

## Mecanismos celulares en la diferenciación sexual cerebral

LUIS MIGUEL GARCÍA-SEGURA

### INTRODUCCIÓN

#### Hormonas sexuales y cerebro

El cerebro tiene un papel fundamental en la regulación de la función reproductora. Estudios en distintas especies de mamíferos han demostrado que en la región del hipotálamo se encuentran localizados grupos neuronales que están muy directamente implicados en la reproducción, ya sea regulando el comportamiento sexual (núcleo ventromedial del hipotálamo) o la secreción hormonal. Uno de estos grupos neuronales lo forman las células productoras del factor de liberación de gonadotrofinas, conocidas con el nombre de células GnRH o células LHRH (de las siglas en inglés para *gonadotrophin releasing hormone* o *luteinizing hormone releasing hormone*, respectivamente). Las gonadotrofinas, producidas por la hipófisis, regulan la secreción de hormonas sexuales por el testículo y el ovario.

Las hormonas sexuales son esteroides que cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica y actúan sobre diferentes poblaciones neuronales. Los receptores de las hormonas sexuales son factores nucleares de transcripción que regulan la expresión de diferentes genes. Entre los grupos neuronales que expresan receptores para las hormonas sexuales se encuentra el núcleo arcuato, una zona del hipotálamo que regula la actividad de las neuronas LHRH y, por tanto, la secreción de gonadotrofinas. De esta forma, actuando sobre las neuronas del núcleo arcuato, las hormonas sexuales regulan su propia secreción.

Existe, por tanto, una compleja interacción entre cerebro y gónadas. Éstas actúan sobre el cerebro con sus secreciones regulando las funciones cerebrales y el comportamiento, pero a su vez el cerebro regula la secreción gonadal. Esta regulación es diferente en cada sexo. En los mamíferos machos adultos se produce una liberación tónica de gonadotrofinas, mientras que en las hembras adultas la secreción de gona-

dotrofinas es cíclica. La secreción cíclica de gonadotrofinas en las hembras está en relación con los ciclos reproductores en este sexo. Por ejemplo, en la rata hembra adulta el estradiol producido por el ovario actúa sobre las neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato, las cuales a su vez estimulan la liberación de LHRH. A continuación el LHRH induce la liberación de gonadotrofinas y éstas provocan la ovulación. Las interacciones funcionales entre cerebro y gónadas en el adulto han sido objeto de numerosos estudios, y nuestros conocimientos son, en muchos casos, bastante detallados. Sin embargo, aún no se conoce con precisión cómo se genera durante el desarrollo esta compleja interacción. ¿Cómo se produce la diferenciación sexual de la función cerebral?

Actualmente se acepta que las hormonas sexuales ejercen efectos activadores y efectos organizadores sobre el cerebro (1). Los efectos activadores son transitorios y son los que producen las hormonas sexuales en el cerebro adulto. Los efectos organizadores son aquellos que resultan en modificaciones permanentes de la estructura y función cerebral y ocurren, fundamentalmente, durante el periodo fetal-neonatal. (Este periodo varía según las especies: fetal en primates, perinatal en roedores). Durante este periodo se produce la secreción de testosterona por el testículo. La testosterona llega al cerebro, en donde puede convertirse en estradiol (20). Este pico de secreción de testosterona y su conversión intracerebral en estradiol parecen tener un papel decisivo en el proceso de diferenciación sexual del cerebro. El patrón de diferenciación cerebral de tipo macho, según este esquema, sería el resultante de la acción de la testosterona o de su metabolito estradiol. Aquel de tipo hembra sería el patrón básico de desarrollo, que no sería modificado por la influencia de la testosterona o el estradiol. Según esta teoría, el estradiol producido por los ovarios durante el periodo de diferenciación sexual no llegaría al cerebro, ya que sería retenido por una proteína circulante con alta afinidad para esta hormona.

### **Las hormonas sexuales afectan la conectividad neuronal**

¿Cómo se afecta el desarrollo cerebral en el macho por la acción de la testosterona y el estradiol? Existen evidencias experimentales de que estas hormonas regulan diversos aspectos del desarrollo neuronal en determinadas áreas del cerebro. Por ejemplo, pueden determinar la existencia de un número diferente de neuronas en el adulto (3, 18), actuando durante el desarrollo ya sea como factores tróficos y promoviendo la supervivencia neuronal (2), ya sea favoreciendo la muerte neuronal (18). También pueden afectar el crecimiento de las prolongaciones neuronales, dendritas y axones (17, 29, 30), mediante la inducción de proteínas del citoesqueleto y estabilización de microtúbulos (5, 8). También afectan las conexiones mutuas que estas prolongaciones establecen. Es decir: pueden determinar el número de conexiones sinápticas entre las neuronas y por tanto el patrón de conectividad neuronal (11, 21, 22, 27), el cual, en último término, es la base de la función cerebral.

Estos efectos organizadores de las hormonas sexuales sobre la conectividad cerebral se ejercen, fundamentalmente pero no exclusivamente, en estructuras cerebrales que controlan el comportamiento reproductor o la secreción hormonal. El proceso de diferenciación sexual de la conectividad neuronal ha sido bien estudiado en el núcleo arcuato del hipotálamo de la rata (26). Durante las fases tempranas del desarrollo

postnatal de la rata, el número de conexiones sinápticas axosomáticas (conexiones establecidas sobre el soma de las neuronas) es muy bajo en el núcleo arcuato, aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo hacia el día 20 postnatal. El número de sinapsis axosomáticas es similar en ambos sexos durante los primeros diez días de vida postnatal, pero después el proceso de formación de sinapsis se ralentiza en los machos, de tal forma que a los 20 días las hembras han alcanzado un número de sinapsis muy superior al de los machos.

Esta diferencia sexual en el número de sinapsis no depende del sexo genético, sino de la secreción perinatal de testosterona por el testículo del macho. Esto se ha demostrado extirpando los testículos a ratas recién nacidas. El patrón de desarrollo de sinapsis en estos machos castrados desde el nacimiento es idéntico al de las hembras. También se puede alterar el proceso administrando testosterona a hembras recién nacidas. Estas hembras presentan un patrón de desarrollo sináptico idéntico al de los machos. El número de sinapsis alcanzado a los 20 días de edad postnatal por los machos se mantiene a lo largo de toda su vida adulta, aunque presenta una ligera fluctuación circadiana. Sin embargo, el número de sinapsis en las hembras presenta fluctuaciones muy marcadas asociadas a los ritmos de secreción ovárica que se producen a partir de la pubertad (23).

La secreción de estradiol en la tarde del proestro induce una disminución en el número de sinapsis axosomáticas, que no se recupera hasta un día después, en la tarde del estro (23, 25). Las sinapsis afectadas son inhibitorias y utilizan GABA como neurotransmisor (24). Los efectos hormonales sobre las sinapsis gabaérgicas están probablemente relacionados con el papel de este neurotransmisor como regulador de la secreción de gonadotrofinas. Estos cambios se observan a partir del primer proestro en la rata y están por tanto asociados al inicio de la pubertad. Por otra parte, la existencia de estos cambios sinápticos es inhibida si las ratas hembras son inyectadas con testosterona el día del nacimiento. Por tanto, son una consecuencia del proceso de diferenciación sexual del cerebro. Se plantea aquí de nuevo la cuestión de cuáles son los mecanismos que han podido originar estas diferencias sexuales en el comportamiento de las sinapsis. ¿Qué hace la testosterona en el cerebro de la rata recién nacida para ejercer este efecto latente que se manifestará con el inicio de la pubertad?

### **¿Cómo se explica el efecto retardado de la testosterona?**

La acción perinatal masculinizante de la testosterona sobre el cerebro no se manifiesta hasta el momento en que se alcanza la madurez sexual. Una hipótesis para explicar el efecto retardado de la testosterona sobre el desarrollo de la conectividad neuronal tiene en cuenta la posibilidad de que esta hormona regule los mecanismos de formación y estabilización de los contactos sinápticos. Ya se ha indicado que las hormonas sexuales afectan al crecimiento de dendritas y axones, cuyo crecimiento coordinado es necesario, pero no suficiente, para la formación de los contactos sinápticos. La formación de sinapsis es un proceso complejo que requiere también el reconocimiento específico entre las neuronas, la síntesis y transporte de los componentes moleculares y el ensamblaje de las estructuras subcelulares implicadas en la liberación y recepción del neurotransmisor y, finalmente, la estabilización del contacto establecido.

Las conexiones entre las neuronas no se realizan al azar, sino de acuerdo con un patrón específico que requiere un reconocimiento entre la neurona a contactar y el botón terminal o cono de crecimiento del axón en desarrollo que va a establecer el contacto. Por tanto, una manera posible de influir sobre la formación de contactos sinápticos es mediante la regulación de moléculas de membrana neuronal involucradas en el reconocimiento sináptico (9). Estudios recientes han demostrado que la estructura de la membrana neuronal se encuentra regulada hormonalmente en el núcleo arcuato del hipotálamo de la rata. Estudios realizados con la técnica de criofractura, que permite la visualización y marcaje inmunocitoquímico de las proteínas integrales de membrana, han demostrado que la composición proteica de la membrana plasmática del soma de las neuronas del núcleo arcuato es diferente en machos y hembras y que esta diferencia sexual es dependiente de los niveles perinatales de testosterona. Es decir que la administración de testosterona a hembras recién nacidas induce un fenotipo de membrana de tipo macho, mientras que la castración neonatal de los machos tiene como consecuencia la aparición de un fenotipo hembra (10, 15, 26). Es importante destacar que este efecto de la testosterona se manifiesta rápidamente, de tal forma que desde el mismo día del nacimiento existe una diferencia sexual en la composición de la membrana neuronal (10). Esta diferencia sexual precede, por tanto, a la llegada de los conos de crecimiento para la formación de sinapsis (26) y podría determinar que se formaran más sinapsis sobre las neuronas de las hembras que sobre las neuronas de los machos.

## LA GLÍA: UN ELEMENTO CLAVE EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL CEREBRO

Otro elemento celular muy importante a tener en cuenta en relación con la formación y mantenimiento de las conexiones neuronales es la astrogliá, un tipo de células gliales que regula el desarrollo y la función neuronal. Las prolongaciones de estas células envuelven la superficie neuronal y pueden regular la cantidad de membrana neuronal disponible para la formación de los contactos sinápticos (14, 23, 28). Los astrocitos parecen tener una activa participación en el proceso de diferenciación sexual de la conectividad neuronal en el núcleo arcuato del hipotálamo de la rata. Se ha demostrado que los niveles perinatales de testosterona determinan la densidad de ramificaciones astrogliales en el núcleo arcuato. Además, la administración de testosterona a hembras recién nacidas tiene como resultado un aumento en los niveles de RNA mensajero de la proteína ácida de los filamentos gliales (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) y de los niveles de proteína inmunorreactiva (4). Esta proteína es un constituyente de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos, y su nivel de expresión es un buen índice del grado de diferenciación morfológica de estas células. La castración neonatal del macho tiene el efecto opuesto sobre la expresión de GFAP.

Los efectos de la testosterona sobre la expresión de GFAP están asociados a la aparición de diferencias sexuales en la cantidad de membrana postsináptica recubierta por prolongaciones astrogliales. Esta cantidad es menor en las hembras y mayor en los machos, es decir está en proporción inversa al número de contactos sinápticos (13). Una vez alcanzada la pubertad, se producen variaciones en los niveles de GFAP

y en el recubrimiento de la superficie neuronal por prolongaciones gliales durante el ciclo estral, en coordinación con los cambios que ocurren en el número de contactos sinápticos (14). Estos resultados sugieren que las modificaciones hormonales en el citoesqueleto de los astrocitos pudieran tener como resultado cambios en la ramificación de sus prolongaciones y en su capacidad para recubrir la superficie neuronal, lo que a su vez determina la cantidad de membrana neuronal disponible para el establecimiento de contactos sinápticos.

Estudios realizados en cultivos primarios de hipotálamo sugieren que el efecto de la testosterona sobre los astrocitos depende, por lo menos en parte, de su conversión en estradiol (16). Además, los estudios *in vitro* indican que el efecto del estradiol sobre los astrocitos sólo se produce si existe un contacto directo de la membrana glial con la membrana neuronal (31). Esto parece ser debido a la presencia en la membrana neuronal de una forma embrionaria de la molécula de adhesión neural (N-CAM) rica en ácido polisialílico. La eliminación del ácido polisialílico de esta molécula bloquea el efecto del estradiol sobre los astrocitos (12). Por tanto, la expresión de una molécula de adhesión específica en la membrana neuronal parece ser necesaria para que el estradiol ejerza su acción sobre la morfología glial. El papel de esta forma embrionaria de la N-CAM parece ser el de facilitar la plasticidad neural, ya sea porque disminuye la adhesión entre las células y la consiguiente estabilización del citoesqueleto y la forma celular, ya sea porque actúa de transmisor de señales intracelulares acoplada a receptores de factores tróficos, como el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) (6, 12). Sea cual fuere su mecanismo, lo interesante es que todo parece indicar que es necesaria una estrecha comunicación entre astrocitos y neuronas para que se produzca la diferenciación sexual de los circuitos neuronales y, por tanto, la diferenciación sexual de la función cerebral. La inducción por la testosterona de diferencias sexuales en la composición de la membrana neuronal durante el periodo de desarrollo cerebral puede ser la causa de las diferencias en el grado de recubrimiento glial que aparecerán posteriormente. Al modificarse el grado de recubrimiento glial se modificaría el sitio dejado libre por la glía para el establecimiento de sinapsis. Esto podría explicar el efecto retardado de la testosterona, que se ejercería primero sobre la membrana neuronal, pero que no se manifestaría hasta el momento en el que las sinapsis comenzaran a formarse.

### **El posible papel de los factores tróficos sobre la diferenciación sexual del cerebro**

Los astrocitos, además de regular la formación de sinapsis mediante el recubrimiento físico de la membrana neuronal, también liberan una serie de factores que pueden modular el crecimiento axonal y dendrítico y la diferenciación neuronal. Hay que destacar que las neuronas y las células gliales producen, además de los neurotransmisores y neuromoduladores clásicos, una serie de reguladores paracrinos que pueden afectar la diferenciación, el desarrollo y la función de las células vecinas. Muchas de estas moléculas son compartidas por los sistemas nervioso, endocrino e inmune, y pueden estar involucradas en la comunicación entre el cuerpo y el cerebro. Un ejemplo de tales moléculas es el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I), una citoquina que tiene potentes efectos tróficos sobre las neuronas y la glía en desarrollo y que actúa como neuromodulador en el cerebro adulto. La síntesis de

IGF-I por las neuronas y la glía presenta una regulación asociada al desarrollo y muestra diferencias específicas entre distintas áreas cerebrales. Además, el hígado y otros tejidos producen IGF-I y lo liberan a la circulación general para actuar como una señal hormonal que, entre otras funciones, está involucrada en la regulación neuroendocrina a nivel hipotalámico. El IGF-I participa en la regulación por retroalimentación de la secreción de la hormona de crecimiento, uno de los factores más importantes que controlan el crecimiento y el desarrollo en el animal postnatal. Además, el IGF-I también regula la secreción del LHRH y, por tanto, la liberación de las gonadotropinas. Las acciones biológicas del IGF-I están mediadas por su receptor y reguladas por proteínas transportadoras (IGFBPs).

Actualmente se está investigando la posibilidad de que las acciones de las hormonas sexuales sobre las neuronas sean mediadas en parte por factores tróficos de tipo peptídico tales como el IGF-I. Otros factores que están siendo estudiados en este sentido son el factor de crecimiento nervioso (NGF), el primer factor con actividad neurotrófica descubierto y el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), un factor que induce proliferación de varios tipos celulares en cultivo.

Existen evidencias de que tanto el IGF-I como el TGF- $\alpha$  pueden participar activamente en el inicio de la pubertad (7, 19). Recientemente se ha localizado inmunoreactividad para IGF-I y TGF- $\alpha$  en los astrocitos y un tipo especial de astrogliá presente en el núcleo arcuato y la eminencia media: los tanicitos (7, 19). Estas células de forma alargada contactan por un lado con el tercer ventrículo y emiten una larga prolongación que llega hasta la superficie cerebral. La inmunoreactividad para IGF-I en los tanicitos y astrocitos del núcleo arcuato de la rata aumenta de una forma abrupta con el inicio de la pubertad, existiendo a partir de este momento una marcada diferencia sexual en los niveles de inmunoreactividad, siendo superior en los machos. Esta diferencia sexual es dependiente de los niveles perinatales de testosterona, ya que la administración de testosterona a ratas hembra recién nacidas tiene como resultado que los niveles de inmunoreactividad para IGF-I en la astrogliá alcanzan con el inicio de la pubertad niveles similares a los machos.

En las ratas hembras se ha comprobado que la inmunoreactividad para IGF-I en la astrogliá del núcleo arcuato aumenta de la mañana a la tarde del primer proestro. A partir de este momento, los niveles de inmunoreactividad para IGF-I en la astrogliá se encuentran modulados por las secreciones ováricas, fluctuando durante el ciclo estral. El estradiol aumenta los niveles de IGF-I inmunoreactivo, y la progesterona, cuando se administra junto con el estradiol, inhibe el efecto de esta hormona sobre el IGF-I inmunoreactivo (7). Variaciones similares durante el inicio de la pubertad se han detectado en los niveles de TGF- $\alpha$  en la astrogliá del núcleo arcuato (19).

Se desconoce por el momento cuál puede ser el papel del IGF-I y el TGF- $\alpha$  en el proceso de iniciación de la pubertad. Sin embargo, recientes experimentos realizados en nuestro laboratorio sugieren que parte de los efectos del estradiol sobre la supervivencia y diferenciación de las neuronas hipotalámicas pueden estar mediados por IGF-I. Además el IGF-I es un modulador de la neurotransmisión gabaérgica, la cual se encuentra implicada en los mecanismos de regulación de la secreción de GnRH. Por tanto, es posible que la liberación de estos factores por la astrogliá pueda afectar la conectividad y función de las neuronas del núcleo arcuato. Por otra parte, estudios en cultivos de hipotálamo de rata en los que se inhibía la expresión del receptor de estradiol mediante la utilización de oligonucleótidos antisentido o se bloqueaba la función

del receptor de estradiol mediante la utilización de antagonistas específicos han demostrado que la acción trófica del IGF-I sobre las neuronas del hipotálamo necesita la presencia del receptor de estradiol. Esto sugiere que, tal y como se ha descrito en otros tipos celulares, los factores tróficos de naturaleza peptídica, cuyos receptores se encuentran a nivel de la membrana celular, pueden activar los receptores de las hormonas sexuales que, como ya se ha indicado al principio de este capítulo, son factores de transcripción que actúan en el núcleo celular modulando la expresión de diferentes genes. Esta interacción entre las vías de señalización intracelular de los factores tróficos de tipo proteico y las vías de señalización intracelular de los esteroides sexuales abren nuevas vías de estudio para investigar los mecanismos de diferenciación sexual del cerebro que deben ser explorados en el futuro.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Arnold AP, Breedlove SM. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Hormone Behav* 1985; 19: 469-498.
- (2) Chowen JA, Torres-Aleman I, García-Segura LM. Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 895-901.
- (3) Chowen JA, Argente J, González-Parra S *et al.* Sexual dimorphism and testosterone-dependent regulation of somatostatin gene expression in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Endocrinology* 1993; 125: 357-362.
- (4) Chowen JA, Busiguina S, García-Segura LM. Sexual dimorphism and sex steroid modulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA and immunoreactivity levels in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 1995; 69: 519-532.
- (5) Díaz H, Lorenzo A, Carrer HF *et al.* Time lapse study of neurite growth in hypothalamic dissociated neurons in culture: sex differences and estrogen effects. *J Neurosci Res* 1992; 33: 266-281.
- (6) Doherty P, Walsh FS. Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4: 49-54.
- (7) Dueñas M, Luquín S, Chowen JA *et al.* Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I-like immunoreactivity in hypothalamic astroglia of developing and adult rats. *Neuroendocrinology* 1994; 59: 528-538.
- (8) Ferreira A, Cáceres A. Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of tau and stable microtubules. *J Neurosci* 1991; 11: 392-400.
- (9) García-Segura LM, Perrelet A. Postsynaptic membrane domains in the molecular layer of the cerebellum: a correlation between presynaptic inputs and postsynaptic plasma membrane organization. *Brain Res* 1981; 321: 255-266.
- (10) García-Segura LM, Baetens D, Naftolin F. Sex differences and maturational changes in arcuate nucleus neuronal plasma membrane organization. *Dev Brain Res* 1985; 19: 146-149.
- (11) García-Segura LM, Baetens D, Naftolin F. Synaptic remodelling in arcuate nucleus after injection of estradiol valerate in adult female rats. *Brain Res* 1986; 366: 131-136.
- (12) García-Segura LM, Cañas B, Párducz A *et al.* Estradiol promotion of changes in the morphology of astroglia growing in culture depends on the expression of polysialic acid on neural membranes. *Glia* 1995; 13: 209-216.
- (13) García-Segura LM, Chowen JA, Párducz A *et al.* Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 1994; 44: 279-307.
- (14) García-Segura LM, Luquín S, Párducz A *et al.* Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 1994; 10: 59-69.

- (15) García-Segura LM, Pérez J, Tranque PA *et al.* Sex differences in plasma membrane concanavalin A binding in the rat arcuate neurons. *Brain Res Bull* 1989; 22: 651-655.
- (16) García-Segura LM, Torres-Alemán I, Naftolin F. Astrocytic shape and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity are modified by estradiol in primary rat hypothalamic cultures. *Dev Brain Res* 1989; 47: 298-302.
- (17) Greenough WT, Carter CS, Steerman C *et al.* Sex differences in dendritic patterns in hamster preoptic area. *Brain Res* 1977; 126: 63-72.
- (18) Guillamon A, Segovia S, Del Abril A. Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Dev Brain Res* 1988; 44: 281-290.
- (19) Ma YJ, Junier MP, Costa ME. Transforming growth factor- $\alpha$  gene expression in the hypothalamus is developmentally regulated and linked to sexual maturation. *Neuron* 1992; 2: 657-670.
- (20) MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211: 1294-1303.
- (21) Matsumoto A. Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain. *Psychoneuroendocrinology* 1991; 16: 25-40.
- (22) Matsumoto A, Arai Y. Effect of androgen on sexual differentiation of synaptic organization in the hypothalamic arcuate nucleus: an ontogenic study. *Neuroendocrinology* 1981; 33: 238-242.
- (23) Olmos G, Naftolin F, Pérez J *et al.* Synaptic remodelling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* 1993; 32: 663-667.
- (24) Párducz A, Pérez J, García-Segura LM. Estradiol induces plasticity of GABAergic synapses in the hypothalamus. *Neuroscience* 1993; 53: 395-401.
- (25) Pérez J, Luquín S, Naftolin F *et al.* The role of estradiol and progesterone in phased synaptic remodelling of the rat arcuate nucleus. *Brain Res* 1993; 608: 38-44.
- (26) Pérez J, Naftolin F, García-Segura LM. Sexual differentiation of synaptic connectivity and neuronal plasma membrane in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res* 1990; 527: 116-122.
- (27) Raisman G, Field PM. Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res* 1973; 54: 1-29.
- (28) Theodosis DT, Poulain DA. Activity-dependent neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 1993; 57: 501-533.
- (29) Toran-Allerand CD. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res* 1976; 106: 407-412.
- (30) Toran-Allerand CD, Hashimoto K, Greenough WT *et al.* Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus in vitro. III. Effects of estrogen on dendritic differentiation. *Dev Brain Res* 1983; 7: 97-101.
- (31) Torres-Alemán I, Rejas MT, Pons S *et al.* Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acidic protein redistribution in hypothalamic astrocytes in vitro: a neuronal mediated effect. *Glia* 1992; 6: 180-187.