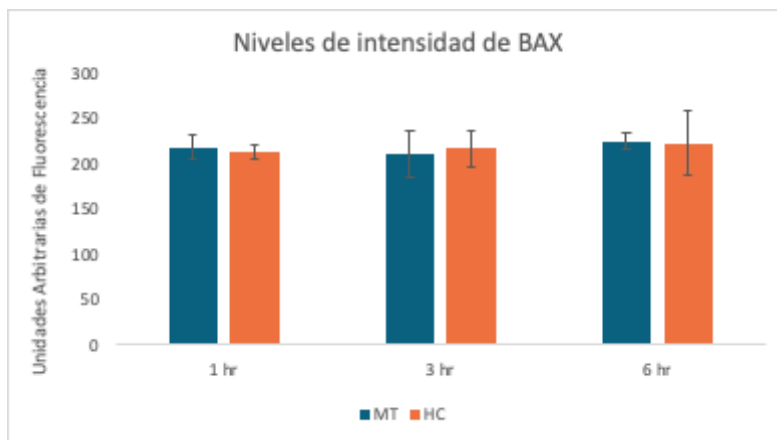
Bax

Figura 1. Inmunofluorescencia. Bax en grupo MT vs HC (Tamoxifeno)



A la inspección de las laminillas en el microscopio confocal, se observa una tinción doble de fluorescencia en el hipotálamo de ratones con un anticuerpo policlonal de conejo para bax y un anticuerpo secundario conocido como Alexa Fluor 595. a flecha señala las zonas con emisión roja que corresponde a los núcleos que contienen bax. Nótese que en el grupo MT, la mayoría de las neuronas exhiben a bax activado en núcleo (patrón nucleolar) pero a las 3 horas se observa una ligera emisión a nivel citoplasmático. Al alcanzar las 6 horas, la emisión se puede observar en ambos.

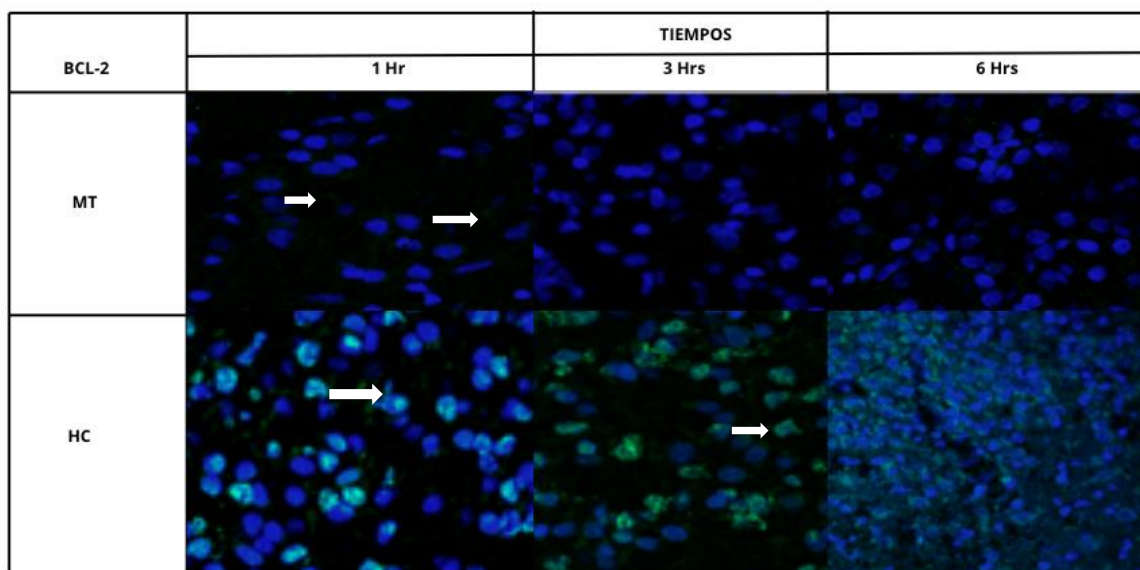
Figura 2. Niveles de intensidad de bax



Los resultados de la intensidad muestran que a la 1 hora posterior al tratamiento, el nivel de intensidad de la fluorescencia registrado para bax en el grupo MT fue ligeramente superior (218.54 ± 13.5 UAF) a la observada en el grupo HC (212.73 ± 7.82 UAF). A las 3 horas, en el grupo MT se redujo la intensidad a 212.26 ± 25.8 UAF, mientras que en el grupo HC aumentó a 217.6 ± 20.26 . Transcurridas 6 horas post-tratamiento, la intensidad de bax en el grupo MT alcanzó un valor de 225.56 ± 8.15 , valor que fue mayor al registrado para el grupo HC que alcanzó un valor de 223.5 ± 34.68 .

Bcl-2

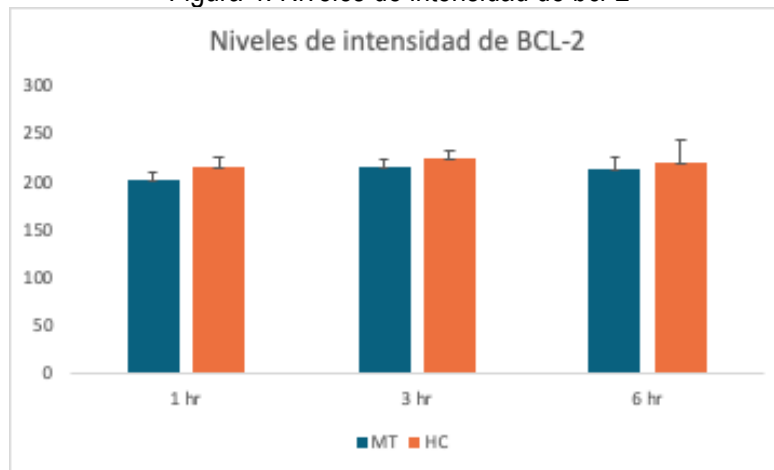
Figura 3. Inmunofluorescencia. Bcl-2 en grupo MT vs HC (Tamoxifeno)



A la inspección de las laminillas en el microscopio confocal, se observa una tinción doble de fluorescencia en el hipotálamo de ratones con un anticuerpo monoclonal para ratón y un anticuerpo secundario conocido como Rodamina. La flecha señala las zonas con emisión azul más clara que corresponden a los núcleos que contienen bcl-2. En el grupo MT, la fluorescencia se observó débil a nivel citoplasmático, durante los tres tiempos de estudios. En comparación, el grupo HC, al alcanzar la 1 hora, la emisión de la fluorescencia fue proporcional entre núcleo y citoplasma. Sin embargo a

las 3 horas, se observó un aumento de la emisión para bcl-2 en el núcleo que después se homogenizó a las 6 horas.

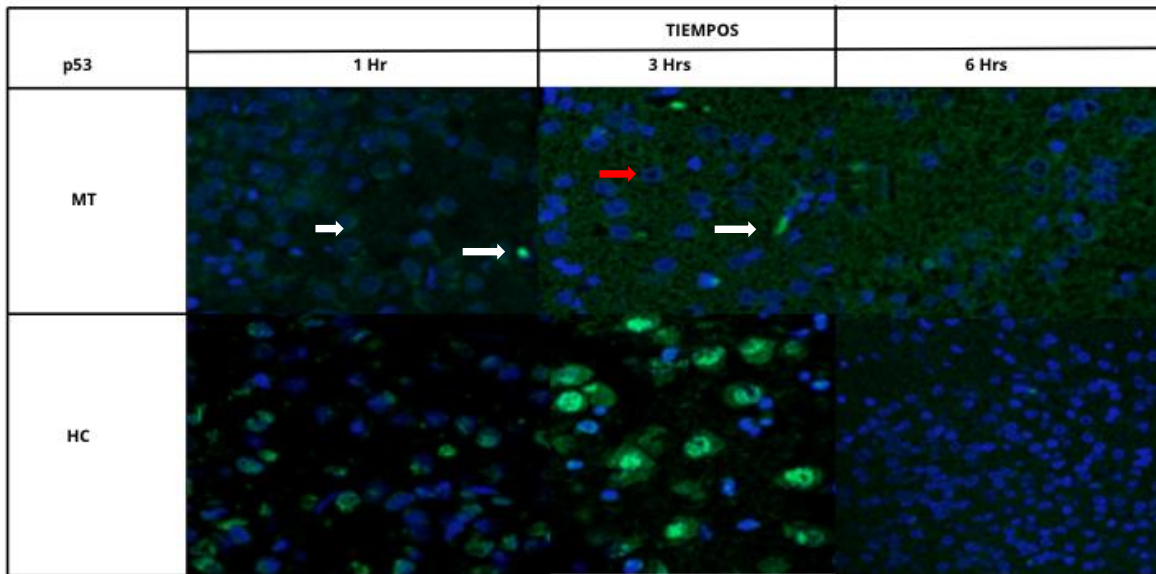
Figura 4. Niveles de intensidad de bcl-2



El nivel de intensidad registrado para bcl-2 en el grupo MT (201.4 ± 8.88 UAF) fue menor a la registrada en el grupo HC (215.5 ± 9.15 UAF) a la 1 hora posterior al tratamiento. A las 3 horas, se observó un aumento en ambos grupos, pero la expresión en el grupo MT (215.5 ± 7.37) también fue inferior al compararse con la del grupo HC (225.5 ± 7.83). Sin embargo, a las 6 horas después del tratamiento, la expresión en ambos grupos disminuyó, pero nuevamente el grupo MT (214 ± 12.54) obtuvo un valor menor al observado en el grupo HC (219.5 ± 24.68).

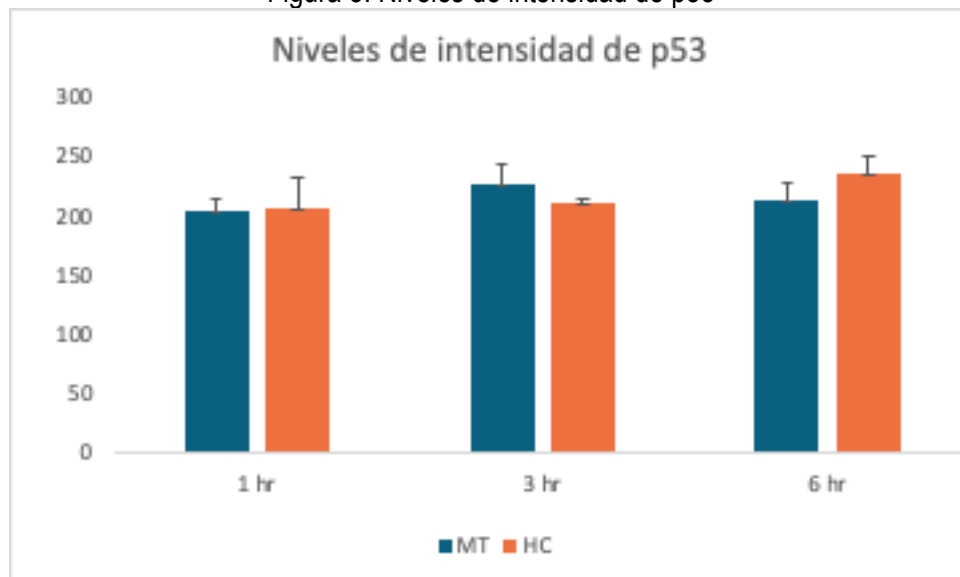
p53

Figura 5. Inmunofluorescencia. p53 en grupo MT vs HC (Tamoxifeno)



A la inspección de las laminillas en el microscopio confocal, se observa la una tinción doble de fluorescencia en el hipotálamo de ratones con un anticuerpo monoclonal para ratón y un anticuerpo secundario conocido como Rodamina. A la 1 hora, se observa una ligera emisión nuclear de p53. Sin embargo, la fuerza en la emisión de coloración verde aumenta a las 3 hrs lo que indica que a ese tiempo, la activación de p53 es más fuerte a nivel citoplasmático. A las 6 horas, el patrón de la fluorescencia se mantiene. Es importante notar la diferencia en la emisión entre ambos grupos, cuando se alcanzan las 6 horas. Además es posible notar algunas células con pérdida de integridad (flecha roja).

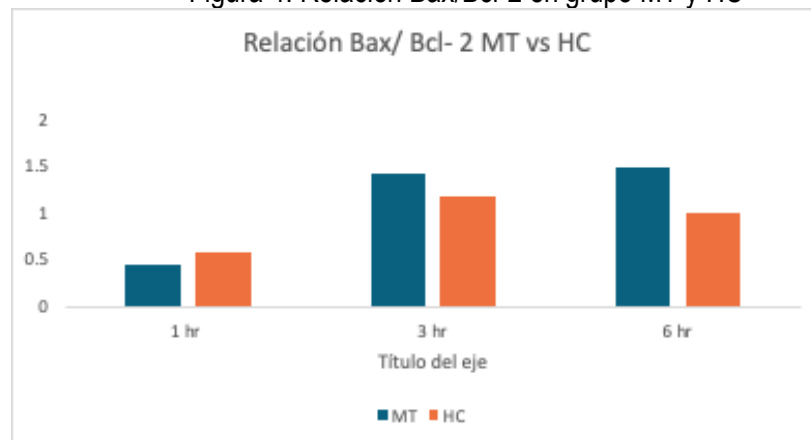
Figura 3. Niveles de intensidad de p53



A la 1 hora después de tratamiento el nivel de intensidad observado para p53 en el grupo MT (205.15 ± 10.2) fue ligeramente inferior al compararse con la del grupo HC (207.2 ± 24.62). Transcurridas 3 horas posteriores al tratamiento, la intensidad en el grupo MT fue superior pues aumentó a 227.33 ± 15.3 mientras que el grupo HC alcanzó 210.6 ± 4.59 . A las 6 horas, en el grupo MT (213.66 ± 14.99) la intensidad fue menor a la observada en el grupo HC (235.4 ± 16.11).

- Relación Bax/Bcl-2

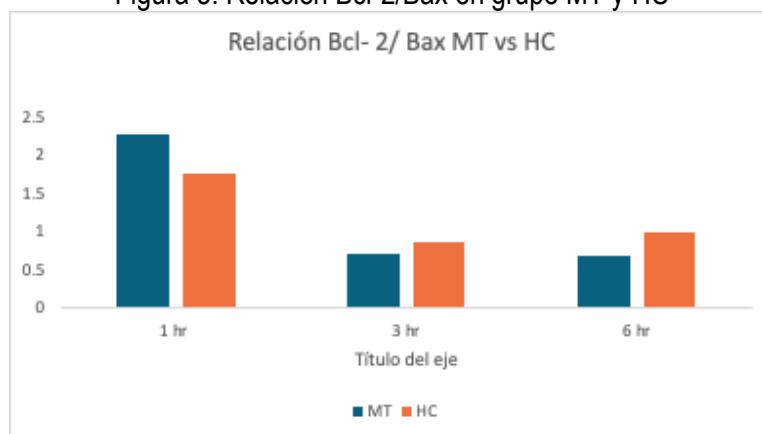
Figura 4. Relación Bax/Bcl-2 en grupo MT y HC



Para el grupo MT, la relación Bax/Bcl-2 tuvo una reducción significativa con el tiempo: A la 1 hora post-tratamiento, el grupo mostró una relación de 2.2763; a las 3 horas se observó una reducción significativa a 0.6958, comportamiento que se repitió a las 6 horas alcanzando un valor de 0.6721. En el grupo HC, en la relación Bax/Bcl-2 también se observó una disminución pero fue menor que la observada en el grupo MT: A la 1 hora, el valor alcanzado fue de 1.7492 reduciéndose al alcanzar las 3 horas a 0.8507 pero con un ligero aumento a las 6 horas alcanzado un valor de 0.9954.

- Relación Bcl-2/Bax

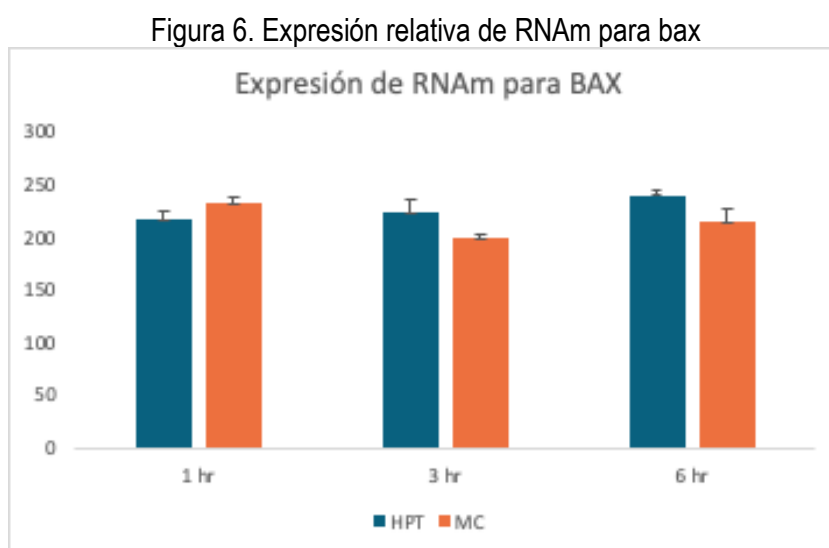
Figura 5. Relación Bcl-2/Bax en grupo MT y HC



En el grupo MT la relación Bcl-2/Bax registró un valor inicial más bajo (0.4393) que la observada en la relación Bax/Bcl-2. Sin embargo, a las 3 horas se observó un aumento a 1.4373 y finalmente, a las 6 horas alcanzó un valor de 1.4879. En el grupo HC, la relación Bcl-2/Bax tuvo un comportamiento similar al del grupo MT, pues a la 1 hora se registró un valor de 0.5717 que aumentó a las 3 horas a un valor de 1.1755, y finalmente disminuyó a 1.0046 a las 6 horas post-tratamiento.

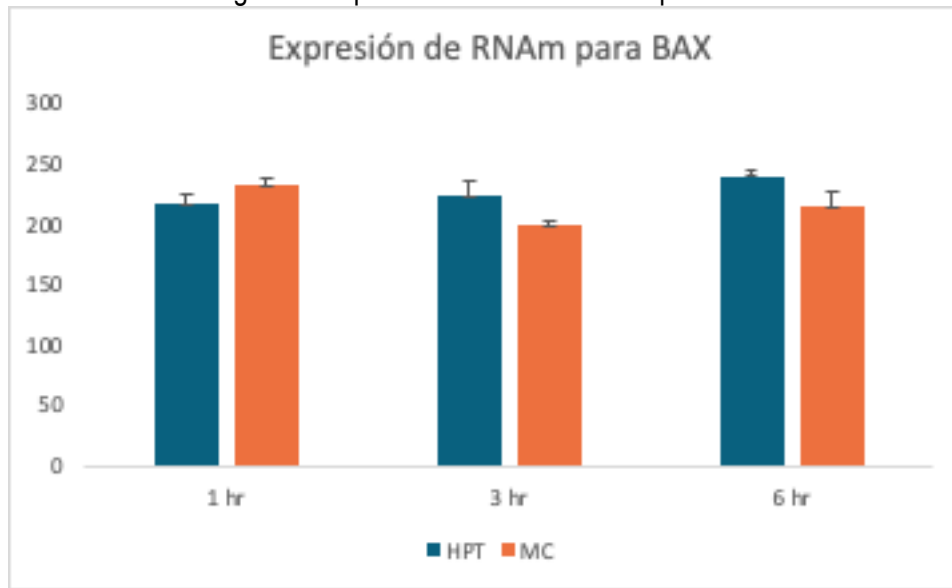
2. HEMBRAS MASCULINIZADAS (HPT) vs MACHOS CONTROL (MC)

- Expresión de RNAm



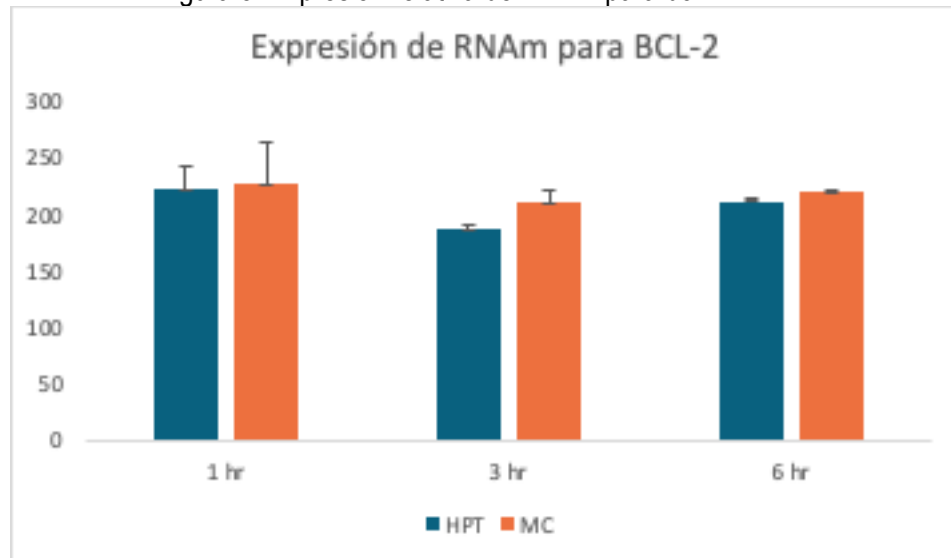
La expresión de Bax a la 1 hora post-tratamiento en el grupo HPT (216.96 ± 8.5) fue menor a la observada en el grupo MC (232.76 ± 5.5). A las 3 horas, el grupo HPT presentó un aumento a 223.5 ± 12.98 mientras que en el grupo MC se observó una disminución a 199.93 ± 2.36 . Luego de 6 horas post-tratamiento, la expresión de bax en el grupo HPT aumentó nuevamente a 240.66 ± 5.15 , el grupo MC también registró un aumento (215.23 ± 11.28) pero fue inferior al valor alcanzado en el grupo anterior.

Figura 7. Expresión relativa de RNAm para bax



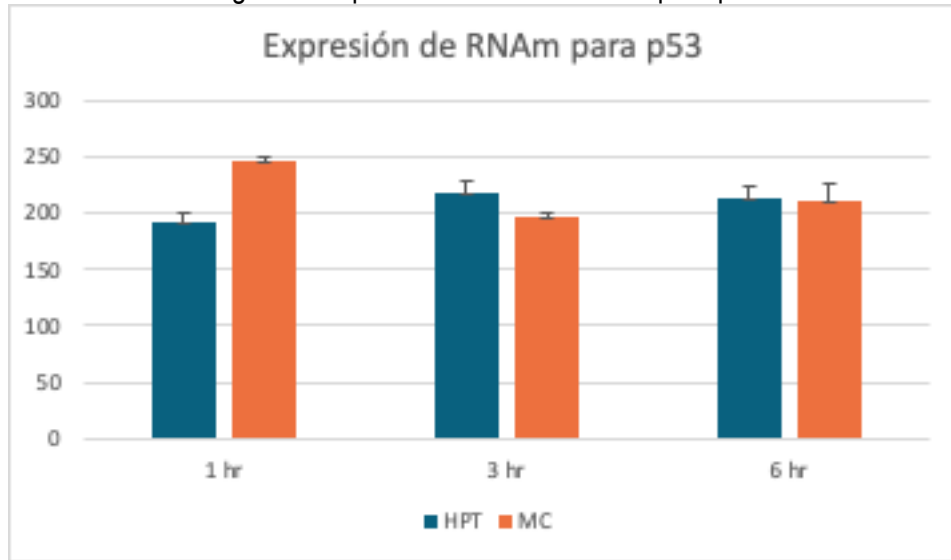
Bcl-2

Figura 8. Expresión relativa de RNAm para bcl-2



A la 1 hora después del tratamiento, la expresión de bcl-2 en el grupo HPT (224.4 ± 20.26) fue ligeramente inferior a la que se obtuvo en el grupo MC (228 ± 36.73). Después de 3 horas, la expresión en ambos grupos disminuyó y el grupo HPT (188.8 ± 2.66) registró un valor menor al alcanzado por el grupo MC (210.53 ± 12.8). A las 6 horas posteriores al tratamiento, se observó un aumento de la expresión en el grupo HPT (212.66 ± 2.44) al igual que en el grupo MC que alcanzó un valor de 220.6 ± 1.93 .

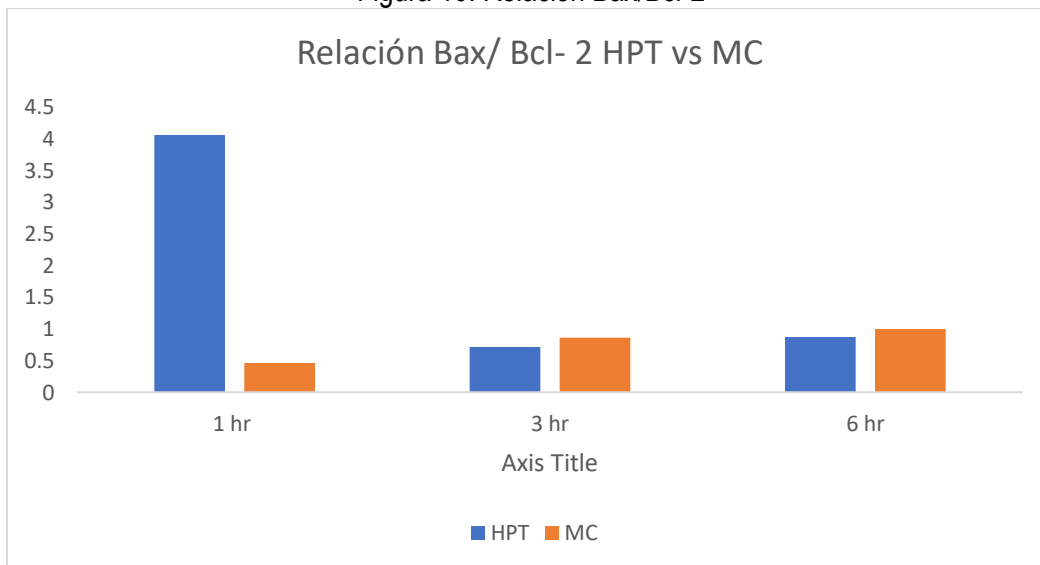
Figura 9. Expresión relativa de RNAm para p53



Los resultados mostraron que a la 1 hora después del tratamiento, la expresión en el grupo HPT (191.9 ± 9.2) fue ligeramente inferior al compararlo con el valor alcanzado por el grupo MC (245.96 ± 4.48). A las 3 horas, el grupo HPT aumentó ligeramente a 218.33 ± 11.5 mientras que el grupo MC disminuyó a 198.1 ± 2.68 . Transcurridas 6 horas, el grupo HPT disminuyó ligeramente a 213.46 ± 10.46 mientras que el grupo MC presentó un pequeño aumento a 212.26 ± 13.65 .

- Relación Bax/Bcl-2

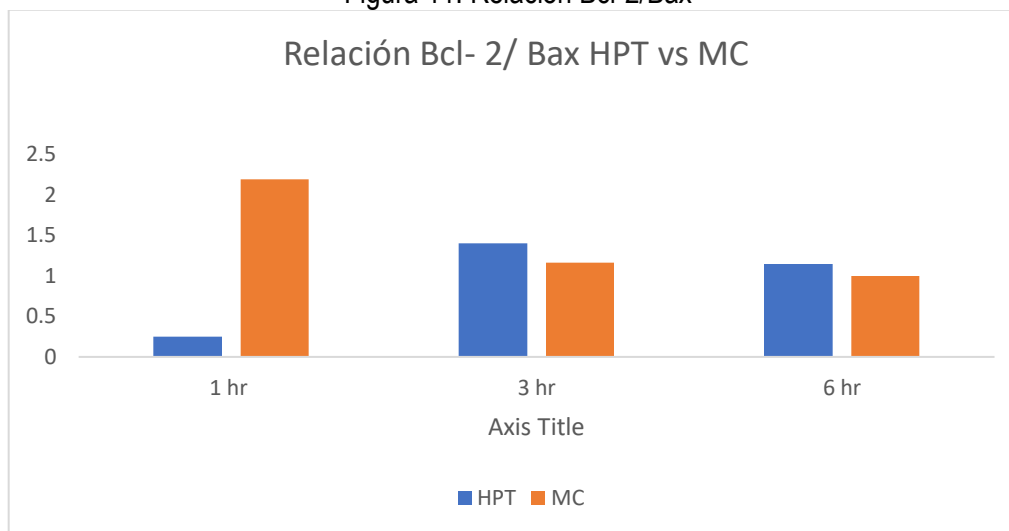
Figura 10. Relación Bax/Bcl-2



En el grupo HPT, a la 1 hora el valor registrado para la relación fue alto (4.06), respecto al registrado en el grupo MC (0.46, pero disminuyó durante las 3 y 6 horas (0.87 y 0.71, respectivamente). Mientras que el grupo MC, durante las 3 y 6 horas obtuvo valores de 0.86 y 0.99, respectivamente.

- Relación Bcl-2/Bax

Figura 11. Relación Bcl-2/Bax



A la 1 hora, en el grupo HPT se obtuvieron valores de 0.25. Cuando se alcanzaron las 3 horas, este grupo registró un aumento a 1.40 y una disminución no significativa a 1.15 durante las 6 horas. Por lo contrario, la relación en el grupo MC mostró valores más altos (2.19) durante la 1 hora post-tratamiento. Al alcanzar las 3 y 6 horas, la relación disminuyó a 1.16 y 1.00 respectivamente.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, se muestran diferencias en la expresión de las proteínas bcl-2, bax y p53 entre los grupos estudiados (MT-HC ; MC-HPT), sugiriendo que la exposición a los tratamientos administrados tamoxifeno y propionato de testosterona durante periodos críticos del desarrollo hipotalámico-cerebral de las ratas puede influir sobre los procesos que regulan la diferenciación sexual mediante apoptosis.

En el caso de Bax, aunque el grupo MT registró valores más altos en los primeros tiempos en comparación con el grupo HC, la diferencia disminuyó conforme avanzó el estudio. Esta tendencia demuestra la posibilidad de que, en los machos, la activación de esta proteína durante las primeras 3 horas post-exposición al tratamiento con tamoxifeno (proceso de feminización) y aceite sea induzca en mayor parte la apoptosis pero que este efecto se equilibra con el tiempo.

Es importante señalar que el tamoxifeno es una sustancia sintética no esteroidea considerada antiestrogénica (tipo I) que interactúa con los receptores para estrógenos ejerciendo una acción

antagonista o agonista. En los humanos, se ha descrito que el tamoxifeno interfiere con los procesos de retroalimentación negativa de esteroides sexuales en el hipotálamo y pituitaria, estimulando la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de la hormona foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), conduciendo así a la síntesis de testosterona. En las ratas, se conoce que durante el proceso natural de diferenciación sexual algunas de las neuronas, como las del núcleo ventromedial del hipotálamo, son dependientes de los niveles de estradiol para ejercer efectos feminizantes sobre la conducta. Este núcleo posee ambos receptores (ER α y ER β) al igual que otras áreas cerebrales, pero expresa más el tipo α . Por su parte, el tamoxifeno posee la capacidad de unirse a cualquiera de ambos receptores y el tipo de interacción depende del tipo de interacciones celulares y al tipo de tejido en cuestión. En ausencia de estradiol, la unión al ER α ocasiona una interacción agonista mientras que la unión al ER β una acción antiestrogénica (Corrada, 2004; Sá *et al.*, 2018). Al ser Bax una proteína apoptótica, es posible proponer que la elevación registrada durante las primeras tres horas, se debe a la inducción apoptótica sobre las células de las estructuras que posiblemente cursan por un proceso inicial de masculinización permitiendo la acción de los estrógenos sobre estas y más tarde induciendo la apoptosis controlada para su adecuación a estructuras feminizadas definidas.

Esto coincide con los valores registrados para bcl-2 que fueron menores al inicio y tuvieron aumento conforme avanzaba el tiempo: se debe considerar que cuando bcl-2 posee el dominio BH4, es considerada una proteína anti-apoptótica (Tsujiyama, 1998). Por otro lado, la regulación de muerte y supervivencia de las células producidas durante el periodo embrionario son las responsables del modelaje estructural mediante apoptosis de las estructuras cerebrales así como sus funciones. Sin embargo, durante el periodo postnatal el cerebro funcional continúa modelándose de manera limitada a unas cuantas estructuras (Dori *et al.*, 2021). Esto parece explicar el comportamiento de bcl-2, al inicio incrementada por la presencia de estructuras inicialmente “masculinas” y después, a medida que se modelan a sus formas “femeninas”, la apoptosis se regula. Además, ambos comportamientos coinciden con los resultados obtenidos en la relación Bax/Bcl-2 en ambos grupos (MT vs HC); se conoce que la relación entre proteínas apoptóticas y antiapoptóticas es lo que determina el destino de la célula hacia su supervivencia o hacia su muerte por lo que el aumento de una proteína que promueve la supervivencia en una célula debería reducir la probabilidad de su muerte.

En cuanto a p53, sus niveles más altos fueron durante las 3 horas y estabilizando a las 6, sugiriendo que el grupo MT experimentó mecanismos de reguladores de la muerte celular inducidos por la exposición al tratamiento. Se conoce que la deficiencia de p53 durante el modelaje cerebral resulta en la exencefalia por crecimiento excesivo o una apoptosis reducida pero también regula la proliferación y diferenciación neuronal, además, se ha demostrado que en experimentos *in vitro* es la responsable de direccionar a neuronas primarias hacia la proliferación o la apoptosis (Molchadsky *et al.*, 2010). Este hecho apoya la posibilidad de que durante el periodo de tres horas, los mecanismos de apoptosis están modelando las estructuras de una morfología masculinizada hacia una feminizada manteniendo la homeostasis cerebral. Además, el comportamiento de regulación apoptótica cuando se alcanzaron las 6 horas en el grupo MT coincide con el comportamiento registrado en el grupo de hembras control (HC).

Se ha demostrado que la expresión y regulación que ejerce la familia de proteínas bcl-2 sobre el proceso de diferenciación sexual cerebral está controlada por los esteroides gonadales. Por ejemplo, en el sistema nervioso central de ratas adultas, la regulación positiva de la familia Bcl-2 depende del estradiol pero, el control que ejerce sobre las neuronas durante el desarrollo, está menos estudiado. Sin embargo, se ha caracterizado que la testosterona en ratas macho neonatas disminuye la expresión

de bcl-2 y aumenta la apoptosis en el área preóptica del hipotálamo afectando el comportamiento sexual, en el futuro (Zup *et al.*, 2003). Este hecho ha sido estudiado en investigaciones como la realizada por González-González *et al.* (2016) en donde se evidenciaron que una sola administración de tamoxifeno en conjunto con aceite de soya es capaz de inducir cambios morfológicos como sobre las estructuras testiculares en ratas neonatas que podrían conducir a impactos fisiológicos durante la vida adulta.

De igual manera, cuando se analizaron los resultados obtenidos para la expresión de genes en el grupo de hembras masculinizadas (HPT) a las que se les administró propionato de testosterona, se pudo observar un comportamiento similar al grupo MT respecto a las proteínas bax, bcl-2 y p53 asociado a la muerte de neuronas “feminizantes” hacia la modulación de las estructuras masculinas. El propionato de testosterona es ampliamente utilizado en la ciencia para masculinizar el comportamiento y ocasionar cambios en la ciclicidad normal de las ratas, pues se ha demostrado que la administración postnatal de andrógenos altera la dinámica de secreción hormonal hacia una forma tónica más representativa de los machos, indicando que los andrógenos poseen un rol organizacional a nivel hipotalámico (Seale *et al.*, 2004).

La desfeminización cerebral ejercida sobre las estructuras “masculinizantes” por la acción de la testosterona está sustentada en dos eventos fundamentales: su conversión a estradiol por la enzima aromatasa y la señalización regulada tanto por los receptores estrogénicos (Sato *et al.*, 2004) como por receptores androgénicos. Por lo tanto, el uso de estradiol en ratas hembras durante el periodo postnatal temprano, también induce la masculinización completa del cerebro y la conducta. Además, es importante mencionar que las áreas cerebrales sexualmente dimórficas poseen altos niveles de aromatasa (citocromo p450) y gran densidad de receptores estrogénicos. Ante la presencia de grandes cantidades de estrógenos, la alfafetoproteína se une a estos permitiendo que la testosterona en circulación sanguínea, ejerza una acción directa sobre el cerebro, al permitirle cruzar en mayor nivel la barrera hematoencefálica (Schwarz & McCarthy, 2008).

Los mecanismos responsables del rol organizacional a nivel hipotalámico de los andrógenos son mediados por una regulación de la expresión de los genes involucrados. Ante la unión del estradiol a un receptor estrogénico, la acetilación proteica de los sitios promotores de genes aumenta, ocasionando una elevación en la transcripción de estos. Por lo tanto, la expresión de algunos genes es mayor en machos que en hembras debido al bajo nivel de estradiol sintetizado a partir de la testosterona (Zhang *et al.*, 2013).

De esta manera los niveles elevados en la transcripción de estas proteínas (bax, bcl-2 y p53) en el grupo HPT podrían indicar que el tratamiento ejerce una desregulación del mecanismo apoptótico sobre los circuitos neuronales sensibles a hormonas sexuales, adecuando algunas estructuras cerebrales específicas a un modelo cerebral masculino (reorganización). Las diferencias en características sexuales más representativas a nivel cerebral se encuentran en el área preóptica (POA) y, en la rata macho neonata, el estradiol es el encargado de regular el volumen y número de células en el POA durante los primeros días post-nacimiento perdurando hasta la adultez (Nugent *et al.*, 2015); por lo tanto, en las ratas hembras existe un mayor nivel de apoptosis durante la etapa neonatal debido a la modelación de ésta área que, en comparación con el macho, es menor. Debido a esto, la administración de testosterona en el periodo perinatal conduce a un POA del mismo tamaño que en el macho (Zhang *et al.*, 2013).

Esto último toma relevancia sobre todo al analizar los resultados obtenidos en la relación Bax/Bcl-2 y Bcl-2/Bax, pues al considerarse la feminización un proceso predispuesto y teniendo en cuenta el efecto organizacional de los andrógenos, se podría considerar la posibilidad de atribuir estos valores al proceso de reorganización cerebral desencadenado por la administración de propionato de testosterona.

7. CONCLUSIONES

Las proteínas bax, bcl-2 y p53 están involucradas en el proceso de diferenciación sexual mediante la regulación de los mecanismos apoptóticos desencadenados por la remodelación neural en dichas estructuras cerebrales, de acuerdo al ambiente hormonal en el que se desarrolle el neonato.

Los tratamientos con tamoxifeno y propionato de testosterona ocasionan una disrupción en el proceso de diferenciación sexual normal en la etapa perinatal en los roedores, induciendo su maculinización o feminización.

Se requiere mayor investigación sobre las vías metabólicas que siguen el proceso de masculinización cerebral inducida en hembras.

Se recomienda continuar con la investigación para determinar las zonas cerebrales implicadas en este proceso mediante la identificación histológica.

8. ANEXO 1

Resumen

Identificación de los Receptores Estrogénicos α & β mediante Inmunofluorescencia en Tejido Testicular de *Desmodus rotundus*

X., Ratia – Martínez¹, R., Chávez - García², M., Vergara- Onofre², A., Contreras-Ramos³, J.J., Pérez – Rivero, Cruz y Celis^{2*}.

¹Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, C.P. 04960 México CDMX. ²Departamento de Producción Agrícola y Animal". Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, C.P. 04960 México CDMX. ³Laboratorio de Investigación en Biología Molecular, Centro de Malformaciones Congénitas, Hospital Infantil de México-Federico Gómez (HIM-FG), Dr. Márquez # 162, Col. Doctores, C.P. 06720 Ciudad de México.

El quiróptero *Desmodus rotundus* produce alrededor de cien mil muertes de cabezas de ganado bovino debidas a la rabia transmitida por su mordida. Se han desarrollado diversos métodos de control para sus poblaciones en vida silvestre que se basan en métodos no letales y que producen menos impacto ambiental. Entre estos métodos, se destaca el uso de fitoestrógenos para reducir la fertilidad en estas poblaciones, como en el caso del coumestrol que ha sido probado en ratas en donde mostró alta afinidad por los receptores estrogénicos (RE) imitando la de los estrógenos endógenos. Además, al suministrarse en la dieta ocasiona alteraciones en el desarrollo neuroendocrino en ratas lactantes, baja de peso y libido, hiperestrogenismo y crecimiento uterino significativo. El objetivo de este estudio fue determinar si el coumestrol es capaz de inducir alteraciones en el tejido gonadal del macho de *Desmodus rotundus* y determinar la presencia de receptores ER α y β mediante microscopía confocal. Los resultados mostraron un aumento con el tratamiento en AFP en comparación con el control (223.13 ± 3.98 ; 112.13 ± 12.8 respectivamente); el ER- α se vio notablemente aumentado con el tratamiento frente al control (222.78 ± 6.15 ; 129.66 ± 2.41 respectivamente) mientras que el ER- β no mostró cambios significativos cuando se comparó el tratamiento y el control (215.28 ± 8.7 ; 216.6 ± 13.02 respectivamente). Con estos hallazgos se concluye que el coumestrol induce daño en la morfología testicular posiblemente a causa de un efecto de atrofia testicular que reduce la producción de espermatozoides disminuyendo la tasa de fertilidad.

Constancias



65 Aniversario

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas

Otorga la presente



45 Aniversario

CONSTANCIA

X., Ratia-Martínez, R., Chávez-García, M., Vergara-Onofre, A., Contreras-Ramos, J.J., Pérez-Rivero, Cruz y Celis

A

por su participación como **Ponente** en el

1er Congreso

REPRODUCCIÓN ANIMAL

Ponencia: «(20) IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS A & B MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDO OVÁRICO DE *Desmodus rotundus*»

Realizado del 24 al 25 de octubre de 2024, en la Unidad de Congresos del Colegio de Postgraduados con duración de 20 h.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México a 25 de octubre de 2024.



Dr. Jaime GALLEGOS SÁNCHEZ
Comité Organizador



Dr. Sergio Iban MENDOZA PEDRAZA
Coordinador Programa de Ganadería



65 Aniversario

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas

Otorga la presente



45 Aniversario

CONSTANCIA

X., Ratia-Martínez, R., Chávez-García, M., Vergara-Onofre, A., Contreras-Ramos, J.J., Pérez-Rivero, Cruz y Celis

A

por su participación como **Ponente** en el

1er Congreso

REPRODUCCIÓN ANIMAL

Ponencia: «(03) IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS A & B MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDO TESTICULAR DE *Desmodus rotundus*»

Realizado del 24 al 25 de octubre de 2024, en la Unidad de Congresos del Colegio de Postgraduados con duración de 20 h.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México a 25 de octubre de 2024.



Dr. Jaime GALLEGOS SÁNCHEZ
Comité Organizador



Dr. Sergio Iban MENDOZA PEDRAZA
Coordinador Programa de Ganadería



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas



Otorga la presente

65 Aniversario

CONSTANCIA

45 Aniversario

Cervantes-Nuñez, K.S, Flores- Martínez, X. Ratia- Martínez, A.,
Contreras-Ramos, C., Ortega- Camarillo, A., Avalos Rodríguez, J.J.,
A Pérez-Rivero, Cruz y Celis, M., Vergara-Onofre, R. Chávez-García.

por su participación como **Ponente** en el

1^{er} Congreso

REPRODUCCIÓN ANJMAL

Ponencia: «(17) ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS (A Y B) Y LA ALFA FETO-PROTEÍNA (AFP) CON LA ADMINISTRACIÓN DE ACEITE DE SOYA DURANTE EL PERIODO CRÍTICO DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA DE LA RATA MACHO»

Realizado del 24 al 25 de octubre de 2024, en la Unidad de Congresos del Colegio de Postgraduados con duración de 20 h.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México a 25 de octubre de 2024.



Dr. Jaime GALLEGOS SÁNCHEZ
Comité Organizador



Dr. Sergio-Iban MENDOZA PEDRAZA
Coordinador Programa de Ganadería



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas



Otorga la presente

65 Aniversario

CONSTANCIA

45 Aniversario

J.E, Morales-Collado, X. Ratia-Martínez, M., Cervantes-Nuñez, A.,
Contreras-Ramos, C., Ortega- Camarillo, A., Avalos Rodríguez, J.J.,
A Pérez-Rivero, Cruz y Celis, M., Vergara- Onofre, R. Chávez-García.

por su participación como **Ponente** en el

1^{er} Congreso

REPRODUCCIÓN ANJMAL

Ponencia: «(19) EFECTOS DE LOS FITOESTRÓGENOS SOBRE LA PRESENCIA DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS (A Y B) Y LA ALFA FETO-PROTEÍNA (AFP) DURANTE EL PERIODO CRÍTICO DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA DE LA RATA HEMBRA»

Realizado del 24 al 25 de octubre de 2024, en la Unidad de Congresos del Colegio de Postgraduados con duración de 20 h.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México a 25 de octubre de 2024.



Dr. Jaime GALLEGOS SÁNCHEZ
Comité Organizador



Dr. Sergio-Iban MENDOZA PEDRAZA
Coordinador Programa de Ganadería

Bibliografía

Becerra, L. V., & Pimienta, H. J. (2009). Apoptosis neuronal: La diversidad de señales y de tipos celulares. *Colombia Médica*, 40(1), 124-133. Universidad del Valle. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v40n1/v40n1a11.pdf>

Corrada, Y. (2004). Effect of tamoxifen citrate on reproductive parameters of male dogs. *Theriogenology*, 61(7-8), 1327-1341. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.020>

Dickerson, S. M., Cunningham, S. L., & Gore, A. C. (2011). Prenatal PCBs disrupt early neuroendocrine development of the rat hypothalamus. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 252(1), 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.012>

Dori, I., Bekiari, C., Grivas, I., Tsingotjidou, A., & Papadopoulos, G. C. (2021). Birth and death of neurons in the developing and mature mammalian brain. *The International Journal of Developmental Biology*, 66(1-2-3), 9-22. <https://doi.org/10.1387/ijdb.210139id>

Ferreira, L. T., Figueiredo, A. C., Orr, B., Lopes, D., & Maiato, H. (2018). Dissecting the role of the tubulin code in mitosis. *Methods in Cell Biology*, 33-74. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.03.040>

González-González, A., González-Padilla, E., Fierro-Fierro, F., De Lourdes Juárez-Mosqueda, M., Pérez-Rivero, J. J., & Vergara-Onofre, M. (2016). A single neonatal administration of soybean oil and/or tamoxifen affects permanently the testis histomorphology in adult rats. *Veterinaria México OA*, 3(2). <https://doi.org/10.21753/vmoa.3.2.364>

Hauch, K. D., & Ratner, B. D. (2012). Microscopy for biomaterials science. In *Biomaterials Science* (pp. 677-692). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-087780-8.00058-9>

Herrera Gutiérrez, H. A., Vergara Onofre, M., Romano Pardo, M. C., Ortiz Muñoz, A. R., Rosales Torres, A. M., Velázquez Moctezuma, J., & Canchola Martínez, J. E. (2002). Estudio de los factores que regulan la apoptosis y la proliferación celular durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://doi.org/10.24275/uami.2801pg60j>

Herrera Gutiérrez, H. A., Vergara Onofre, M., Rosado-García, A., & Rosales Torres, A. M. (2005). Diferenciación sexual en el sistema nervioso central. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM*, 36(3), 340-342. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2005/vm053i.pdf>

Herrera Gutierrez H., Rosado-García, A., Vergara Onofre, M., Salcedo Vargas M., Miliar García A., Heuze de Icaza Y., Rosales-Torres A.M. (2013). Expresión génica relacionada con el ciclo celular, apoptosis, sinaptogénesis y diferenciación celular en la diferenciación sexual de la rata. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242013000300003

Johansen, J. A., Jordan, C. L., & Breedlove, S. M. (2004). Steroid hormone masculinization of neural structure in rats: a tale of two nuclei. *Physiology & Behavior*, 83(2), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.016>

Jutinico Shubach, Adriana Paola, Mantilla Galindo, Alejandra, & Sánchez Mora, Ruth Mélida. (2015). Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con Chlamydia Trachomatis. *Nova*, 13(24), 83-92. Retrieved December 03, 2024, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200008&lng=en&tlng=es.

Lindenboim, L., Borner, C., & Stein, R. (2010). Nuclear proteins acting on mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(4), 584–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.016>

Mosley, M., Shah, C., Morse, K. A., Miloro, S. A., Holmes, M. M., Ahern, T. H., & Forger, N. G. (2016). Patterns of cell death in the perinatal mouse forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 525(1), 47–64. <https://doi.org/10.1002/cne.24041>

Ngun, T. C., Ghahramani, N., Sánchez, F. J., Bocklandt, S., & Vilain, E. (2011). The genetics of sex differences in brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(2), 227–246. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.10.001>

Nugent, B. M., Wright, C. L., Shetty, A. C., Hodes, G. E., Lenz, K. M., Mahurkar, A., Russo, S. J., Devine, S. E., & McCarthy, M. M. (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nature Neuroscience*, 18(4), 690–697. <https://doi.org/10.1038/nn.3988>

Oyejide, L., Mendes, O., & Mikaelian, I. (2016). *Molecular Pathology*. In Elsevier eBooks (pp. 407–445). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803620-4.00016-5>

Sá, S. I., Teixeira, N., & Fonseca, B. M. (2018). Effects of tamoxifen on neuronal morphology, connectivity and biochemistry of hypothalamic ventromedial neurons: Impact on the modulators of sexual behavior. *Neurobiology of Disease*, 109, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.09.009>

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., & Kato, S. (2004). Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(6), 1673–1678. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305303101>

Schwarz, J. M., & McCarthy, M. M. (2008). Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3–5), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.012>

Seale, J. V., Wood, S. A., Atkinson, H. C., Harbuz, M. S., & Lightman, S. L. (2005). Postnatal masculinization alters the HPA axis phenotype in the adult female rat. *The Journal of physiology*, 563(Pt 1), 265–274. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078212>

Sellinger, E. P., Drzewiecki, C. M., Willing, J., & Juraska, J. M. (2021). Cell death in the male and female rat medial prefrontal cortex during early postnatal development. *IBRO Neuroscience Reports*, 10, 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.03.002>

Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*, 3(11), 697–707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x>

Wei, H., Wang, H., Wang, G., Qu, L., Jiang, L., Dai, S., Chen, X., Zhang, Y., Chen, Z., Li, Y., Guo, M., & Chen, Y. (2023). Structures of p53/BCL-2 complex suggest a mechanism for p53 to antagonize BCL-2 activity. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40087-2>

Wolf, CJ (2002). Efectos del propionato de testosterona prenatal en el desarrollo sexual de ratas macho y hembra: un estudio de dosis-respuesta. *Toxicological Sciences*, 65(1), 71–86. doi:10.1093/toxsci/65.1.71

Wright, C. L., Schwarz, J. S., Dean, S. L., & McCarthy, M. M. (2010). Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(9), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.05.004>

Zhang, L., Neme-Bechara, V., Escobar, A., & Irlles, C. (2013). Los sexoesteroides y la diferenciación sexual cerebral: ¿la contaminación de xenoestrógenos modificaría la estructura social humana? *Gaceta Médica de México*, 149, 325-333. Consultado en: https://www.anmm.org.mx/GMM/2013/n3/GMM_149_2013_3_325-333.pdf

Zhao, F., & Yao, H. (2019). A tale of two tracts: history, current advances, and future directions of research on sexual differentiation of reproductive tracts†. *Biology of Reproduction*, 101(3), 602–616. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz079>

Zup, S. L., Carrier, H., Waters, E. M., Tabor, A., Bengston, L., Rosen, G. J., Simerly, R. B., & Forger, N. G. (2003). Overexpression of BCL-2 reduces sex differences in neuron number in the brain and spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 23(6), 2357–2362. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-06-02357.2003>