

Figura 26 Ensayo de doble inmunofluorescencia para REA/NeuN en hipotálamo de rata hembra adulta. La mezcla de las imágenes pone en evidencia que la expresión de la proteína de REA está restringida al citoplasma de neuronas maduras (**recuadro, flechas blancas**). Barra de escala, 50 μ m.

4.3- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre los mecanismos hipotalámicos que controlan el ciclo estral y el pico preovulatorio de LH

4.3.1- Estudio de los patrones de ciclado de ratas adultas expuestas neonatalmente a una dosis baja de BPA

Mediante el estudio de la citología vaginal se observaron patrones de ciclicidad estral anormales en los animales pertenecientes al grupo BPA.05. En comparación con las hembras control, las hembras expuestas a BPA.05 pasaron más tiempo del ciclo en las etapas de estro-proestro ($P < 0,05$; Fig.27).

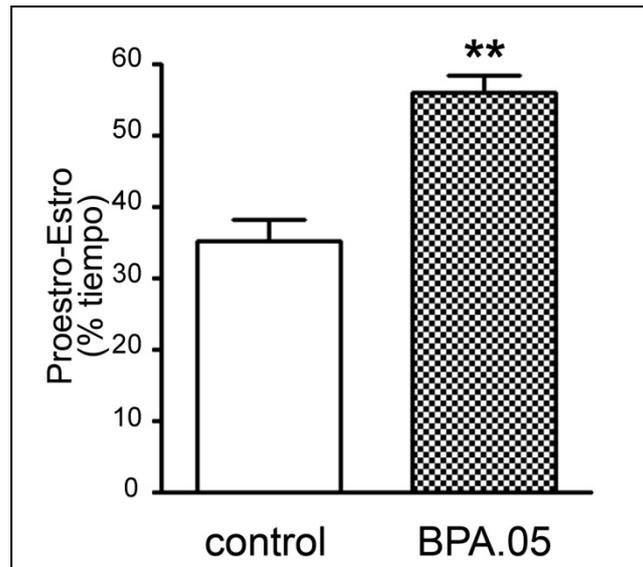


Figura 27 Patrones de ciclicidad estral en hembras neonatalmente expuestas a BPA.05. Las etapas del ciclo estral fueron determinadas mediante exámenes diarios de la citología vaginal. Cada columna representa la media \pm E.E.M. de veinte animales por grupo experimental (**, $P < 0,01$ vs. hembras control).

4.3.2- Horario de inducción del pico de LH y patrones temporales del procesado del pre-ARNm de LHRH (estudio piloto)

Para verificar la efectividad del modelo de inducción estrógeno-dependiente del pico de LH, hembras control fueron OVX en DPN85 y, a las 09:00-10:00 h (Día 0) del DPN100 se les colocó implantes conteniendo 17β -estradiol. Muestras de sangre troncal y tejido hipotalámico fueron tomadas a las 08:00 h y a las 16:00 h del Día 2. A las 16:00 h se observó un aumento significativo en los niveles séricos de LH ($P < 0,001$; Fig.28A) en comparación con las 08:00 h. Además, el procesado del pre-ARNm de LHRH demostró ser dependiente del horario. Utilizando PCR en tiempo real observamos que, comparado con lo observado a las 08:00 h, a las 16:00 h los niveles del ARNm de LHRH maduro fueron significativamente mayores ($P < 0,05$; Fig.28C) mientras que por el contrario, en los niveles del ARN de LHRH que aún conservan el intrón A se observó una marcada disminución ($P < 0,01$; Fig.28D).

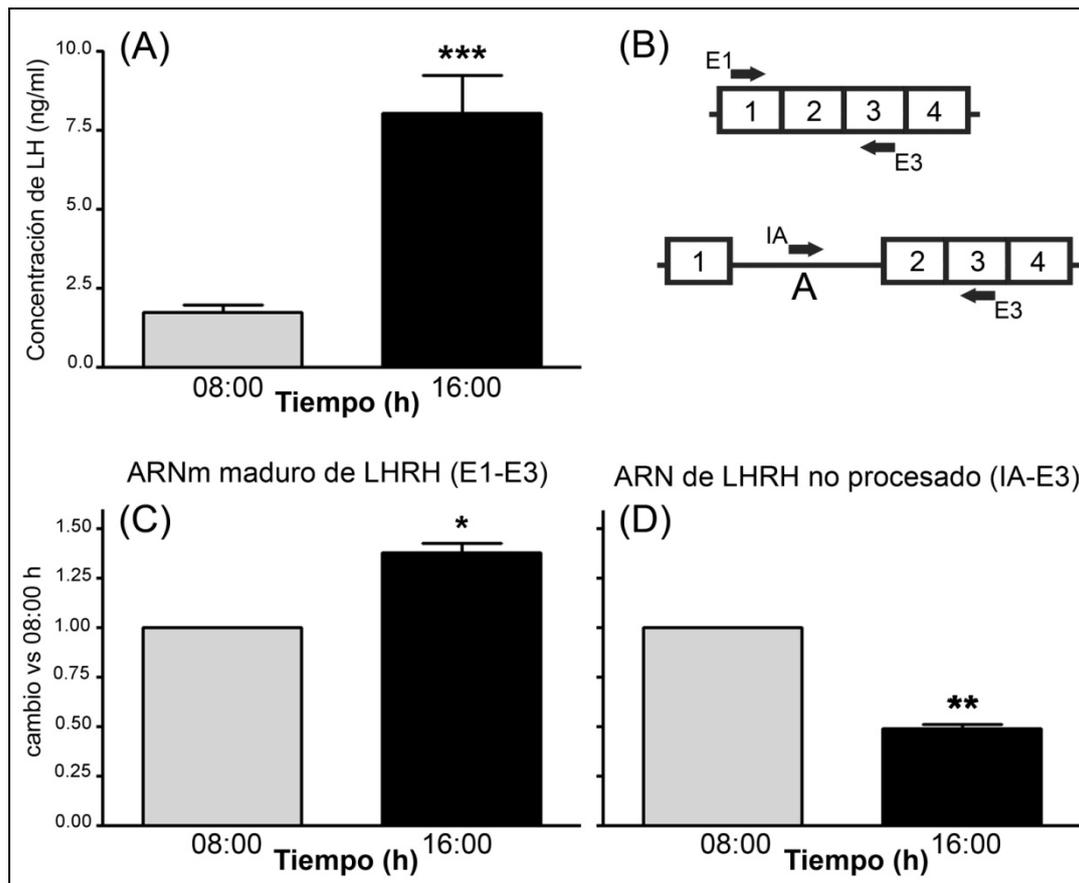


Figura 28 Horario de inducción del pico de LH y patrones temporales del procesado del pre-ARNm de LHRH. **(A)** Las muestras fueron obtenidas a las 08:00 h y 16:00 h del Día 2 (ver *Materiales y Métodos*) para chequear la efectividad del modelo estrogénico utilizado para inducir el pico de LH. **(B)** Para evaluar el procesado del pre-ARNm de LHRH, se diseñaron cebadores específicos para amplificar el ARNm maduro de LHRH (cebadores E1-E3) y el ARN de LHRH no procesado conteniendo el intrón A (cebadores IA-E3). Para estudiar los patrones temporales de la expresión citoplasmática de los ARNs de LHRH maduro **(C)** y sin procesar **(D)** se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) y se muestran como la media \pm E.E.M. de seis animales por horario estudiado (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. hembras control).

4.3.3- La exposición neonatal a BPA altera el procesado hipotalámico del pre-ARNm de LHRH en hembras adultas

Trabajos previos han demostrado que la retención del intrón A en el pre-ARNm de LHRH bloquea la traducción de secuencias corriente abajo (Son y col., 2003), resultando en una ineficiente producción de LHRH. Debido a que este mecanismo está regulado mediante vías estrogénicas decidimos estudiar los efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión relativa del ARNm maduro de LHRH y el ARN-no procesado de LHRH que aún conserva el intrón

A en ratas hembras adultas sometidas a un modelo de estimulación estrogénica. Mediante PCR en tiempo real pudimos observar que la exposición neonatal a BPA genera efectos opuestos, dosis-dependiente, sobre la expresión del ARNm maduro de LHRH en la etapa adulta.

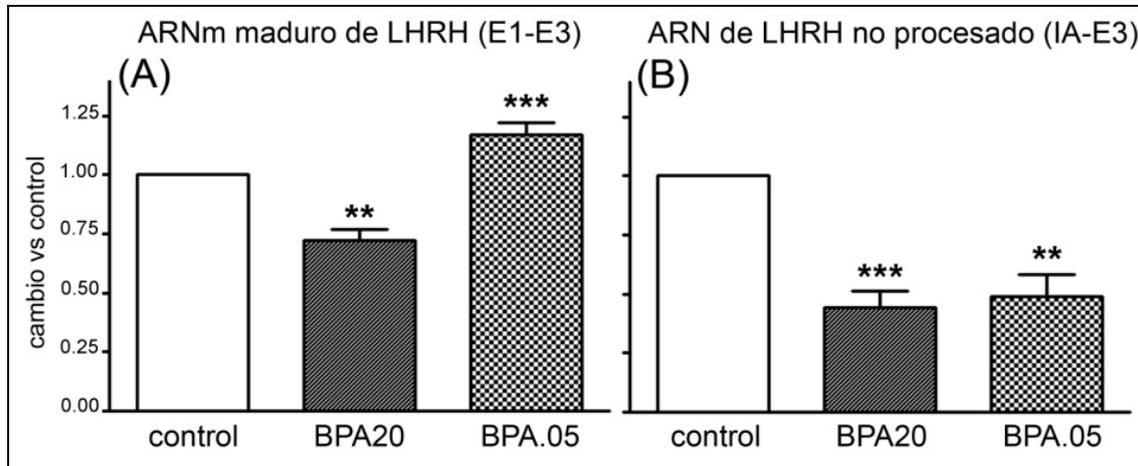


Figura 29 Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión citoplasmática del ARNm maduro de LHRH (A) y el ARN de LHRH sin procesar conteniendo el intrón A (B). La expresión relativa del ARN citoplasmático se cuantificó mediante RT-PCR en tiempo real y el cambio en los niveles de expresión se calculó mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. de cinco animales por grupo experimental (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. hembras control).

En las ratas tratadas con BPA20 los niveles del ARNm maduro de LHRH fueron menores comparados con los controles ($P < 0,01$; Fig.29A), mientras que en hembras tratadas con BPA.05 los niveles del ARNm maduro de LHRH fueron significativamente mayores ($P < 0,001$). Por el contrario, los niveles del ARN de LHRH que aún conserva el intrón A disminuyeron aproximadamente a la mitad en ambos grupos expuestos a BPA ($P < 0,01$; Fig.29B).

4.3.4- La exposición neonatal a BPA altera la expresión de ER α y PR en los núcleos AvPv y Arc

La estimulación estrogénica de los picos de LH y LHRH requiere como paso obligatorio la activación de los receptores ER α y PR en el hipotálamo (Wintermantel y col., 2006; Chappell y Levine, 2000). Utilizando la técnica de inmunohistoquímica, en esta etapa de la tesis estudiamos la expresión de dichos receptores de esteroides en neuronas de los núcleos AvPv y Arc.

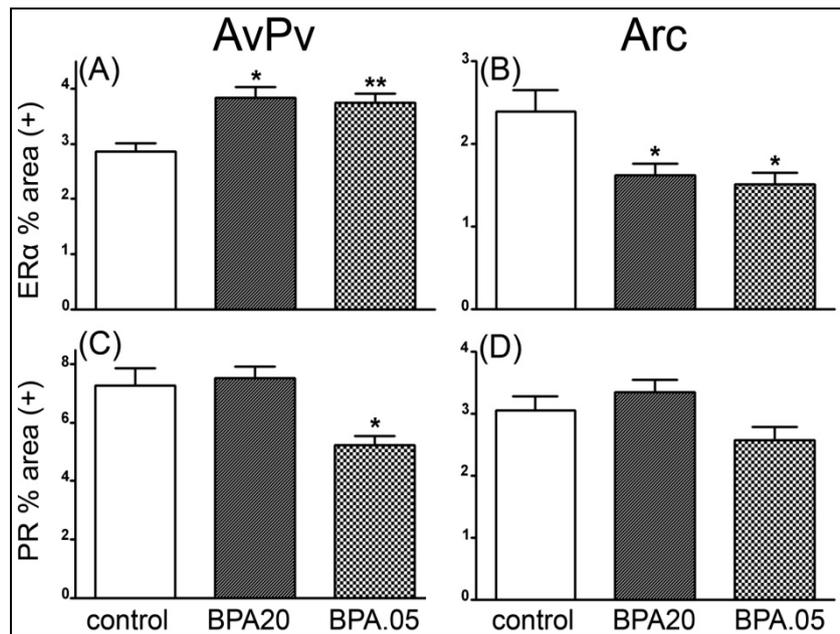


Figura 30 Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de ER α (A, B) y PR (C, D) en los núcleos hipotálamicos AvPv (A, C) y Arc (B, D) de hembras adultas. Los núcleos AvPv y Arc fueron delimitados de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Los datos se expresan como el área relativa del núcleo ocupada por las células positivas (%área (+)), y cada columna representa la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo experimental (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. hembras control).

Nuestros resultados muestran que en el AvPv, la expresión de ER α aumentó tanto en el grupo BPA20 ($P < 0,05$) como en BPA.05 ($P < 0,01$; Fig.30A). En contraste, la expresión de ER α en el Arc disminuyó en las hembras expuestas a BPA20 y BPA.05 ($P < 0,05$; Fig.30B). Por otro lado, la expresión de la proteína de PR disminuyó en el AvPv de las hembras tratadas con BPA.05 ($P < 0,05$; Fig.30C) pero no fue afectada en el Arc de los animales expuestos a BPA (Fig.30D).

4.3.5- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de los cofactores de transcripción SRC-1 y REA en los núcleos AvPv y Arc de hembras adultas

La respuesta estrogénica incluye muchos pasos, todos susceptibles de ser alterados por perturbación endocrina. Un punto muy interesante de estudiar en la cascada de eventos de la respuesta estrogénica es la expresión de factores de transcripción específicos. Para alcanzar este objetivo, se seleccionó a SRC-

1 y REA como representantes de las familias de coactivadores y represores, respectivamente, y se evaluó su expresión en neuronas hipotalámicas mediante el uso de inmunohistoquímica.

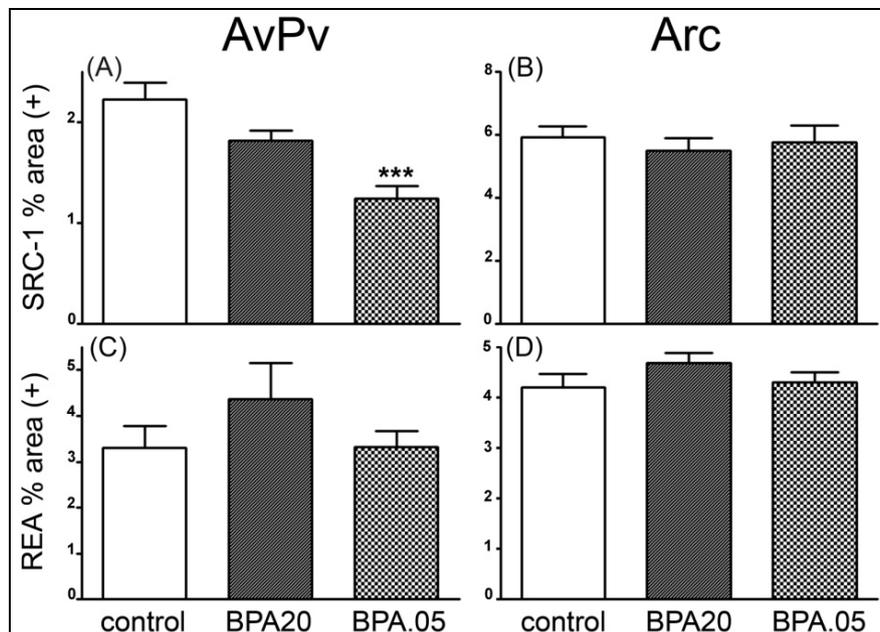


Figura 31 Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de los cofactores de transcripción SRC-1 (A, B) y REA (C, D) en los núcleos hipotalámicos AvPv (A, C) y Arc (B, D) de hembras adultas. Los núcleos AvPv y Arc fueron delimitados de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Los datos se expresan como el área relativa del núcleo ocupada por las células positivas (%área (+)), y cada columna representa la media \pm E.E.M. de seis animales por grupo experimental (***, $P < 0,001$ vs. hembras control).

En el núcleo AvPv, la expresión de SRC-1 en las hembras expuestas a la dosis baja de BPA disminuyó casi a la mitad ($P < 0,001$; Fig.31A) de lo observado en los controles, pero en las hembras expuestas a la dosis alta la expresión de SRC-1 se mantuvo igual a los controles. Por otro lado, la expresión de REA no mostró cambios en los grupos tratados con BPA comparados con los controles (Fig.31C). En el núcleo Arc, la expresión de SRC-1 y REA fue similar a los controles en ambos grupos expuestos a BPA (Fig.31B, D). Los cambios observados en la expresión de ER α , PR y SRC-1 en el AvPv y el Arc de las hembras expuestas a BPA se ilustran en las Figuras 32 y 33 respectivamente.

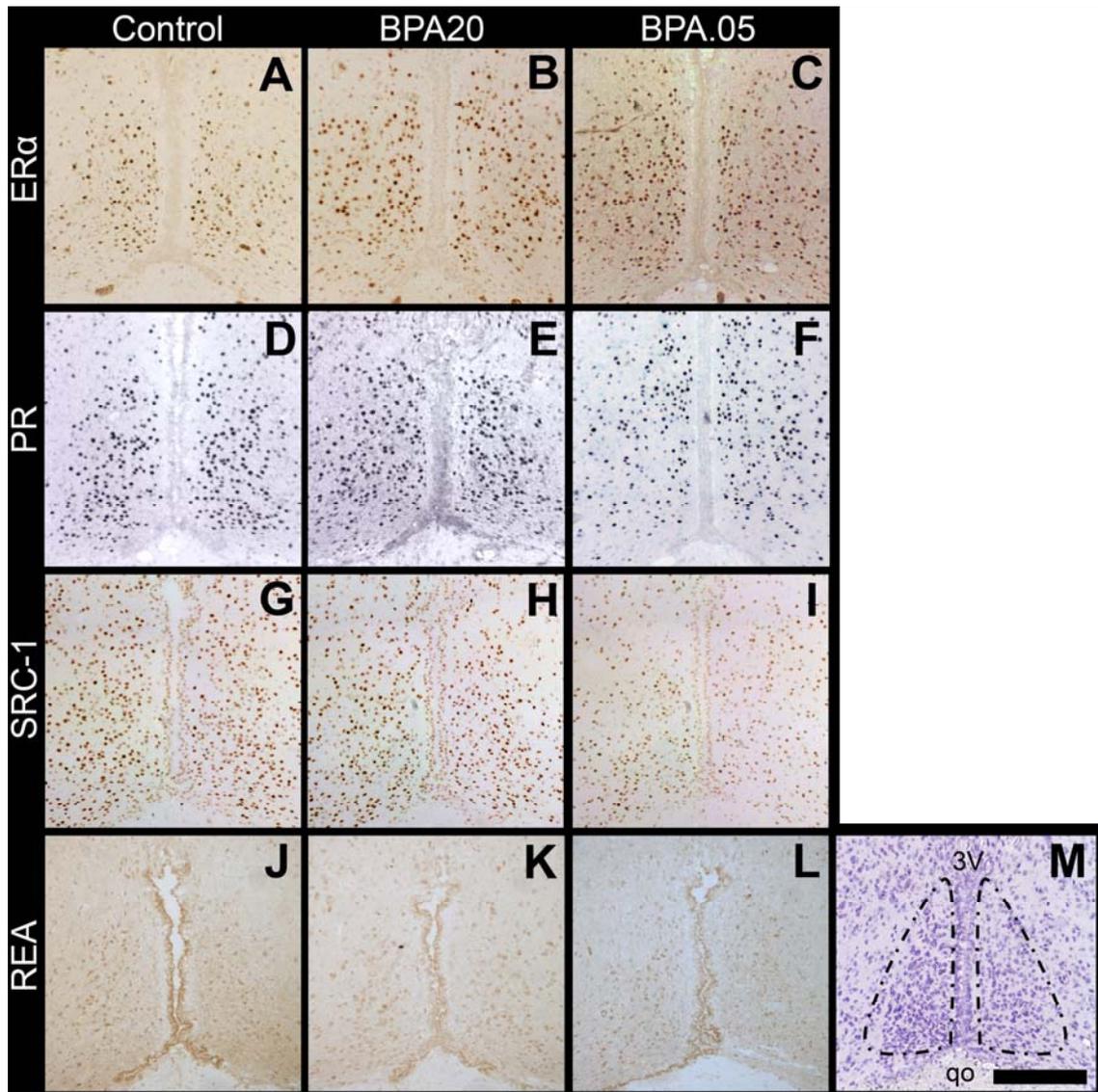


Figura 32 Fotomicrografías representativas de la detección mediante inmunohistoquímica de ER α (A, B, C), PR (D, E, F), SRC-1 (G, H, I) y REA (J, K, L) en el núcleo AvPv de ratas hembra control (A, D, G, J), BPA20 (B, E, H, K) y BPA.05 (C, F, I, L). El AvPv fue identificado mediante la tinción de Nissl de un corte por serie (M, *línea de puntos*) y delimitado de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). 3V, tercer ventrículo; qo, quiasma óptico. Barra de escala, 200 μ m.

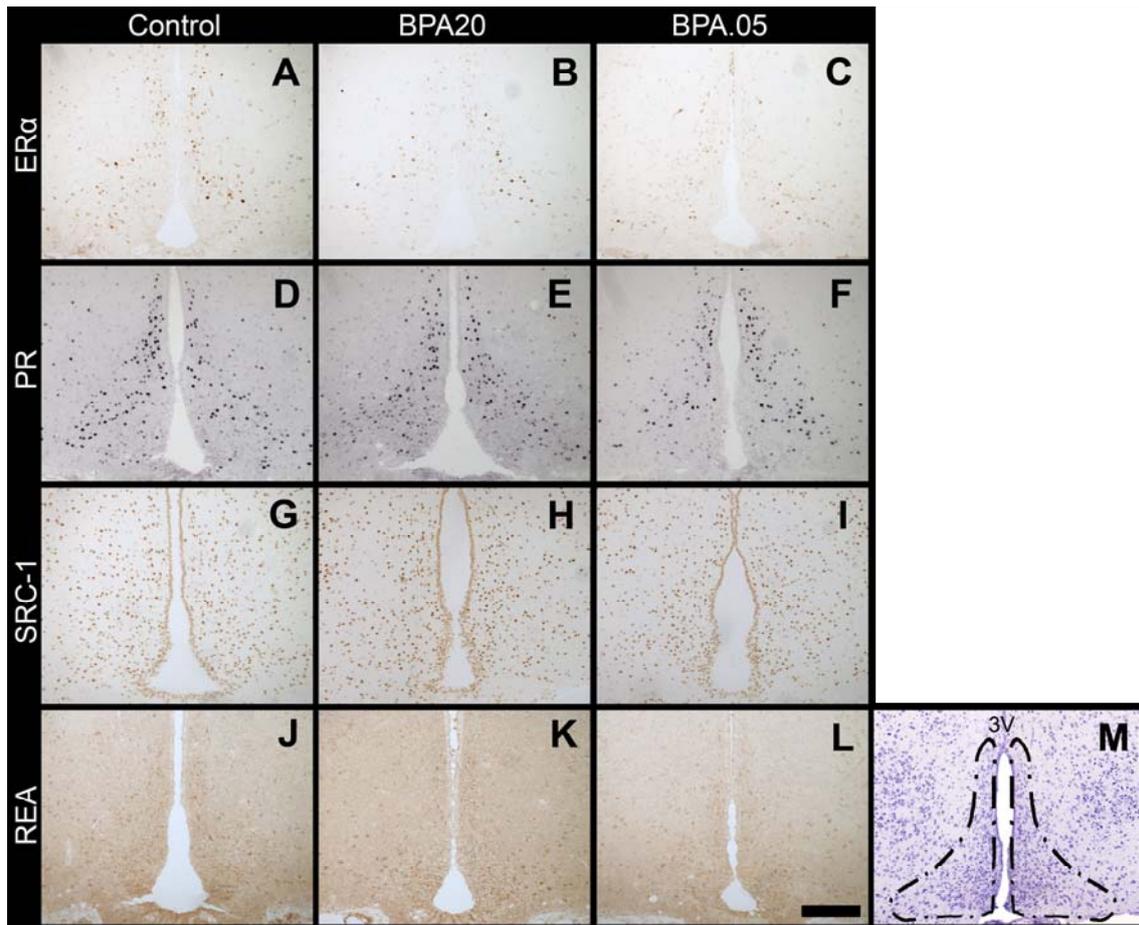


Figura 33 Fotomicrografías representativas de la detección mediante inmunohistoquímica de ER α (A, B, C), PR (D, E, F), SRC-1 (G, H, I) y REA (J, K, L) en el núcleo Arc de ratas hembra control (A, D, G, J), BPA20 (B, E, H, K) y BPA.05 (C, F, I, L). El Arc fue identificado mediante la tinción de Nissl de un corte por serie (M, *línea de puntos*) y delimitado de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). 3V, tercer ventrículo. Barra de escala, 200 μ m.

4.3.6- Inducción estrogénica del pico de LH en ratas neonatalmente expuestas a BPA

Utilizando el modelo de inducción estrogénica del pico de LH mediante implantes, observamos que en las hembras expuestas a la dosis baja de BPA se observó un pico de LH similar al observado en las hembras control (Fig.34). Por el contrario, en las hembras del grupo BPA20 no se observó el aumento esperado de LH, siendo los niveles de LH menores a los controles ($P < 0,05$; Fig.34).

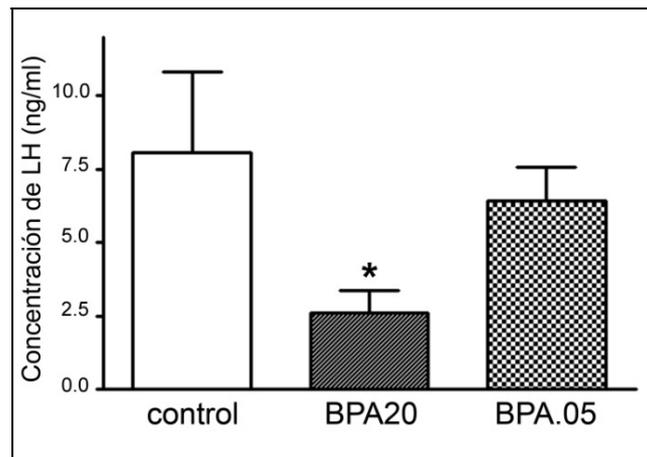


Figura 34 Inducción estrogénica mediante implantes del pico vespertino de LH en ratas adultas OVX neonatalmente expuestas a BPA. Cada valor representa la media \pm E.E.M. de al menos nueve animales por grupo experimental (*, $P < 0,05$ vs. hembras control).

4.4- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre mecanismos hipotalámicos estrógeno-dependientes encargados de controlar la conducta sexual

4.4.1- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de ER α y PR en los núcleos MPN y VMHvl

Nuestros resultados demuestran que en el MPN, la expresión de ER α disminuyó casi a la mitad en los grupos BPA20 ($P < 0,01$; Fig.35A) y BPA.05 ($P < 0,05$) en comparación con los controles. Del mismo modo, la expresión de ER α en el VMHvl disminuyó significativamente en las hembras expuestas a BPA20 ($P < 0,05$; Fig.35B) y BPA.05 ($P < 0,01$). Por otro lado, la expresión de PR en el núcleo MPN no fue afectada por la exposición neonatal a BPA en ninguno de los dos grupos de estudio (Fig.35C), pero fue significativamente menor en el VMHvl de las hembras expuestas a BPA.05 ($P < 0,05$; Fig.35D).

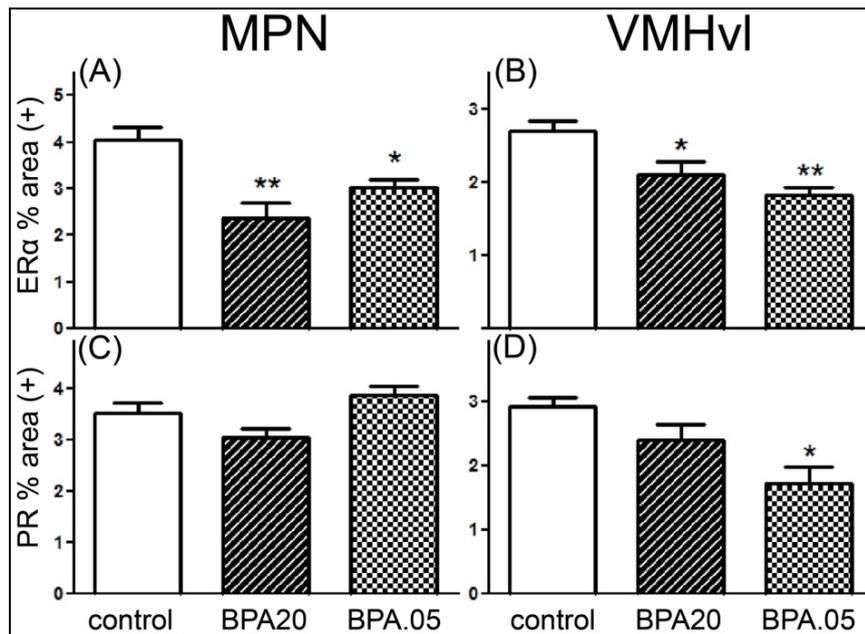


Figura 35 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión de ERα (**A**, **B**) y PR (**C**, **D**) en los núcleos MPN (**A**, **C**) y VMHvl (**B**, **D**) de ratas hembra adultas. Los núcleos MPN y VMHvl fueron demarcados de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Los datos se expresan como el área relativa ocupada por las células positivas (% área(+)), y cada columna representa la media \pm E.E.M. de cuatro a seis secciones semi-seriales por animal y seis animales por grupo (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. hembras control).

4.4.2- Isoformas de PR presentes en el hipotálamo de hembras expuestas a BPA

Debido a que el correcto funcionamiento de los mecanismos que controlan la conducta sexual es producto no sólo del contenido total de PR en las neuronas, sino también de la presencia/ausencia de sus isoformas, utilizamos western blot para determinar los efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la presencia/ausencia de las isoformas hipotalámicas PR-A y PR-B. Nuestro análisis reveló la presencia de bandas específicas correspondientes a los pesos moleculares de PR-A y PR-B en todos los grupos experimentales (Fig.36).

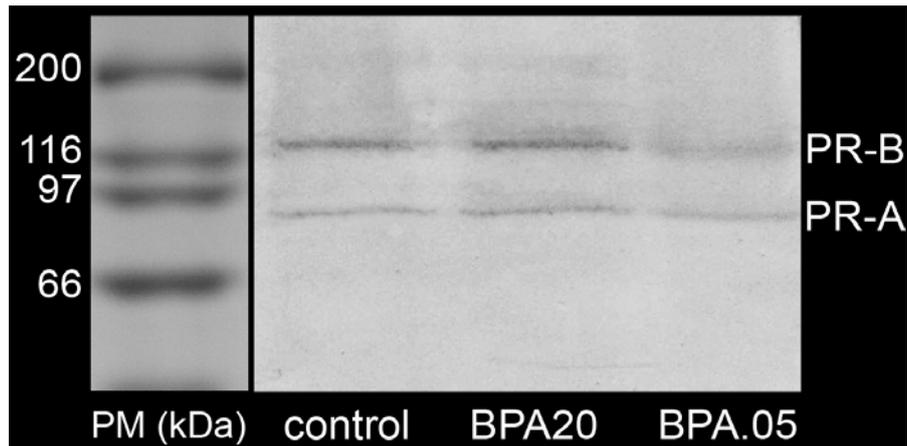


Figura 36 Fotografía representativa del análisis mediante western blot de la expresión hipotalámica de las isoformas de PR en los animales experimentales. Los marcadores de peso molecular se tiñeron con Rojo Ponceau y luego se recortaron de la membrana.

4.4.3- Efectos de la exposición neonatal a BPA sobre la expresión de los factores de transcripción SRC-1 y REA en los núcleos MPN y VMHvl

En el MPN, la expresión de SRC-1 aumentó significativamente en las hembras tratadas con la dosis baja de BPA ($P < 0,05$; Fig.37A), pero no se observaron cambios en las hembras expuestas a la dosis alta de BPA.

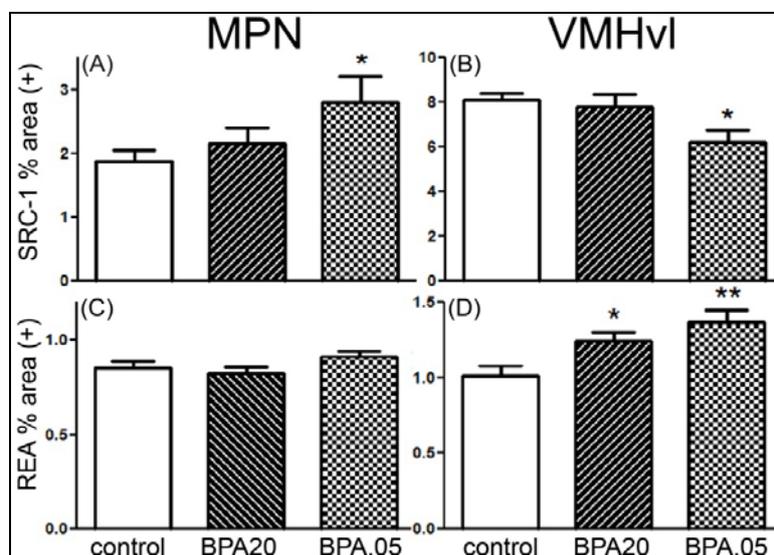


Figura 37 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la expresión de los cofactores de transcripción SRC-1 (A, B) y REA (C, D) en los núcleos MPN (A, C) y VMHvl (B, D) de ratas hembra adultas. Los núcleos MPN y VMHvl fueron demarcados de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). Los datos se expresan como el área relativa ocupada por las células positivas (% área(+)), y cada columna representa la media \pm E.E.M. de cuatro a seis secciones semi-seriales por animal y seis animales por grupo (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. hembras control).

En tanto, la expresión de REA fue similar a los controles en ambos grupos expuestos a BPA. En el VMHvl, la expresión de SRC-1 disminuyó en las hembras del grupo BPA.05 ($P < 0,05$; Fig.37B), pero no en las hembras del grupo BPA20. Por otro lado, observamos un aumento significativo en la expresión de REA en BPA20 ($P < 0,05$, Fig.37D) y BPA.05 ($P < 0,01$) en comparación a los controles. Los cambios observados en la expresión de ER α , PR, SRC-1 y REA en el VMHvl de las hembras expuestas a BPA se ilustra en la Figura 38.

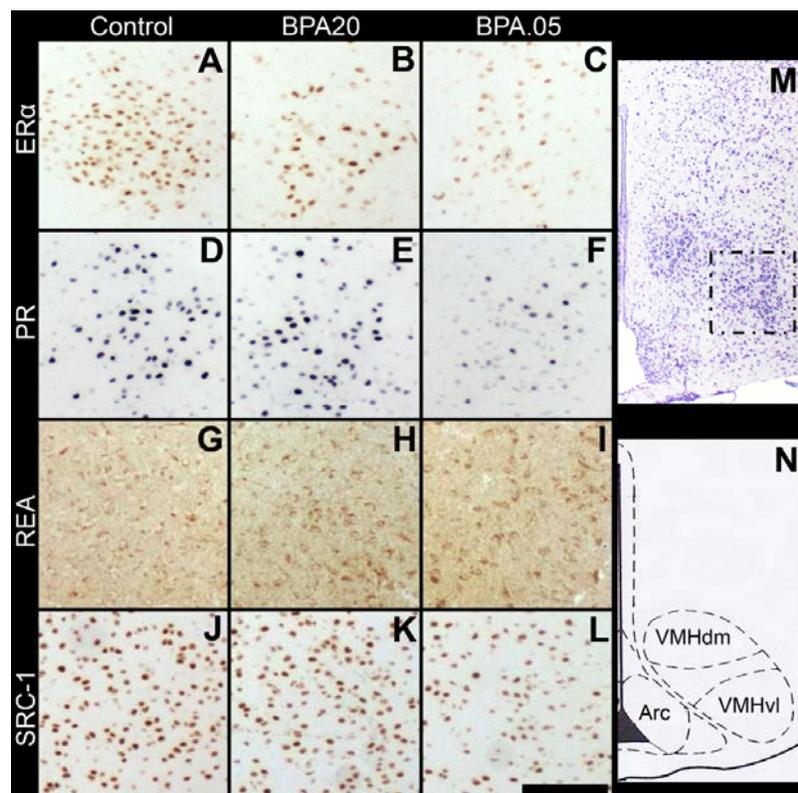


Figura 38 Fotomicrografías representativas de la detección mediante inmunohistoquímica de ER α (A, B, C), PR (D, E, F), REA (G, H, I) y SRC-1 (J, K, L) en el núcleo VMHvl de ratas hembra control (A, D, G, J), BPA20 (B, E, H, K) y BPA.05 (C, F, I, L). El VMHvl fue identificado mediante la tinción de Nissl de un corte por serie (M, **recuadro en línea de puntos**) y delimitado de acuerdo a lo descrito por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005) (N). Arc, núcleo arcuato; VMHdm, núcleo ventromedial hipotalámico región dorsomedial; VMHvl, núcleo ventromedial hipotalámico región ventrolateral. Barra de escala, 100 μ m.

4.4.4- Estudio de la conducta sexual en hembras expuestas neonatalmente a BPA

Para determinar si las alteraciones producidas por la exposición neonatal a BPA en el MPN y VMHvl de hembras adultas son extensivas al

comportamiento, evaluamos la conducta receptiva y proceptiva de las hembras expuestas a BPA utilizando un modelo de inducción de la conducta sexual. Para esto, las hembras expuestas neonatalmente a BPA fueron OVX en DPN85 y dos semanas luego fueron inyectadas por vía subcutánea con una combinación de estrógeno y progesterona.

Todas las hembras exhibieron conducta receptiva altamente positiva, presentando el reflejo de lordosis en respuesta al estímulo de monta del macho luego del tratamiento hormonal. Las respuestas de lordosis de las hembras de los grupos BPA20 y BPA.05 fueron similares a las observadas en las hembras control, tanto en número (CL, Fig.39A) como en intensidad (TL, Fig.39B). Las conductas proceptivas tales como el movimiento de orejas, saltos y corridas fueron observadas y cuantificadas en todos los grupos experimentales. El número de movimientos de orejas no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales analizados (Fig.39C), sin embargo el número de saltos y corridas en las hembras BPA20 y BPA.05 disminuyó aproximadamente a la mitad ($P<0,01$; Fig.39D) del número observado en las hembras control. No se observaron diferencias en la actividad locomotriz de las hembras control, BPA20 y BPA.05 a lo largo de las pruebas de conducta (datos no mostrados).

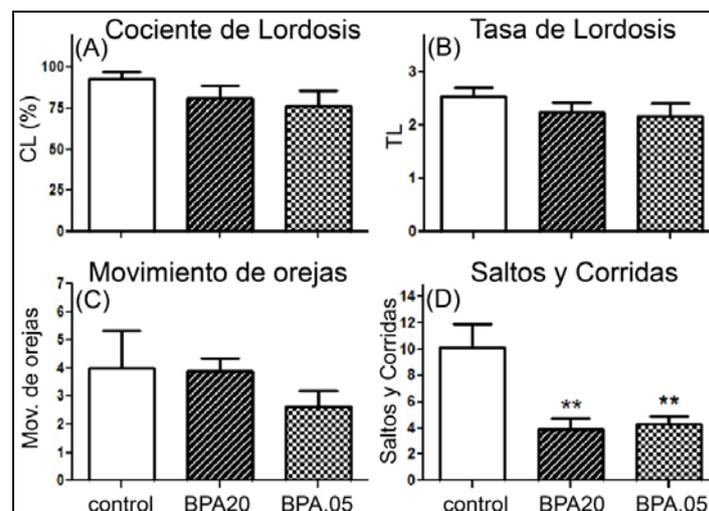


Figura 39 Efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre la conducta sexual. El cociente de lordosis **(A)** y la tasa de lordosis **(B)** fueron cuantificados para evaluar la conducta receptiva. La conducta proceptiva fue cuantificada mediante el número de movimientos de oreja **(C)**, saltos y corridas **(D)**. Cada columna representa la media \pm E.E.M. de cinco animales por grupo (**, $P<0,01$ vs. hembras control).

En la Figura 40 se muestra una secuencia de fotogramas representativos de los parámetros de la conducta sexual evaluados.



Figura 40 Secuencias de fotogramas representativos de los parámetros de conducta sexual evaluados. **(A)** *Conducta receptiva*: en la secuencia se muestra el reflejo de lordosis de la hembra en respuesta a la monta del macho, observándose el arqueado cervical y el desplazamiento de la cola hacia un lado por parte de la hembra. **(B, C)** *Conducta proceptiva*: en la secuencia **(B)** se muestran los saltos evaluados como positivos para la conducta proceptiva. En dichos saltos la hembra se desplaza aproximadamente un cuerpo de distancia. En **(C)** se muestran las corridas realizadas por la hembra para llamar la atención del macho. Dichas corridas constan de desplazamientos rápidos de más de cinco pasos alejándose o pasando frente al macho para luego detenerse abruptamente y dirigir el cuerpo o la cabeza hacia el macho.

4.5- Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo

4.5.1- La exposición neonatal a xenoestrógenos altera la dinámica poblacional de las CPN

4.5.1.1- Proliferación y Apoptosis de las CPN en DPN8

Las células en proliferación fueron detectadas en la capa molecular, el hilus, la ZSG y en la porción interior de la CCG del giro dentado de ratas macho control

y tratados con DES. Estas células se observaron a menudo organizadas en grupos, con núcleos de forma irregular. En el giro dentado de ratas control de DPN8, se observó una mayor cantidad de células BrdU-(+) que en ratas de la misma edad tratadas con DES (Fig.41, A *versus* B). El análisis morfométrico demostró que el tratamiento con DES disminuye la proliferación celular ($P<0,01$; Fig.42A). De acuerdo a lo previamente descrito (Filippov y *col.*, 2003), las CPN están caracterizadas por rasgos morfológicos y por la expresión de la proteína filamentosa nestina. Las células precursoras que expresan nestina se clasifican en dos grandes categorías: CPN tipo-I y tipo-II. Las CPN tipo-I generalmente se localizan en la ZSG y están caracterizadas por una proyección axonal larga (Fig.41C, recuadro C1) que atraviesa la CCG y alcanza la capa molecular del giro dentado. Las CPN tipo-II carecen de estas largas proyecciones y presentan un núcleo redondo u ovoide y un soma con escaso citoplasma (Fig.41C, recuadro C2). Las cortas extensiones citoplasmáticas de estas células tienden a estar orientadas de forma tangencial a la CCG. Utilizando doble IHQ, detectamos que tanto las CPN tipo-I como las tipo-II incorporan BrdU 4 h después de la administración i.p., indicando que ambos tipos celulares están proliferando tanto en los machos controles como en los tratados con DES. En DPN8, la densidad total de CPN BrdU-(+)/nestina-(+) disminuyó significativamente en los animales tratados con DES ($P<0,01$; Fig.41, C *versus* D, Fig.42B) sin embargo, cuando las células BrdU-(+)/nestina-(+) fueron evaluadas identificando cada tipo de CPN, la disminución en la actividad proliferativa fue debida sólo a las CPN tipo-II ($P<0,01$; Fig.42C). En esta misma edad, el número de células picnóticas y TUNEL-(+) en la ZSG de ratas tratadas con DES fue claramente menor ($P<0,01$; Fig.41 E *versus* F, y Fig.42D), sugiriendo un posible efecto anti-apoptótico de la exposición neonatal a xenoestrógenos. En concordancia con lo anteriormente mencionado, se observó un aumento en la expresión de p27^{kip1} en la ZSG de las crías tratadas con DES (Fig.42E).

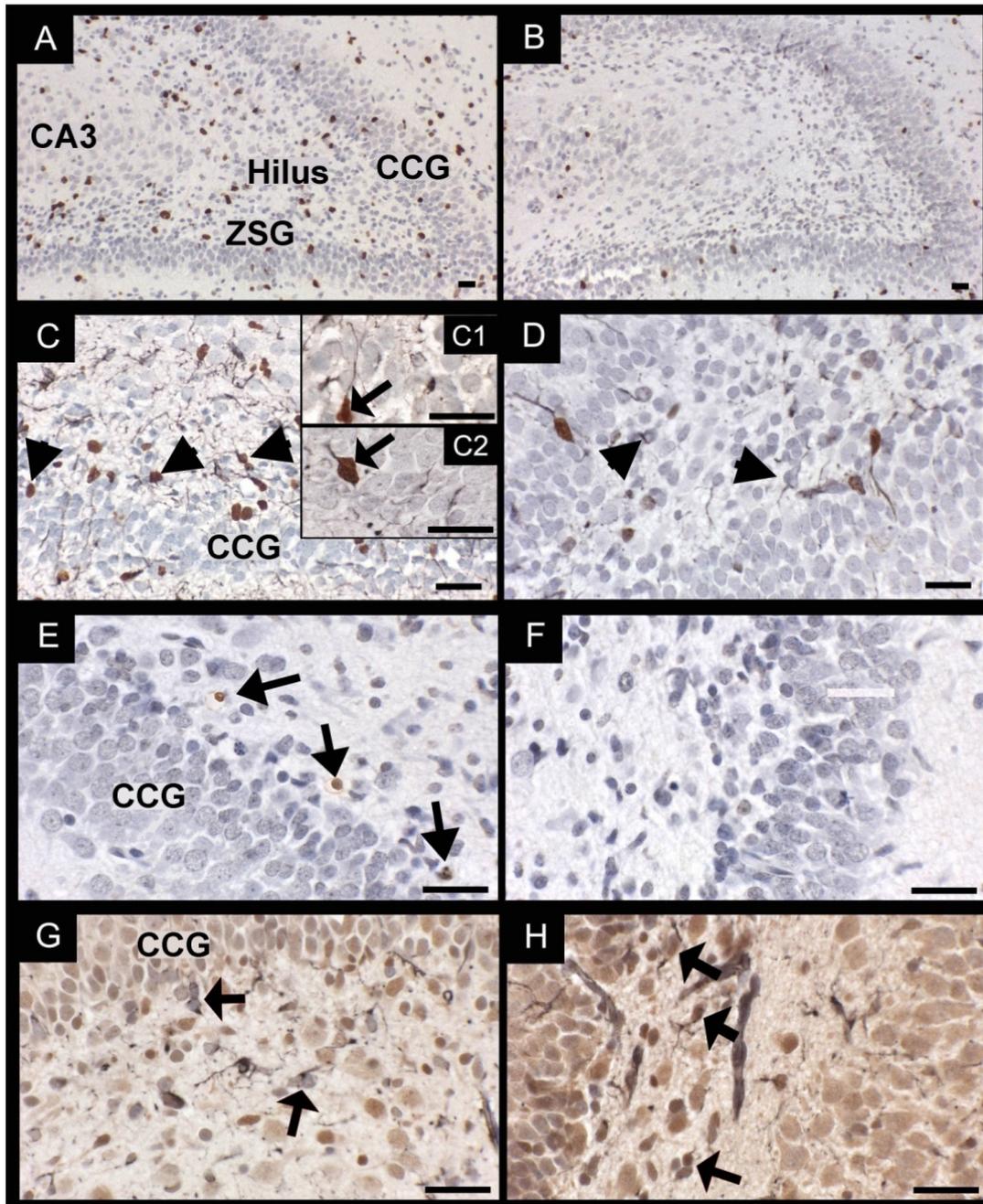


Figura 41 Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la dinámica poblacional de las CPN en crías macho de DPN8. Los animales fueron inyectados desde el DPN1 al DPN7 con vehículo (**A, C, E, G**) o DES (**B, D, F, H**). La proporción de células BrdU-(+) disminuyó en el giro dentado de las ratas macho de DPN8 expuestas a DES (**A vs. B**). Las dos categorías principales de células que expresan nestina fueron morfológicamente caracterizadas en la ZSG: CPNs tipo-I (**recuadro C1, flecha**) y tipo-II (**recuadro C2, flecha**). En los animales expuestos a DES se observó una disminución en el índice de proliferación solamente de las CPN tipo-II (**C vs. D, cabezas de flecha**). Sin embargo, el número de células apoptóticas disminuyó en los animales expuestos a DES (**E vs. F**). La expresión de p27^{kip1} sólo fue detectada en las CPN tipo-II (**G, H, flechas**) y fue mayor en el grupo expuesto a DES (**G vs. H**). CCG, capa de células granulares; ZSG, zona subgranular. *Barra de escala*, 100 μ m.

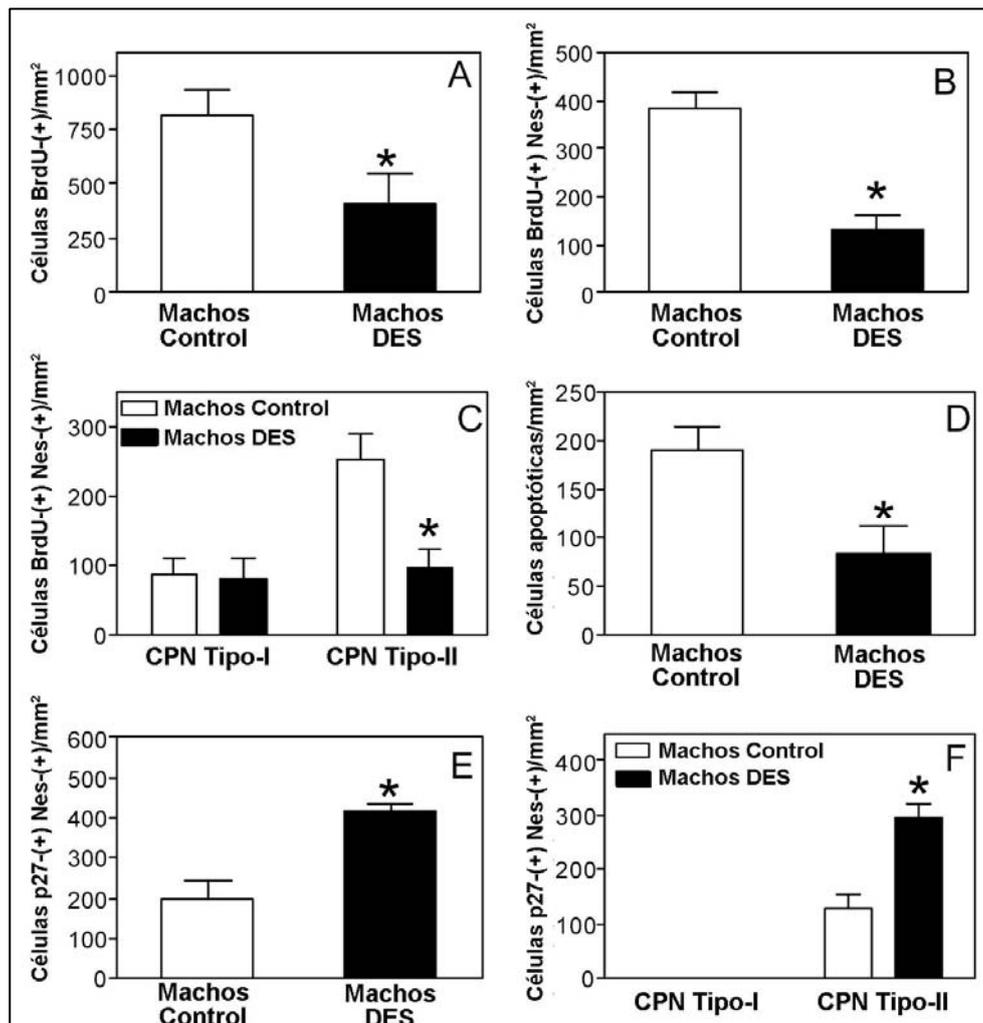


Figura 42 Cuantificación de los resultados obtenidos mediante la técnica de TUNEL y mediante inmunohistoquímica simple y doble en el giro dentado de animales de DPN8. Los resultados se expresan como la densidad espacial de células y cada columna representa la media \pm E.E.M. de al menos cuatro series de cortes por animal ($n = 12$ animales por grupo). **(A)** Células totales proliferando en las ZSG; **(B)** densidad total de proliferación de las CPN; **(C)** índices de proliferación de CPN tipo-I y tipo-II; **(D)** células apoptóticas; **(E)** CPN p27^{kip1}(+) totales; **(F)** densidad de CPN tipo-I y tipo-II p27^{kip1}(+). Barra de escala, 100 μ m.

Mediante el uso de doble inmunohistoquímica, pudimos determinar que tipo de CPN es el que expresa p27^{kip1}, demostrando que sólo las células tipo-II expresan este inhibidor del ciclo celular y que su expresión fue claramente mayor en los animales tratados con DES ($P < 0,01$; Fig.41 G versus H, y Fig.42F).

4.5.1.2- Supervivencia de las CPN en DPN21

Para determinar si el tratamiento neonatal con DES afecta la supervivencia celular, examinamos el número de células BrdU-(+) remanentes en la ZSG y en la CCG dos semanas luego de la inyección con BrdU. En esta edad, la mayoría de las células marcadas con BrdU se encontró totalmente incorporada en la CCG y su morfología fue similar a la de las neuronas granulares maduras vecinas, en ambos grupos experimentales. Sorprendentemente, el número de células BrdU-(+) fue mayor en los animales expuestos a DES ($P<0,05$; Fig.43A). Respecto del inmunofenotipo de las células BrdU-(+) sobrevivientes, nuestros resultados muestran que el tratamiento con DES no altera la proporción de células que expresan calbindina (marcador de neuronas maduras) o GFAP (marcador de células gliales maduras) comparado con los controles (Fig.43B).

4.5.1.3- Proliferación de las CPN en DPN21

Al contrario de lo observado en DPN8, las ratas tratadas con DES e inyectadas con BrdU en DPN21 mostraron un aumento en el número de células con marcación doble BrdU-(+)/nestina-(+) comparadas con los controles ($P<0,01$; Fig.44A). Además, las CPN de los animales expuestos a DES mostraron una marcada disminución en la expresión de p27^{kip1} ($P<0,01$; Fig.44B). En esta misma edad, no se observaron diferencias en el número de figuras apoptóticas entre los animales expuestos a DES y los controles (Fig.44C).

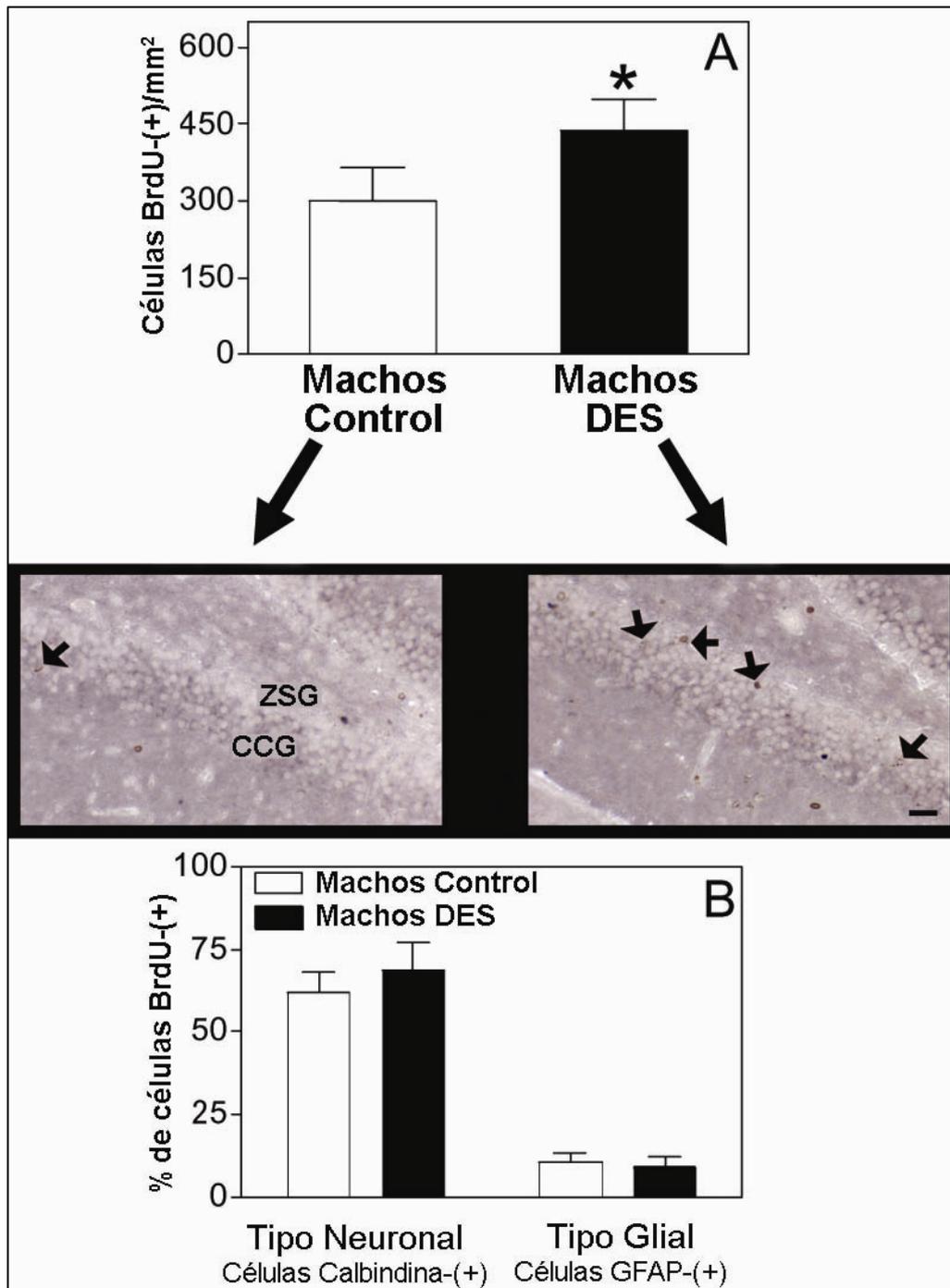


Figura 43 Dos semanas luego de finalizada la exposición a DES, se observó un mayor número de células BrdU-(+) sobrevivientes en el giro dentado. **(A)** Densidad espacial de células BrdU-(+) y detalles morfológicos de las células sobrevivientes en cada grupo experimental (**flechas**). **(B)** Proporción de células BrdU-(+) sobrevivientes que demuestran fenotipo glial o neuronal en DPN21 (*, $P < 0,05$ vs. machos control).

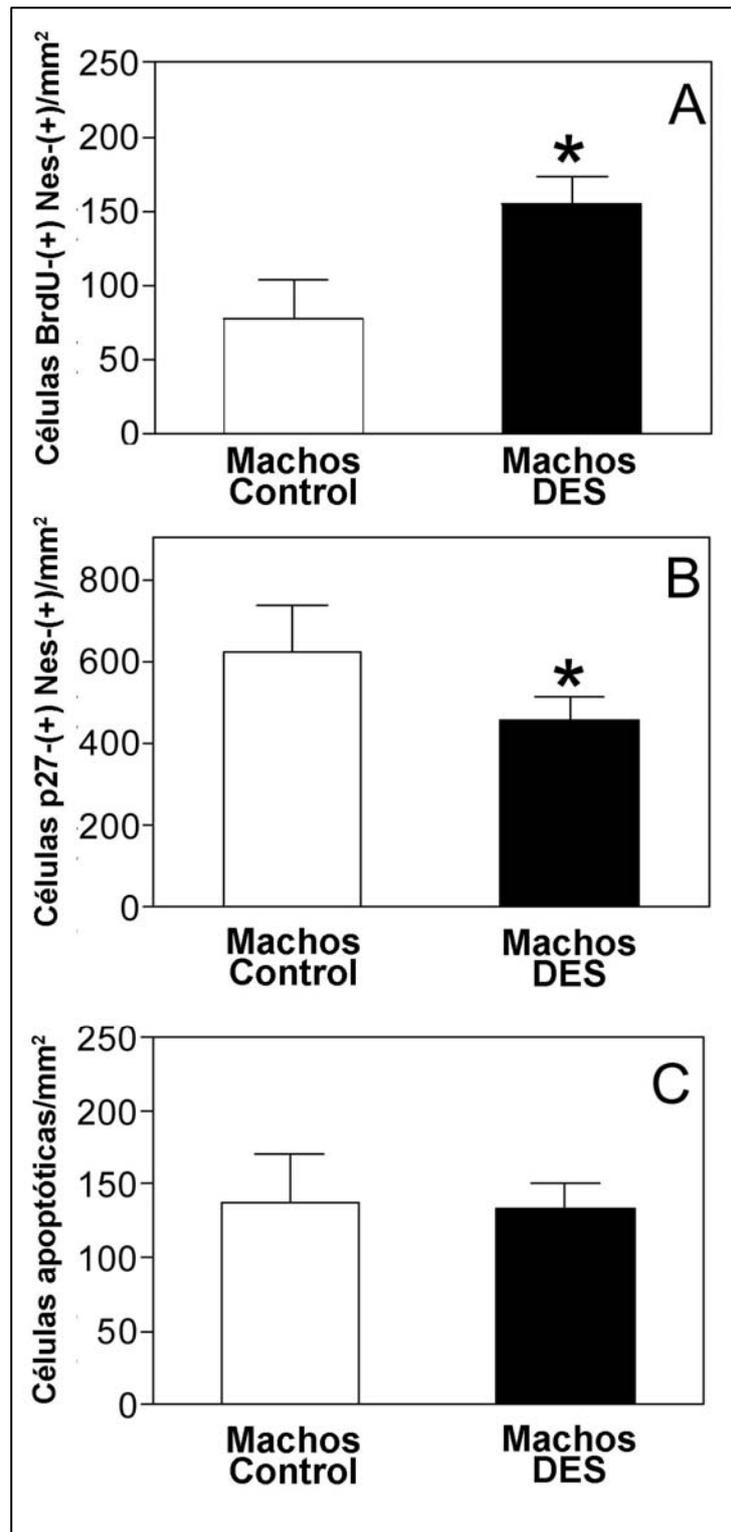


Figura 44 Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la proliferación y apoptosis de CPN en DPN21. Cuatro horas previas al sacrificio, los animales fueron inyectados con BrdU en el DPN21. Los resultados se expresan como densidad espacial de células y cada columna representa la media \pm E.E.M. de al menos cinco series de cortes por animal ($n = 13$ animales por grupo). **(A)** Proliferación de CPN; **(B)** Densidad de CPN p27^{kip1}(+); **(C)** Densidad de células apoptóticas (*, $P < 0,05$ vs. machos control).

4.5.1.4- Expresión de ER α en las CPN

Las células inmunoreactivas para ER α sólo fueron observadas en el hilus y en la ZSG, y ninguna de estas células co-expresó nestina. Por último, no se observaron diferencias en el número o distribución de las células ER α (+) entre los grupos experimentales en ninguna de las edades estudiadas (datos no mostrados).

4.5.1.5- Volumen de la CCG y la ZSG

Los volúmenes estimados de la CCG y la ZSG estudiadas en este trabajo se muestran en la Tabla 4. No se observaron diferencias en el análisis volumétrico entre los animales expuestos a DES y los controles.

TABLA 4. Análisis cuantitativo de los volúmenes de CCG y ZSG

	Machos Control		Machos DES	
	CCG	ZSG	CCG	ZSG
DPN8	0,351 \pm 0,081	0,151 \pm 0,009	0,339 \pm 0,015	0,148 \pm 0,008
DPN21	0,732 \pm 0,021	0,387 \pm 0,012	0,799 \pm 0,056	0,401 \pm 0,022

Resultados expresados en mm³

4.5.2- La expresión hipocampal de los genes VEGF y BDNF es afectada por el tratamiento neonatal con DES

Utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real examinamos la expresión de los ARNm de VEGF y BDNF en el giro dentado, extraído mediante microdisección, de animales experimentales de DPN8 y DPN21. Nuestros resultados demuestran que la exposición neonatal a DES disminuye la expresión del ARNm de VEGF en el hipocampo de ratas de DPN8 ($P < 0,01$; Fig.45A). Por el contrario, dos semanas luego de finalizado el régimen con xenoestrógenos (DPN21), los niveles del ARNm de VEGF fueron

significativamente mayores en los animales expuestos a DES ($P < 0,01$; Fig.45A). Por otro lado, los niveles del ARNm de BDNF fueron mayores en los animales tratados con DES respecto de los controles en ambas edades estudiadas ($P < 0,01$; Fig.45B).

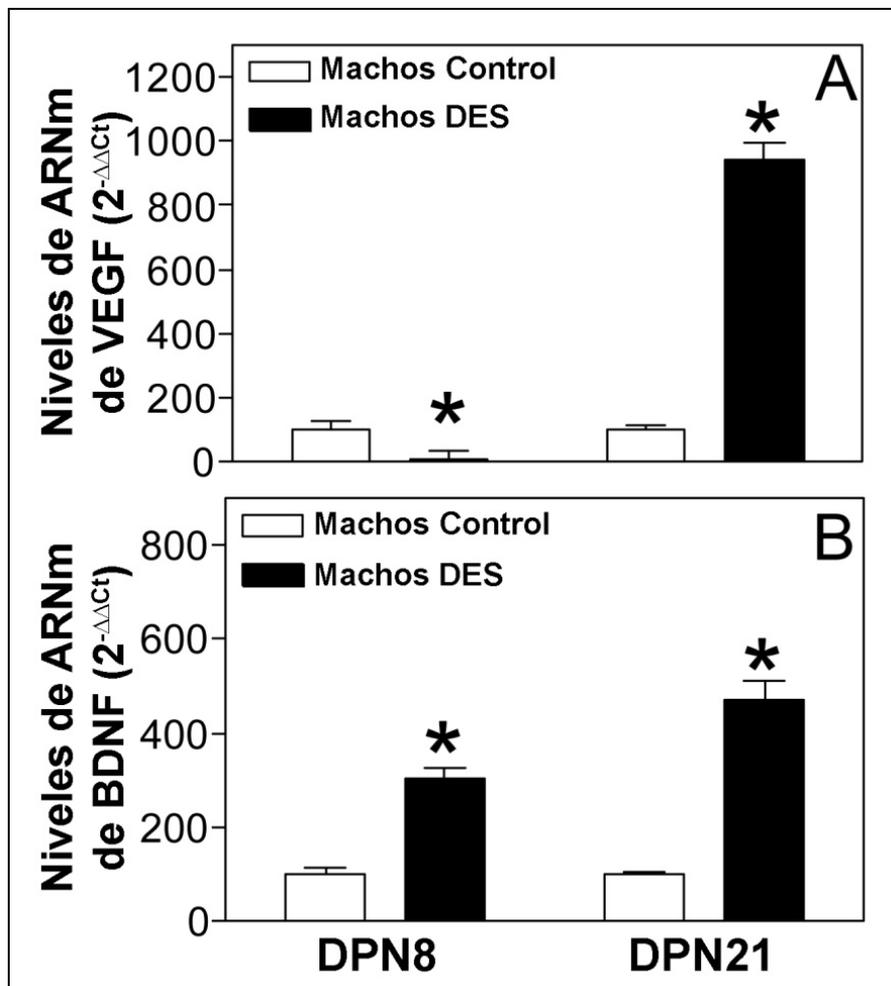


Figura 45 Efectos de la exposición neonatal a DES sobre los niveles de expresión del ARNm de (A) VEGF y (B) BDNF en el giro dentado de ratas de DPN8 y DPN21. Los niveles relativos de los ARNm fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real y el cambio en los niveles de expresión respecto de los controles se calculó mediante la ecuación de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A los controles se les asignó un valor de referencia de 100 y los valores se expresaron como la media \pm E.E.M. de al menos tres determinaciones independientes (*, $P < 0,05$ vs. machos control).

4- *Discusión*

5- DISCUSIÓN

5.1- La exposición neonatal a BPA altera la diferenciación sexual del área preóptica hipotalámica de la rata hembra

En la primera etapa de nuestro trabajo, observamos que la exposición neonatal a BPA afecta la abundancia relativa de los transcritos conteniendo los exones 5'UTR alternativos del gen de ER α en el área preóptica de ratas hembra. Además, detectamos que las hembras expuestas a la dosis alta de BPA regularon negativamente la expresión total del ARNm de ER α mientras que las hembras expuestas a niveles de BPA 400 veces más bajos presentaron el efecto opuesto. Las alteraciones causadas por la exposición postnatal temprana a BPA no se restringieron a la transcripción hipotalámica del gen de ER α , sino que fueron extensivas también a la traducción del ER α en el núcleo neuronal sexualmente dimórfico del área preóptica, el AvPv. Cuando los cerebros de rata hembra fueron estudiados inmediatamente luego de finalizada la exposición a la dosis alta de BPA (DPN8), se observó una caída abrupta en los niveles de la proteína de ER α en el AvPv. Sorprendentemente, los animales expuestos a la dosis baja de BPA exhibieron un aumento significativo en los niveles de la proteína de ER α , mostrando claramente que el BPA produce efectos opuestos dependiendo de la dosis, sobre el control de la transcripción y traducción del gen de ER α en el área preóptica de la rata hembra. En conjunto, lo anteriormente expuesto sugiere que la dosis alta de BPA, al igual que la exposición a DES, defeminiza la expresión de ER α en el área preóptica de las crías hembras, lo cual sería consistente con la naturaleza estrogénica del BPA (Olea y col., 1996). Remarcablemente, en las hembras expuestas a la dosis

baja de BPA el efecto observado fue el opuesto. Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que compuestos hormonalmente activos, como el endosulfán, son capaces de imitar los efectos de una dosis baja no-uterotrópica de estradiol pero no los de una dosis alta uterotrópica de estradiol (Varayoud y *col.*, 2008a). Asimismo, se observó que estas dosis altas y bajas de estradiol presentan efectos opuestos sobre la transcripción de genes estrógeno-sensibles (Varayoud y *col.*, 2008a). Los mecanismos que subyacen las diferentes respuestas observadas entre la dosis uterotrópica de estradiol y el endosulfán son actualmente desconocidos; sin embargo, las similitudes observadas entre las acciones de la dosis baja de estradiol y el endosulfán sobre el control transcripcional de genes estrógeno-sensibles sugieren que ambas sustancias podrían estar activando los mismos mecanismos moleculares.

Dos semanas luego de finalizada la exposición a xenoestrógenos, la expresión hipotalámica de ER α se mantuvo elevada en ambos grupos expuestos a BPA, sugiriendo un efecto a mediano plazo. Específicamente en las hembras expuestas a la dosis alta de BPA proponemos que podría producirse la activación de un mecanismo de compensación en respuesta a la caída inicial en la expresión de ER α observada en DPN8. Un mecanismo similar de sobrecompensación relacionado al control de genes estrógeno-dependientes, lo detectamos en el hipocampo de ratas macho neonatalmente expuestas a DES (Ramos y *col.*, 2007). Específicamente observamos una caída inicial en la expresión hipocámpica del gen de VEGF en machos de DPN8 expuestos neonatalmente a DES, seguida de un incremento en la expresión de este gen dos semanas después (Ramos y *col.*, 2007). Estos resultados sugieren la

existencia de un mecanismo regulatorio interno que podría estar compensando la caída inicial de la transcripción de genes estrógeno-dependientes debida al tratamiento con xenoestrógenos.

Un posible mecanismo mediador de la perturbación provocada por los xenoestrógenos sobre la expresión de ER α , podría ser la utilización diferencial de las secuencias promotoras del gen que lo codifica, tal como sugieren los cambios en la abundancia relativa de los transcritos conteniendo los distintos exones 5'UTR (Kato *y col.*, 1998; Hughes, 2006). Nuestros resultados muestran que en DPN8 la reducción en la expresión del ARNm de ER α observada en las crías hembras expuestas a la dosis alta de BPA, se correlaciona con los bajos niveles de transcritos ER α -O y ER α -OT. Por otro lado, en crías hembras expuestas a la dosis baja de BPA, el incremento en la expresión del ARNm de ER α podría explicarse mediante el incremento en transcritos provenientes del promotor ER α -E1. Es interesante destacar que aunque las crías hembra expuestas a la dosis alta de BPA también presentaron un aumento en los niveles de transcritos ER α -E1, éstos aparentemente no serían suficientes para contrarrestar los bajos niveles de expresión de los promotores ER α -O y ER α -OT observados en estos animales. En las hembras de DPN21, ambas dosis de BPA indujeron un aumento de aproximadamente el doble en la expresión del ARNm total de ER α , el cual podría estar mediado a través de un incremento en la expresión de las variantes ER α -O y ER α -OT. Estos resultados sugieren fuertemente que los promotores ER α -O y ER α -OT son muy importantes en el control de la transcripción del gen de ER α en estructuras hipotalámicas durante el período posnatal temprano.

El uso selectivo de promotores transcripcionales de ER α mediado por estrógenos fue demostrado en varias líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Donaghue y *col.*, 1999) y en el cerebro de la rata (Hamada y *col.*, 2005). Además, reportes previos demuestran que la actividad diferencial de estos promotores es un regulador clave en la expresión tejido-dependiente de ER α (Kato y *col.*, 1998; Donaghue y *col.*, 1999). Nuestros resultados sugieren que el uso alternativo de los promotores del gen de ER α sería regulado por la exposición a BPA de forma dosis-dependiente. Por lo tanto este mecanismo podría ser, al menos en parte, responsable por los diferentes y muchas veces contradictorios efectos, provocados por el BPA sobre la transcripción de distintos genes (Khurana y *col.*, 2000; Kwon y *col.*, 2000; Aloisi y *col.*, 2001; Ramos y *col.*, 2003; Patisaul y *col.*, 2006). En vistas de que la diferenciación sexual del hipotálamo es estrógeno-dependiente y al menos parcialmente mediada a través del ER α (Simerly y *col.*, 1997), las alteraciones causadas por el BPA en la expresión de este receptor podrían afectar los dimorfismos naturales de los circuitos neurales estrógeno-dirigidos del área preóptica. En un trabajo realizado anteriormente, demostramos que el corte alternativo del ARNm de ER α puede ser diferencialmente regulado por dosis altas y bajas de estrógeno (Varayoud y *col.*, 2005). El uso selectivo de promotores y el corte alternativo del ARNm son mecanismos estrógeno-dependientes de variabilidad del gen ER α , que surgen como fuentes de complejidad en el estudio de la toxicología de los perturbadores endocrinos. En cualquier paradigma experimental, es muy complicado predecir si las alteraciones provocadas por la exposición a BPA serán similares a las observadas en exposiciones a estrógenos naturales o sintéticos (vom Saal y Hughes, 2005; vom Saal y

Welshons, 2006), mas aún si tenemos en cuenta que las respuestas de los estrógenos naturales también son dosis-dependientes (Varayoud y col., 2008a). Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo demuestran que en las condiciones estudiadas en esta tesis el BPA estaría actuando de manera similar a un estrógeno sintético (como el DES), de-feminizando la expresión de la proteína de ER α en el área preóptica de hembras sólo en el grupo expuesto a la dosis alta, mientras que en el grupo expuesto a la dosis baja actuaría provocando el efecto contrario.

En esta tesis y en otros trabajos realizados en nuestro laboratorio demostramos que la exposición a BPA provoca cambios en el repertorio de cofactores transcripcionales presentes en neuronas de núcleos hipotalámicos y en células subepiteliales del estroma uterino (Monje y col., 2009; Varayoud y col., 2008b; Bosquiazzo y col., 2009). Dichos cambios demostraron ser dependientes de la dosis utilizada, con lo cual la mayor/menor presencia de cofactores transcripcionales específicos de la respuesta estrogénica podría determinar cuál promotor transcripcional será utilizado en determinadas condiciones (ej.: en distintas etapas del desarrollo, en respuesta a estímulos hormonales). En conjunto, estos resultados sugieren que la dosis de xenoestrógeno determinaría el repertorio de cofactores transcripcionales presentes en la célula y por ende la respuesta transcripcional de la misma. Esta hipótesis no solo explicaría los efectos contrarios provocados por dosis altas y bajas de xenoestrógenos (Monje y col., 2009; Monje y col., 2007), sino que sería válido también para explicar lo observado en animales tratados con distintas dosis de un estrógeno natural (Varayoud y col., 2008a).

Las alteraciones causadas por la exposición a xenoestrógenos durante el desarrollo temprano han sido ligadas a la aparición de patologías reproductivas en adultos, e incluso cáncer (Munoz-De-Toro y *col.*, 2006; Durando y *col.*, 2007); sin embargo, la base molecular de la impronta genómica que culmina en estos eventos es aún desconocida. Un estudio reciente reportó que la exposición neonatal a estrógeno o BPA causa hipometilación temprana y prolongada de la región próxima al extremo 5' del gen de la fosfodiesterasa tipo 4 (*PDE4D4*) en la próstata de la rata, dando como resultado una sobreexpresión continua de *PDE4D4* (Ho y *col.*, 2006). Utilizando la técnica de COBRA, en este trabajo no observamos diferencias entre los controles y tratados en el estatus de metilación de los promotores activos de $ER\alpha$, lo cual sugiere que tanto el DES como el BPA alteran la transcripción hipotalámica del gen de $ER\alpha$ mediante un mecanismo independiente de metilación.

Los resultados presentados en esta parte del trabajo están en concordancia con un trabajo reciente en el cual reportan que hembras expuestas a BPA (100 mg/kg por día) durante los primeros días posnatales presentan disminución en el número de neuronas con marcación tirosín-hidroxilasa (TH)-(+)/ $ER\alpha$ -(+) en el AvPv (Patisaul y *col.*, 2006). En otro trabajo, ratones de la cepa CD1 tratados con dosis bajas de BPA (25 y 250 ng/kg por día) desde el día 8 de gestación hasta el día 16 de lactancia presentaron una disminución en el número de neuronas TH en el AvPv (Rubin y *col.*, 2006). Además, nuestros resultados muestran que los niveles séricos de estradiol en hembras prepuberales no fueron afectados por la exposición a BPA. Esto podría sugerir que la perturbación observada dos semanas luego de finalizado el tratamiento, podría ser atribuida a una alteración a nivel organizacional del control transcripcional

de genes estrógeno-dependientes, como los genes de TH y ER α , más que a una alteración en la síntesis endógena de estradiol.

Previamente otros autores han observado una curva de dosis-respuesta en forma de U-invertida para la acción hormonal del BPA en coincidencia con nuestros resultados (Nishizawa *y col.*, 2005; vom Saal y Hughes, 2005; Wetherill *y col.*, 2005; Zsarnovszky *y col.*, 2005). De forma alarmante, la dosis baja de BPA utilizada en este trabajo (50 μ g/kg por día) está dentro del rango estimado de exposición de la población humana, ya que concentraciones en el orden del microgramo de BPA por litro fueron reportadas en muestras de orina (Calafat *y col.*, 2005) y en líquido amniótico (Engel *y col.*, 2006).

Es importante resaltar que lo preocupante para la salud de los resultados obtenidos es que, alteraciones transientes a nivel organizacional que se producen durante el desarrollo, podrían permanecer silentes hasta períodos de mayor actividad hormonal, como ser la pubertad y la madurez sexual. Por otro lado, la exposición de la población humana a perturbadores endocrinos podría continuar luego del nacimiento, ya que el BPA es liberado de las mamaderas de policarbonato a la leche contenida en su interior (Brede *y col.*, 2003) y, además está presente en leches en polvo infantiles y formuladas para bebés (Kuo y Ding, 2004).

En resumen, los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo muestran que la exposición neonatal temprana a distintas dosis de BPA altera a corto (DPN8) y mediano (DPN21) plazo la diferenciación sexual del área preóptica hipotalámica de ratas hembra.

5.2- La exposición neonatal a BPA altera el procesado hipotalámico del pre-ARNm de LHRH y la respuesta estrógeno-dependiente de núcleos neuronales encargados de controlar el ciclo estral en la rata adulta

Debido a que el verdadero impacto de los perturbadores endocrinos sobre la salud humana es difícil de determinar, es importante analizar los efectos de los mismos bajo condiciones de exposición controladas en modelos animales (Maffini y col., 2006). El modelo de exposición neonatal temprana a xenoestrógenos utilizado en esta tesis ha sido muy utilizado en nuestro laboratorio (Varayoud y col., 2008b; Monje y col., 2007; Ramos y col., 2007) y ha sido establecido como un robusto paradigma para el estudio de consecuencias a corto, mediano y largo plazo de la exposición neonatal a compuestos ambientales hormonalmente activos. Previamente demostramos que la exposición neonatal a BPA altera la abundancia hipotalámica de transcritos provenientes de distintos promotores y de la proteína de ER α de forma dosis-dependiente en la etapa prepuberal (Monje y col., 2007). En la presente etapa del trabajo, extendimos nuestras observaciones para dilucidar si los efectos sobre el hipotálamo inducidos por el BPA se manifiestan durante la etapa adulta de vida.

Trabajos previos reportan que animales expuestos en el período que va desde la gestación hasta la finalización de la lactancia a dosis de 1,2 mg/kg de BPA (pero no aquellos expuestos a 0,1 mg/kg de BPA) a través del agua de bebida y animales expuestos posnatalmente a rangos de 25,0-62,5 mg/kg de BPA (pero no aquellos expuestos a 2,5-6,2 mg/kg de BPA) a través de inyecciones subcutáneas, exhiben durante la etapa de vida adulta alteraciones en sus ciclos estrales. Nuestros resultados muestran que las hembras expuestas

neonatalmente a la menor dosis de BPA usada en este trabajo (0,05 mg/kg de BPA) presentan en la edad adulta alteraciones en los patrones de ciclicidad estral. Las diferentes respuestas de acuerdo a la dosis utilizada podría deberse a las cepas de rata utilizadas, ya que las ratas de la cepa Sprague-Dawley utilizadas en los trabajos mencionados (Rubin y *col.*, 2001; Fernandez y *col.*, 2009) son menos sensibles a la acción estrogénica que las ratas Wistar (Diel y *col.*, 2004; vom Saal y Hughes, 2005), necesitando de altas concentraciones de estrógenos débiles para desencadenar una respuesta cuantificable.

Las alteraciones observadas en el ciclo estral de las hembras expuestas a BPA podrían estar relacionadas con modificaciones en los mecanismos encargados de regular los picos espontáneos de LH y LHRH. En base a esta hipótesis decidimos estudiar la regulación postranscripcional de la síntesis hipotalámica de LHRH y la expresión de ER α , PR y sus cofactores de transcripción SRC-1 y REA en los núcleos neuronales AvPv y Arc utilizando un modelo estrógeno-dependiente de inducción del pico de LH.

En esta etapa, mostramos que el modelo de estimulación estrogénica utilizado fue capaz de inducir un robusto pico de LH a las 16:00 h del Día 2 y que las hembras expuestas a la dosis alta de BPA no fueron capaces de producir dicho pico de LH en respuesta al 17 β -estradiol. De acuerdo a trabajos previos, la magnitud del pico de LH inducido mediante estimulación estrogénica es relativamente menor comparada con lo observado en hembras intactas durante la etapa de proestro; probablemente debido a niveles de 17 β -estradiol más bajos, a la falta de progesterona o a ambos (Herath y *col.*, 2001; Caligaris y *col.*, 1971). Además, en este modelo, la expresión hipotalámica de las variantes citoplasmáticas del ARNm de LHRH demostró ser dependiente del horario. El

gen de LHRH (Fig.4) consta de cuatro exones (1, 2, 3, 4) separados por tres intrones (A, B, C) (Bond y col., 1989). Estudios del mecanismo de corte alternativo del transcripto primario de LHRH reportaron que los intrones B y C son rápidamente removidos de la secuencia del pre-ARNm de LHRH, mientras que el intrón A es removido más lentamente (Jakubowski y Roberts, 1994). La presencia del intrón A en la secuencia del pre-ARNm de LHRH actuaría bloqueando la transcripción de las secuencias corriente abajo tanto *in vivo* como *in vitro* (Son y col., 2003), por lo cual la remoción precisa y eficiente del intrón A sería un paso regulatorio clave en la regulación postranscripcional de la biosíntesis de LHRH. Además, nuestros resultados sugieren que los niveles hipotalámicos del ARNm maduro de LHRH necesarios para originar el pico de LHRH, son al menos parcialmente provistos mediante un aumento en la tasa de remoción del intrón A del ARN citoplasmático de LHRH no procesado.

En respuesta a la estimulación estrogénica, las hembras expuestas a la dosis alta de BPA mostraron una clara disminución en la expresión tanto del ARNm maduro como del ARN sin procesar de LHRH. Por el contrario, en hembras expuestas a la dosis baja de BPA observamos un aumento en la expresión del ARNm maduro y una disminución en el ARN sin procesar de LHRH. Estos resultados muestran que la exposición a dosis bajas (ambientalmente relevantes) y a dosis altas de BPA durante el período posnatal altera el procesamiento hipotalámico del ARNm de LHRH en la etapa adulta. Recientemente fue reportado que las neuronas-LHRH de hembras expuestas neonatalmente a niveles de BPA similares a los utilizados en este trabajo retienen la capacidad de respuesta a estímulos hormonales (Adewale y col., 2009), ya que estas neuronas estarían expresando el factor de transcripción de amplio espectro

FOS. La expresión de FOS en neuronas-LHRH revela el estado transcripcional global de estas neuronas, pero nada específica acerca de la respuesta transcripcional de genes estrógeno-dependientes. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que las neuronas-LHRH de las hembras expuestas neonatalmente a la dosis alta de BPA son menos sensibles a los estímulos hormonales. Esto se evidencia con la disminución general en la transcripción hipotalámica del gen de LHRH; lo cual a su vez podría ser, al menos, parcialmente responsable de la incapacidad de estas hembras de producir un pico de LH normal en respuesta a los estrógenos. Además, hipotetizamos que en las hembras expuestas a la dosis baja de BPA un mecanismo interno de compensación estaría aumentando los niveles del ARNm maduro de LHRH a expensas de un aumento en la tasa de remoción del intrón A, pudiendo esto resultar en la producción de un pico de LH similar al observado en las hembras control.

Trabajos previos reportan que la exposición a dosis bajas de BPA durante la pubertad da como resultado alteraciones a corto plazo en la expresión hipotalámica de ER α en hembras puberales, pero no en hembras adultas (Ceccarelli y *col.*, 2007). Por el contrario, nuestros resultados muestran que la exposición a dosis bajas, ambientalmente relevantes, y dosis altas de BPA durante el período posnatal temprano produce alteraciones a largo plazo en la expresión hipotalámica de la proteína de ER α , como puede observarse en los núcleos AvPv y Arc de las ratas hembra adultas. Una explicación viable para la diferencia entre ambos trabajos podría ser la etapa de la vida en la cual los animales son expuestos al BPA, ya que el período neonatal pareciera ser un momento crítico para los procesos organizacionales del cerebro. Es interesante

destacar que la exposición neonatal a BPA produjo efectos opuestos dosis-dependientes sobre la expresión de ER α en estos dos núcleos hipotalámicos funcionalmente distintos. En el AvPv, ambas dosis de BPA provocaron un aumento en la expresión de ER α mientras el efecto opuesto fue observado en las neuronas del Arc. La evidencia existente indica que la expresión de ER α , pero no de ER β , en el AvPv es fundamental en las vías que controlan la retroalimentación positiva estrogénica encargada de generar los picos preovulatorios de gonadotropinas (Wintermantel y *col.*, 2006). Además, la expresión de ER α junto con proyecciones estrógeno-sensibles que parten del Arc fueron descritas como indispensables en el mecanismo de retroalimentación negativa estrogénica encargado de controlar la secreción de LH (Couse y *col.*, 2003; Smith y *col.*, 2005a). Los mecanismos moleculares a través de los cuales el BPA estaría produciendo efectos opuestos sobre la expresión de ER α en el AvPv y el Arc son hasta el momento desconocidos. Nuestra hipótesis es que eventos intrínsecos a cada tipo celular podrían ser responsables de los efectos opuestos observados, como ser la expresión de coactivadores o represores específicos de cada núcleo neuronal.

En el cerebro, el PR sirve como un ejemplo arquetípico de un gen estrógeno-dependiente (Funabashi y *col.*, 2000; Lauber y *col.*, 1991), el cual posee en su región promotora varias secuencias consenso de elementos de respuesta a estrógenos (Kraus y *col.*, 1994; Savouret y *col.*, 1991). A lo largo de la vida, la expresión de PR en el cerebro depende de la estimulación estrogénica (Williams y Blaustein, 1988; Shughrue y *col.*, 1997b; Simerly y *col.*, 1996) y el ER α específicamente es necesario para la inducción dimórfica del PR en el cerebro en desarrollo (Wagner y *col.*, 2001). En nuestro trabajo, las hembras

neonatalmente expuestas a la dosis alta de BPA fueron incapaces de producir un pico de LH similar al de los controles en respuesta al tratamiento con estrógeno, lo cual sería de esperar, limitase la fertilidad y el éxito reproductivo de estos animales en la etapa adulta. Por el contrario, las hembras expuestas a la dosis baja de BPA presentaron patrones anormales en sus ciclos estrales aún cuando fueron capaces de producir un pico de LH de similar magnitud al de los controles en respuesta al estrógeno. Nuestros resultados sugieren una clave para descifrar dicha controversia a través de las alteraciones observadas en la expresión de PR y SRC-1 en el núcleo AvPv de las hembras expuestas a la dosis baja de BPA. Los modelos experimentales son diseñados y desarrollados con la intención de minimizar la complejidad del contexto a estudiar, para en última instancia, encontrar respuestas a preguntas específicas. Por el contrario, los patrones del ciclo estral que pueden observarse en hembras no-OVX son parámetros dependientes de múltiples factores y no sólo de mecanismos estrógeno-dependientes, lo que los convierte en variables de estudio complejas. En este contexto, una expresión deficiente de PR en el AvPv de hembras adultas no-OVX expuestas neonatalmente a la dosis baja de BPA podría derivar en una amplificación defectuosa de los picos de LHRH (Levine y Ramirez, 1980) y/o LH (Krey y *col.*, 1973), con una subsecuente falla en el ciclo estral. Al mismo tiempo, los bajos niveles del coactivador SRC-1 en el mismo núcleo neuronal de estas hembras podría sumarse al efecto negativo global ya que esta molécula es un potenciador de la actividad transcripcional del PR (Onate y *col.*, 1998) y se co-expresa con el mismo en las neuronas del hipotálamo (Tetel y *col.*, 2007).

En resumen, los resultados de esta etapa de la tesis demuestran que la exposición posnatal temprana a BPA altera la respuesta estrógeno-dependiente de la red neuronal encargada de regular los picos preovulatorios de gonadotropinas y el ciclo estral en la rata hembra adulta.

5.3- La exposición neonatal a BPA altera los mecanismos estrógeno-dependientes encargados de regir la conducta sexual en la rata hembra adulta

En esta etapa de nuestro trabajo demostramos que la exposición a BPA durante el desarrollo neonatal del cerebro, altera permanentemente la respuesta de las vías estrogénicas en núcleos hipotalámicos íntimamente relacionados al control de la conducta sexual. Nuestros resultados muestran que la exposición a dosis altas y bajas de BPA durante el período posnatal produce alteraciones a largo plazo sobre la expresión hipotalámica de ER α , como puede observarse en el MPN y VMHvl de ratas hembra adultas. Es de remarcar que la expresión de ER α fue regulada negativamente tanto en el MPN como en el VMHvl utilizando ambas dosis de BPA, una cuatrocientas veces menor que la otra. Estudios utilizando infusiones locales de estrógeno, lesiones cerebrales, y neuroendocrinología molecular han identificado al MPN y al VMHvl como regiones críticas en la regulación de la conducta sexual de los roedores (Pfaff D, 1999; Hoshina y col., 1994; Musatov y col., 2006). Además, otros trabajos indican que el ER α es una molécula clave en la vía que media la conducta sexual ya que animales que carecen de ER α , pero no de ER β , muestran profundas reducciones de sus conductas receptivas y proceptivas (Ogawa y col., 1998; Ogawa y col., 1999; Musatov y col., 2006). Estas

observaciones concuerdan con la distribución neuroanatómica del ER β , para el cual muy poca, o ninguna, expresión ha sido observada en el VMHvl de ratas hembra adultas (Shughrue y *col.*, 1997a; Ikeda y *col.*, 2003; Zhang y *col.*, 2002).

En el cerebro, el PR es un reconocido gen estrógeno-dependiente (Williams y Blaustein, 1988; Shughrue y *col.*, 1997b; Simerly y *col.*, 1996) siendo el ER α necesario para la inducción dimórfica de este receptor en el MPN y el VMHvl del cerebro en desarrollo (Wagner y *col.*, 2001). Nuestros resultados indican que las hembras expuestas a la dosis baja de BPA presentan una represión en la expresión del PR en el VMHvl. Las isoformas de PR, PR-A y PR-B (Kastner y *col.*, 1990), presentan capacidades diferentes para regular las respuestas específicas que median la conducta sexual (Mani y *col.*, 2006). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostramos que dosis altas y bajas de estrógeno regulan diferencialmente la expresión de las isoformas de los receptores de esteroides (Varayoud y *col.*, 2005) y que los xenoestrógenos son capaces de imitar los efectos de las dosis bajas, pero no de las altas, de estradiol (Varayoud y *col.*, 2008a). Utilizando la técnica de western blot, intentamos dilucidar si la presencia y/o ausencia de las isoformas de PR en el hipotálamo, más que sus niveles de expresión, podría clarificar al menos en parte, los efectos causados por la exposición a BPA. Nuestros resultados muestran que ambas isoformas de PR están presentes en el hipotálamo tanto de los animales control como en los tratados sugiriendo que la utilización alternativa de las isoformas de PR no estaría involucrada en los procesos de perturbación hipotalámica del BPA.

En esta etapa del trabajo nos propusimos investigar la expresión de coreguladores específicos de la acción del ER α como un posible mecanismo mediador de la perturbación del BPA sobre las funciones hipotalámicas. Los coactivadores y corepresores son parte de un repertorio crítico de moléculas que interactúa con los receptores para permitir una respuesta apropiada a las hormonas. Un exponente clave de la familia de proteínas coreguladoras es SRC-1, el cual es un potenciador de la actividad transcripcional de ER α y PR (McInerney y *col.*, 1996; Onate y *col.*, 1998), y se co-expresa con estas dos moléculas en neuronas del MPN y el VMHvl (Tetel y *col.*, 2007). Además, utilizando ensayos de retraso en geles de extractos proteicos de tejido cerebral, se ha demostrado que el SRC-1 proveniente de hipotálamo, interactúa de mayor manera con ER α que con ER β (Molenda-Figueira y *col.*, 2008). Por otro lado, el represor REA interactúa con el ER α y reprime la transactivación mediada por el mismo (Montano y *col.*, 1999; Delage-Mourroux y *col.*, 2000), lo cual lo postula como un potente modulador de la sensibilidad hipotalámica a los estrógenos. Nuestros resultados revelan que la exposición neonatal a dosis de BPA muy por debajo de la LOAEL, altera claramente la respuesta estrógeno-dependiente del gen de REA en el VMHvl, tal como lo demuestra la sobre-expresión de la proteína de REA. La evidencia disponible postula al gen de REA como un gen potencialmente de respuesta a estrógenos, actuando como un mecanismo regulatorio de retroalimentación negativa para controlar la expresión de genes ER-dependientes en células normales (Mussi y *col.*, 2006). Nuestros resultados sugieren que la reducción BPA-dependiente observada en la expresión de ER α en el VMHvl podría ser mediada, al menos parcialmente, por una respuesta-estrogénica exacerbada del gen de REA. En el VMHvl de las

hembras expuestas a la dosis baja de BPA, pudimos observar una perturbación más profunda en el balance de la actividad de los coreguladores. En el VMHvl de estos animales la sobre-expresión de REA fue acompañada por una regulación negativa de SRC-1, lo cual en conjunto podría ser responsable por la deficiente inducción ER α -dependiente del gen de PR observada en este mismo núcleo. Nuestra hipótesis es que en el VMHvl, la sobre-expresión de REA actuaría bloqueando la actividad coactivadora del SRC-1 y activando una potente retroalimentación negativa sobre la expresión ER-dependiente. Evidencia que apoya nuestras observaciones es el hecho de que REA opera también como un anti-coactivador, compitiendo con SRC-1 en la modulación de la actividad biológica del ER α (Montano y *col.*, 1999). Además, cuando la expresión de REA es suprimida, la retroalimentación negativa de ER es desactivada, induciendo la expresión de PR (Mussi y *col.*, 2006). Asimismo, debido a que el REA juega un rol significativo en la regulación de procesos biológicos durante el desarrollo (Park y *col.*, 2005), perturbaciones en su expresión durante el periodo perinatal podrían afectar la diferenciación sexual hipotalámica, la cual es mediada al menos en parte por el ER α (Simerly y *col.*, 1997). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la desregulación BPA-dependiente de la interacción entre el ER α y el REA durante períodos críticos del desarrollo podría afectar los dimorfismos naturales orquestados por los estrógenos en las estructuras cerebrales, conduciendo a alteraciones perennes.

La regulación de la conducta sexual en la rata es un modelo muy interesante para estudiar los efectos a largo plazo de la exposición neonatal a BPA, ya que el estudio de alteraciones en la conducta posee la ventaja de revelar tanto

efectos directos como indirectos de la acción de los xenoestrógenos. De hecho, muchos trabajos se han realizado acerca de los efectos de la exposición a BPA sobre distintos aspectos de la conducta (Palanza y *col.*, 2008) pero muy poco, o nada, se sabe sobre los mecanismos utilizados por el BPA para alterar la performance sexual. En esta etapa del trabajo se cuantificaron ambos aspectos de la conducta sexual de los murinos: receptivo y proceptivo. Demostramos que la exposición neonatal a BPA no tiene efectos visibles sobre la conducta receptiva de las hembras, tanto en el número como en la fuerza de las respuestas de lordosis. Sin embargo, en las hembras expuestas a BPA observamos una menor conducta proceptiva, lo cual se reflejó en una disminución significativa en el número de saltos y corridas. Interesantemente, el número de movimientos de orejas no fue afectado por la exposición a BPA posiblemente debido a la sutileza de esta conducta; que, al contrario de los saltos y corridas podría pasar desapercibido debido a la resolución de nuestro sistema de video. Muchos trabajos reportan al MPN y el VMHvl como puntos críticos de control de la conducta sexual; sin embargo el MPN es señalado como un blanco importante de la inducción estrogénica de la conducta proceptiva (Hoshina y *col.*, 1994; Kato y Sakuma, 2000). Además, lesiones en el MPN aumentan la receptividad pero reducen la proceptividad (Hoshina y *col.*, 1994), mientras que el silenciamiento de ER α en el VMHvl bloquea la conducta receptiva y proceptiva (Musatov y *col.*, 2006). Por lo tanto, el VMHvl parece funcionar como un portal, recibiendo información sensorial procesada en el MPN y transmitiendo señales neurales hacia los músculos involucrados en la ejecución del comportamiento (Pfaff D, 1999; Paxinos G, 1995). Nuestros resultados sugieren que tanto el MPN como el VMHvl podrían estar implicados

en la alteración de la conducta proceptiva a través de una inducción incompleta de la expresión de ER α ; sin embargo, mas investigación aún se requiere para dilucidar si es que el MPN no está procesando los estímulos sensoriales o el VMHvl no los está transmitiendo correctamente. Por otro lado, la inducción incompleta de la expresión de ER α podría tener efectos contrarios sobre la conducta receptiva en cada núcleo, aumentando la lordosis en el MPN e inhibiendo este reflejo en el VMHvl.

Como resumen de esta etapa, sugerimos que la perturbación en la expresión del ER α y su represor específico, REA, debido a la exposición a BPA durante la etapa neonatal de vida, altera la sensibilidad hormonal normal de la red neural que gobierna la conducta sexual de las ratas hembra durante la etapa adulta.

5.4- La exposición a DES altera la dinámica poblacional de las células precursoras neurales en el giro dentado de ratas macho

Los estrógenos presentan una fuerte influencia sobre las distintas funciones del sistema límbico. Además de su rol en la regulación de la secreción de gonadotropinas y la conducta sexual en el hipotálamo, influyen de forma general sobre funciones neurobiológicas tales como destrezas espacio-perceptuales, aprendizaje y memoria, todas ellas funciones hipocampo-dependientes (McEwen, 1983; Smith, 1994; Luine, 1997). El hipocampo posee un remarcable grado de plasticidad y es el mediador de algunas formas de aprendizaje y memoria (Leuner y col., 2006; Winocur y col., 2006). En el adulto, las CPN del giro dentado del hipocampo retienen la habilidad de proliferar y muchas células hijas de estas CPN llegan a diferenciarse a neuronas maduras (Christie y Cameron, 2006; Eriksson y col., 1998). La neurogénesis es un

proceso que consta tanto de la proliferación (producción de nuevas células) como de la supervivencia de dichas células (nuevas células que sobreviven y maduran). Por lo cual, el número de neuronas puede ser incrementado no sólo mediante un aumento en la proliferación sino también mediante un aumento en la supervivencia neuronal. Varios trabajos se han encargado de describir los efectos crónicos (Perez-Martin y *col.*, 2005) y agudos (Chiba y *col.*, 2007) de los estrógenos sobre la proliferación neuronal en el hipocampo de animales adultos (revisado en Galea, 2008); sin embargo, muy poco se conoce acerca de los efectos sobre la proliferación y supervivencia neuronal en el giro dentado luego de exposiciones cortas a sustancias hormonalmente activas durante el período neonatal temprano.

En esta etapa del trabajo mostramos que la exposición de crías macho al xenoestrógeno DES afecta significativamente la proliferación y supervivencia de CPN en la ZSG del hipocampo. El día después de haber finalizado la exposición a DES (PND8) observamos una importante reducción en la actividad proliferativa de las CPN hipocampales. Dos semanas luego de finalizada la exposición a DES, detectamos un incremento significativo en la proliferación de las CPN. La respuesta bifásica de esta proliferación se correlacionó positivamente con los niveles hipocampales del ARNm de VEGF, sugiriendo que la molécula de VEGF podría ser un mediador clave en este evento estrógeno-dependiente. Considerando el hecho que la proliferación de las CPN tipo-I no fue afectada por el DES, es tentador proponer que los cambios observados en la proliferación celular hipocampal son debidos a modificaciones inducidas por el DES en las CPN tipo-II. Además, la proteína p27^{kip1} sólo fue expresada en las células tipo-II y fue negativamente

correlacionada con la inmunodetección de BrdU en DPN8 y DPN21. Colectivamente, estos resultados demuestran que la población de CPN tipo-II constituye un blanco de la acción del DES.

Varios trabajos han descrito que el estrógeno puede afectar la proliferación celular en el giro dentado de ratas adultas. En el año 2005, Tanapat y col. (Tanapat y col., 2005) demostraron que un tratamiento agudo con una dosis moderada (10 µg/rata), pero no baja (1 µg/rata) o alta (50 µg/rata), de 17β-estradiol incrementa de forma rápida la proliferación celular en animales adultos OVX. Asimismo, estos autores no observaron diferencias cuando el estrógeno fue suministrado durante largos periodos de tiempo (3 semanas).

Estos resultados muestran claramente que los efectos de los estrógenos sobre el control de la proliferación celular en el giro dentado de ratas hembra adultas dependen de la dosis y la duración del tratamiento. Sin embargo, poco es conocido acerca de los efectos de los estrógenos sobre el control de la proliferación celular en el giro dentado durante el período posnatal temprano. Nuestros resultados muestran que la dosis y el esquema de exposición a DES utilizado en este trabajo es suficiente para alterar la dinámica poblacional de las CPN. En DPN8, observamos una clara disminución en la proliferación de las CPN tipo-II en los machos tratados con DES, sugiriendo que la etapa posnatal temprana podría ser un periodo sensible a la acción de los xenoestrógenos sobre el control de la dinámica poblacional de las CPN. Además, las diferencias observadas entre DPN8 *versus* DPN21 y aquellas observadas por otros en animales adultos (Tanapat y col., 1999; Tanapat y col., 2005) sugieren que la capacidad de respuesta a los estrógenos de las CPN varía a lo largo de la vida del animal. Esta observación es importante ya que un número cada vez mayor

de evidencia demuestra que tanto los animales silvestres como el hombre estamos expuestos a compuestos con actividad estrogénica durante el periodo perinatal (Pombo y Castro-Feijoo, 2005). Las consecuencias a nivel conductual y fisiológico de una perturbación estrogénica en la proliferación de las CPN durante el periodo perinatal son aún desconocidas. Algunos trabajos han reportado que la exposición perinatal a compuestos con actividad estrogénica altera los comportamientos exploratorio y socio-sexual (Fujimoto y *col.*, 2006; Porrini y *col.*, 2005), pero no se ha descrito aún si estas alteraciones están correlacionadas con perturbaciones en la proliferación y supervivencia de las CPN en el hipocampo.

Varios trabajos han demostrado la importancia de la funcionalidad de la vía septohipocampal para regular la neurogénesis hipocampal (Cooper-Kuhn y *col.*, 2004; Mohapel y *col.*, 2005; Van der y *col.*, 2005). Otros autores han observado que el sistema colinérgico basal del cerebro anterior tiene el rol de promover la supervivencia de los progenitores neurales y las neuronas inmaduras en las regiones donde se lleva a cabo la neurogénesis adulta, como ser la ZSG del giro dentado (Cooper-Kuhn y *col.*, 2004). Además los receptores de acetilcolina pre-sinápticos juegan un rol central en la modulación de la liberación hipocampal de acetilcolina (Vizi y Kiss, 1998). Debido a que la actividad de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior está regulada por los estrógenos a través del ER α (Bora y *col.*, 2005) el uso de una vía colinérgica indirecta en la acción del DES sobre la neurogénesis hipocampal no puede ser descartado.

La duración del ciclo celular durante la neurogénesis depende principalmente de la duración de la fase G1 y está modulada por la actividad enzimática de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Caviness, Jr. y *col.*, 1999). Se ha

demostrado que los reguladores de estas CDKs, como ser la familia de proteínas kip1, tendrían un rol crítico en el control de tránsito del ciclo celular amplificando los progenitores neurales en la zona subventricular del cerebro del ratón adulto (Doetsch y *col.*, 2002). Durante el desarrollo embrionario, ha sido demostrado que la proteína p27^{kip1} está implicada en el mantenimiento del estado inactivo de las neuronas diferenciadas; sin embargo, poco se sabe acerca de los posibles roles de este inhibidor de las CDKs durante la neurogénesis posnatal (Caviness, Jr. y *col.*, 1999). Utilizando doble IHQ junto con criterios morfológicos, demostramos que las CPN tipo-II expresan la proteína p27^{kip1} y que dicha expresión fue aumentada por la exposición a DES. Una correlación inversa fue observada entre la proliferación y la expresión de la proteína p27^{kip1}, sugiriendo una importante participación de este inhibidor de CDKs en la inducción mediada por xenoestrógenos del estado de inactividad de las CPN tipo-II. En los machos de DPN8 expuestos a DES no sólo un gran número de CPNs tipo-II permaneció inactivo, sino que además observamos una disminución significativa de células apoptóticas. Ambos eventos podrían estar contribuyendo a la gran proporción de células BrdU-(+) remanentes en los machos DPN21 expuestos a DES, sugiriendo que la exposición a xenoestrógenos aumenta la supervivencia de la progenie celular en el giro dentado, mientras que no se detectaron efectos sobre la diferenciación de las CPNs. Además, cuando evaluamos la incorporación de BrdU en DPN21, en el grupo expuesto a DES observamos un mayor número de CPNs positivas, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo interno de regulación puesto en marcha para compensar la disminución inicial de la proliferación de las CPNs inducida por el xenoestrógeno. Una creciente cantidad de evidencia sugiere

que agentes extrínsecos, como el alcohol o los xenoestrógenos pueden alterar mecanismos intrínsecos de elección del destino de células pluripotenciales contribuyendo a alteraciones de la neurogénesis y/o gliogénesis durante la maduración del sistema nervioso central (Vemuri y Chetty, 2005). El mecanismo de compensación mencionado anteriormente podría ayudar a restaurar el número requerido de células granulares, disminuyendo los posibles efectos neurológicos adversos de una exposición estrogénica temprana. Si este mecanismo es inducible sólo en la etapa posnatal temprana o si permanece activo durante la etapa adulta está siendo actualmente estudiado en nuestro laboratorio.

El VEGF es una proteína inducible por hipoxia que promueve la angiogénesis en células endoteliales a través de receptores tirosina quinasa. Evidencia reciente reporta que el VEGF puede actuar como un factor neurotrófico (Matsuzaki *y col.*, 2001; Ogunshola *y col.*, 2002) y producir efectos neurogénicos en las CPNs (Jin *y col.*, 2002). Una reducción significativa de los transcritos hipocámpales de VEGF fue observada en las ratas expuestas a DES en DPN8 en paralelo con una reducción en la proliferación de las CPNs. Por otro lado, en DPN21, cuando la proliferación de las CPNs fue mayor en las ratas estrogenizadas los niveles del ARNm de VEGF también aumentaron significativamente. En este trabajo proponemos que el VEGF en el hipocampo podría ser un gen blanco de la acción de los xenoestrógenos y un mediador molecular positivo en la proliferación de las CPNs tipo-II.

Respecto del rol del BDNF, se ha demostrado que el estrógeno regula positivamente los niveles del ARNm y la proteína de BDNF en el hipocampo de la rata (Solum y Handa, 2002). Nuestros resultados concuerdan con lo descrito

anteriormente, observando un aumento significativo en la expresión del ARNm de BDNF en los animales expuestos a DES. El BDNF está siendo propuesto como un importante mediador en la modulación de la transmisión sináptica (Levine y col., 1995) y tiene también una importante participación en el crecimiento y supervivencia de las neuronas (Davies, 1994). Sin embargo, las posibles relaciones entre el BDNF y la proliferación de las CPNs son desconocidas. Teniendo en consideración la caída en los niveles de apoptosis y el aumento en la supervivencia de células granulares nuevas observado en las animales expuestos a DES, la hipótesis del BDNF como un mediador crítico de estos eventos no podría ser descartada. Sugerimos también que el VEGF es un factor clave en la regulación de la proliferación de las CPNs tipo-II, y que el BDNF podría ser responsable de la extensión de los tiempos de supervivencia de la progeñe de células neuronales.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la exposición neonatal a xenoestrógenos provoca alteraciones sobre la neurofisiología hipotalámica e hipocampal las cuales están presentes desde el período posnatal temprano y se manifiestan hasta la etapa adulta. Además, los efectos de la exposición a BPA sobre el eje hipotalámico observados a lo largo de la vida de los animales demostraron ser dosis-dependientes y algunos de ellos fueron exclusivamente observados en las hembras expuestas a la dosis baja utilizada en este estudio.

Nuestros resultados sugieren que los efectos dosis dependientes del BPA podrían estar mediados por una cascada de mecanismos moleculares que involucran la expresión de cofactores de transcripción y el uso diferencial de los promotores génicos. En este trabajo observamos que las dosis altas y bajas de BPA perturban diferencialmente la expresión de cofactores transcripcionales específicos de la respuesta estrogénica en núcleos hipotalámicos. Estos cambios dosis-específicos del repertorio de cofactores transcripcionales podrían ser los responsables de la activación/silenciamiento de distintos promotores génicos, determinando de esta manera la respuesta transcripcional de las neuronas y alterando en última instancia la neurofisiología del animal. A pesar de que la EPA de EEUU y la Comisión Europea establecieron una dosis de 50 µg/kg/día como “dosis segura” e “ingesta diaria tolerable”, respectivamente; los resultados presentados en esta tesis y otros ya reportados por nuestro laboratorio (Varayoud y *col.*, 2008b; Stoker y *col.*, 2003; Ramos y *col.*, 2001; Ramos y *col.*, 2003) indicarían la necesidad de replantear la discusión acerca de qué dosis deben ser consideradas seguras como medida preventiva según lo establece el principio de precaución redactado en la Conferencia de Wingspread en 1998 (<http://www.sehn.org/wing.html>).

Estos resultados son inquietantes en lo que respecta a la salud pública, ya que en el transcurso de esta tesis confirmamos que la exposición a dosis bajas de compuestos ambientales hormonalmente activos durante las etapas tempranas del desarrollo afectan la diferenciación del cerebro y podrían afectar el desempeño reproductivo durante la etapa adulta. Esto es particularmente importante ya que muchos de los efectos provocados por los perturbadores endocrinos permanecen silentes durante largos períodos de tiempo,

activándose frente a estímulos endocrinos como la pubertad, la madurez sexual, la gestación.

Por último, es necesario generar conciencia acerca de las consecuencias adversas de la exposición a perturbadores endocrinos sobre la población actual y las generaciones venideras. El desarrollo de políticas sanitarias y de prevención en el tema de los perturbadores endocrinos es una necesidad ineludible.

6- Conclusiones

Finalizando el desarrollo de este trabajo de tesis y luego de presentados los resultados podemos elaborar las siguientes conclusiones:

1) La exposición neonatal a BPA y a DES altera la diferenciación sexual del área preóptica hipotalámica de la rata hembra, presentando las siguientes características:

- ✓ La dosis alta de BPA y el DES masculinizan la expresión del ER α en el AvPv de las hembras prepuberales.
- ✓ La perturbación producida por el BPA sobre la transcripción y traducción hipotalámica del ER α es dependiente de la dosis.
- ✓ Tanto el BPA como el DES son capaces de desregular la transcripción de ER α utilizando promotores específicos.
- ✓ De acuerdo a la dosis de exposición, el BPA es capaz de inhibir la transcripción de los promotores del gen de ER α .
- ✓ La activación de los promotores del gen de ER α en animales expuestos a BPA y DES es dependiente del momento en que se realiza la evaluación.
- ✓ El BPA y el DES no alteran los patrones de metilación de los promotores activos del gen de ER α en hembras tratadas neonatalmente. La diferenciación sexual de la expresión del gen de ER α en los machos tampoco utilizaría un mecanismo de metilación diferencial.
- ✓ Los niveles endógenos de estradiol no se vieron afectados en los animales prepúberes expuestos neonatalmente a los xenoestrógenos estudiados en esta tesis.

2) La exposición neonatal a BPA altera el procesado hipotalámico del pre-ARNm de LHRH y la respuesta estrógeno-dependiente de núcleos neuronales encargados de controlar el ciclo estral en la rata adulta, pudiéndose destacar las siguientes características:

- ✓ Las alteraciones observadas en la expresión y maduración del mensajero de LHRH hipotalámico fueron dependientes de la dosis de BPA utilizada.
- ✓ En las hembras expuestas a BPA20 la menor expresión del ARNm de LHRH y los bajos niveles de LH en respuesta al estradiol, sugieren una

alteración en el mecanismo estrogénico de feedback positivo en este grupo.

- ✓ La mayor expresión del ARNm de LHRH y la producción de un pico normal de LH en respuesta al estradiol en las hembras expuestas a BPA.05, sugieren la activación de un mecanismo interno de compensación.
- ✓ Las hembras expuestas a la dosis baja de BPA presentaron patrones anormales en sus ciclos estrales, posiblemente debido a alteraciones en los mecanismos de amplificación del pico de LHRH y/o LH.
- ✓ Ambas dosis de BPA alteraron en forma permanente el control hormonal de la expresión de ER α en los núcleos AvPv y Arc.

3) La exposición neonatal a BPA produjo importantes alteraciones en los mecanismos estrógeno-dependientes encargados de regir la conducta sexual en la rata hembra adulta:

- ✓ Ambas dosis de BPA desregularon en forma permanente el control hormonal de la expresión de ER α en los núcleos MPN y VMHvl.
- ✓ Ambas dosis de BPA provocaron un aumento en los niveles de expresión del represor específico de la acción estrogénica (REA) en el VMHvl.
- ✓ Severas alteraciones en la conducta sexual proceptiva, pero no en la conducta receptiva, fueron observadas en las ratas hembra adultas expuestas a BPA.

4) La exposición a DES produjo alteraciones en la dinámica poblacional de las células precursoras neurales en el giro dentado de ratas macho, pudiéndose destacar:

- ✓ Una caída en la actividad proliferativa de las CPN hipocampales en DPN8, y un incremento en la proliferación en DPN21.
- ✓ Solamente las CPN tipo-II expresaron la proteína p27^{kip1}, observándose un aumento de la expresión de p27^{kip1} en los animales expuestos a DES y una correlación inversa con la proliferación.
- ✓ En DPN8, una reducción en los niveles de transcritos hipocampales de VEGF fue observada en animales expuestos a DES en paralelo con una

reducción en la proliferación de las CPNs. Por el contrario, en DPN21 los niveles del ARNm de VEGF aumentaron junto con la proliferación de las CPNs.

- ✓ La expresión del ARNm de BDNF aumentó en los animales expuestos a DES en las dos edades estudiadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis intentan contribuir al conocimiento de los efectos de exposiciones a bajas concentraciones de perturbadores endocrinos ampliamente difundidos en el medioambiente, durante períodos del desarrollo posnatal altamente susceptibles. Estos resultados servirían para acrecentar la alerta sobre las consecuencias nocivas de los contaminantes químicos a los que a diario estamos expuestos. Además contribuyen en la toma de conciencia para promover la legislación de normas que minimizen o eviten totalmente la exposición a compuestos químicos con actividad hormonal comprobada, capaces de afectar la salud reproductiva de animales silvestres y del hombre.

7- Resumen

Machos y hembras de una misma especie de mamífero presentan diferentes patrones de conducta sexual y diferente fisiología neuroendocrina. Estas diferencias son tan vitales para la continuidad de la especie que distintos mecanismos de diferenciación han evolucionado para producir sistemas neurales diferentes pero a la vez complementarios, que aseguren la expresión coordinada de las funciones reproductivas. El principio central de la diferenciación sexual en numerosos mamíferos es que el cerebro es “bipotencial” y se desarrolla de forma diferente en machos y hembras bajo la influencia de hormonas esteroides sexuales durante el período perinatal.

Los estrógenos llevan a cabo sus funciones biológicas a través de los receptores de estrógeno, que incluyen principalmente al receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y el más reciente $ER\beta$. Ambos receptores tienen una alta expresión en estructuras límbicas y entre estos dos receptores se han demostrado importantes diferencias en su acción biológica tales como su afinidad por compuestos estrogénicos, las secuencias específicas de ADN reconocidas y los patrones tisulares de expresión. En la rata hembra adulta con ciclos estrales normales, un pico espontáneo en la concentración sérica de hormona luteinizante (LH) ocurre en la tarde del día del proestro. La liberación de este pico espontáneo preovulatorio de LH es provocado por la neurosecreción de la hormona liberadora de LH (LHRH) por parte de neuronas localizadas en su mayoría en el área preóptica hipotalámica. Estudios de la estructura del gen de LHRH indican que el mismo consta de cuatro exones cortos (denominados 1, 2, 3 y 4) intercalados por tres intrones (denominados A, B y C), siendo la remoción precisa y eficiente del intrón A un paso regulatorio clave en la regulación postranscripcional de la biosíntesis de LHRH. Para lograr un pico normal de LH es necesaria también la activación de receptores de esteroides en las neuronas de los núcleos anteroventral periventricular (AvPv) y arcuato (Arc). En coordinación con el pico de LH, la rata hembra adulta exhibe un repertorio de conductas sexuales. Estas son en parte reguladas mediante la activación hormonal del $ER\alpha$ y el receptor de progesterona (PR) en los núcleos medial preóptico (MPN) y ventromediano (VMHvl) siendo dos cofactores nucleares clave asociados a estos el coactivador de receptores de esteroides-1 (SRC-1) y el represor de la acción del ER (REA).

En los mamíferos, el hombre inclusive, la neurogénesis ocurre a lo largo de toda la vida. Las células progenitoras neuronales (CPN), localizadas en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado, proliferan y se integran en circuitos hipocámpicos y podrían estar involucradas en ciertas formas de aprendizaje dependiente del hipocampo. Los estrógenos han sido descritos como reguladores de la plasticidad sináptica, funciones cognitivas, memoria, humor y comportamiento; sin embargo, su rol en el control de la proliferación y diferenciación neuronal y glial no está completamente dilucidado. El factor de crecimiento del epitelio vascular (VEGF) fue propuesto como una molécula clave en la regulación de la neurogénesis, mediando los efectos del ambiente en la plasticidad del hipocampo durante la adultez. Por otro lado el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), es una neurotrofina involucrada en la plasticidad sináptica y la neuroprotección, cuya expresión se encuentra regulada por los estrógenos.

El descubrimiento de sustancias químicas con actividad agonista/antagonista de hormonas endógenas presentes en el medioambiente (perturbadores endocrinos) ha despertado el interés en conocer su relación con patologías reproductivas y del desarrollo en animales salvajes, especies de interés zotécnico y seres humanos. El bisfenol A (BPA) constituye un notable ejemplo de perturbador endocrino debido a su masiva utilización en la manufactura de plásticos y su amplia distribución. Por otro lado, el dietilstilbestrol (DES) es un estrógeno sintético que fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas para evitar abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. En 1971, se dejó de recetar DES debido a que se encontró que las mujeres expuestas *in utero* a DES exhibían anormalidades en el tracto reproductor, mayor predisposición a padecer cáncer e infertilidad. La exposición a xenoestrógenos durante períodos críticos del desarrollo embrionario y fetal, en concentraciones encontradas en el medio ambiente, produce efectos biológicos que pueden perdurar en el tiempo y manifestarse durante la edad adulta. Estos efectos biológicos no se limitarían a tejidos periféricos ya que se han encontrado alteraciones en el sistema nervioso central y en circuitos neuroendocrinos. Las alteraciones provocadas por la exposición a xenoestrógenos podrían modificar los patrones de secreción de hormonas hipofisarias y gonadales, predisponer al

desarrollo de trastornos proliferativos hormonodependientes, alterar las conductas sexuales y provocar deterioros en el aprendizaje dependiente del hipocampo en la edad adulta.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar la influencia de la exposición neonatal temprana a xenoestrógenos sobre el desarrollo del sistema límbico en ratas.

Para esto nos propusimos estudiar los efectos sobre estructuras hipotalámicas implicadas en la diferenciación sexual del cerebro.

- ✓ En crías recién nacidas y en animales pre-puberales evaluar los efectos sobre los mecanismos de diferenciación sexual del hipotálamo.
- ✓ Desarrollar un anticuerpo policlonal específico para evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión hipotalámica de REA.
- ✓ En ratas hembra adultas evaluar los efectos de la exposición neonatal a xenoestrógenos sobre los mecanismos sexualmente dimórficos encargados de regular la neuroendocrinología del ciclo estral y la conducta sexual.

En otra etapa del trabajo nos propusimos evaluar los efectos de la exposición posnatal temprana a xenoestrógenos sobre la neurogénesis hipocampal.

- ✓ Determinar los efectos sobre la dinámica poblacional de las células progenitoras neuronales (CPN) en el giro dentado de animales jóvenes.
- ✓ Evaluar los efectos sobre la expresión hipocámpica de factores de crecimiento estrógeno-dependientes.

Materiales y Métodos Las crías utilizadas fueron obtenidas de ratas Wistar hembra preñadas de forma sincronizada. Luego del parto (día postnatal 0, DPN0), las crías fueron sexadas y distribuidas entre distintas madres. Cada nueva camada fue asignada a uno de cuatro grupos experimentales: crías tratadas con vehículo (hembras control y machos control), DES (0,02 mg/kg de DES), BPA20 (20 mg/kg de BPA) y BPA.05 (0,05 mg/kg de BPA). Todas las crías recibieron inyecciones sc cada 48 h desde el DPN1 hasta el DPN7, de 40 µl de aceite de maíz solo o conteniendo la cantidad apropiada de DES o BPA.

En la primer etapa del trabajo se utilizaron hembras y machos control, y hembras expuestas a DES, BPA20 y BPA.05, y se estudiaron las edades de DPN8 y DPN21. Los animales fueron sacrificados 24 h luego de la última inyección (DPN8) o en DPN21. Se recogió la sangre troncal y se estudiaron los niveles séricos de estradiol en animales de DPN21 mediante radioinmunoensayo. Para inmunohistoquímica los cerebros fueron fijados y embebidos en parafina y se evaluó la expresión del ER α en el núcleo AvPv. Para la extracción de ácidos nucleicos el área preóptica hipotalámica fue disecada y mantenida a -80°C. Mediante RT-PCR en tiempo real se estudiaron los promotores de ER α activos y la expresión del ARNm total de ER α en el área preóptica. Para estudiar si los xenoestrógenos causan alteraciones mediante mecanismos de metilación diferencial del gen de ER α se utilizó la técnica de COBRA. Para ello, ADN genómico se extrajo de muestras de tejido del área preóptica y fue modificado químicamente con bisulfito de sodio. Las muestras modificadas fueron amplificadas por PCR y la metilación de las islas CpG fue estudiada mediante ensayos de restricción. Para estudiar la expresión del represor REA se diseñó un antígeno, el cual fue obtenido por PCR, clonado, expresado y luego inoculado en conejos. De la sangre de los conejos se purificaron las inmunoglobulinas y luego se obtuvo el anticuerpo policlonal específico para REA. La caracterización del mismo se realizó en hígado, mama e hipotálamo mediante western blot, doble inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

En la segunda etapa del trabajo se utilizaron ratas hembra de DPN85 de los grupos: control, BPA20 y BPA.05. Se estudiaron los efectos a largo plazo de la exposición neonatal a BPA sobre el ciclo estral mediante el seguimiento de la citología vaginal. Mediante un modelo de inducción estrogénica se estudió la producción del pico preovulatorio de LH en animales neonatalmente expuestos a BPA. El control postranscripcional de la expresión de LHRH se estudió en este modelo mediante RT-PCR en tiempo real, detectando la presencia citoplasmática de transcritos de LHRH que conservaran la secuencia del intrón A, y también se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión de los receptores ER α y PR, y sus cofactores de transcripción SRC-1 y REA, en los núcleos AvPv y Arc. En continuidad, evaluamos el efecto a largo plazo de la

exposición neonatal a BPA sobre los aspectos receptivos y proceptivos de la conducta sexual, y la respuesta estrógeno-dependiente de núcleos hipotalámicos implicados en el control de la conducta sexual. Para ello, hembras de los grupos mencionados fueron sometidas a un protocolo hormonal de inducción de la conducta sexual y luego colocadas con un macho experimentado en una jaula de observación para evaluar su desempeño sexual. Utilizando el modelo de inducción estrogénica del pico preovulatorio de LH estudiamos mediante inmunohistoquímica la expresión de los receptores ER α y PR, y sus cofactores de transcripción SRC-1 y REA, en los núcleos MPN y VMHvl. Mediante western blot se estudió la expresión diferencial de las isoformas de PR en el hipotálamo.

En la última etapa del trabajo se utilizaron ratas macho control y ratas macho expuestas neonatalmente a DES. En DPN8, machos de ambos grupos estudiados fueron inyectados ip con el análogo de la timidina, bromo-deoxiuridina (BrdU, 60mg/kg de peso). Para determinar el índice de proliferación de las CPN en DPN8 animales fueron sacrificados 4 h luego de la inyección de BrdU. Para analizar el índice de supervivencia de las CPN, otros animales fueron sacrificados en DPN21. Para evaluar la proliferación de las CPN dos semanas luego de finalizado el tratamiento con DES, otro grupo de animales fue inyectado con BrdU en DPN21 y sacrificado 4 h después. Para identificar el fenotipo de las células en estado inactivo o de proliferación, se desarrolló una segunda inmunomarcación luego de la detección de BrdU o p27^{kip1} utilizando anti-nestina, anti-calbindina, o anti-GFAP como segundo anticuerpo primario. La expresión hipocámpica de los mensajeros de VEGF y BDNF se evaluó mediante RT-PCR en tiempo real.

Resultados *Efectos de la exposición neonatal a BPA en hembras prepuberales.* En DPN8 observamos una mayor expresión del ARNm de ER α en el área preóptica hipotalámica de las hembras control respecto de los machos control y a hembras DES. La exposición neonatal a BPA produjo efectos opuestos dosis-dependientes: BPA20 disminuyó y BPA.05 incrementó la expresión hipotalámica del ARNm de ER α . En DPN21 la expresión hipotalámica del ARNm de ER α fue mayor en hembras BPA20 y BPA.05 respecto de las hembras control. Determinamos que en el área preóptica, la

expresión del gen ER α está regulada a través de los promotores OT, E1 y O. En DPN8, la expresión de estas variantes del gen ER α demostró ser sexualmente dimórfica. Las hembras DES presentaron bajos niveles de transcritos ER α -OT y ER α -O, y altos niveles de ER α -E1. En las hembras expuestas a BPA, la expresión de las variantes 5'UTR del gen ER α fue alterada de forma dosis-dependiente: BPA20 disminuyó el contenido de los transcritos ER α -OT y ER α -O, y aumentó la expresión de ER α -E1. En BPA.05 se observó un aumento en la expresión de ER α -E1. En DPN21, la expresión de transcritos de ER α -OT y ER α -O aumentó en las hembras DES, BPA20 y BPA.05. La expresión de ER α -E1 disminuyó en las hembras BPA20 y BPA.05. En esta edad, los machos control no presentaron diferencias con las hembras control en la expresión de los transcritos estudiados. En todos los grupos experimentales las islas CpG estudiadas en el exón 1 y en el promotor ER α -O no mostraron citosinas metiladas, mientras que por el contrario, el promotor ER α -OT presentó bajos niveles de metilación. Los niveles relativos de expresión de la proteína de ER α en el núcleo AvPv en animales de DPN8 fueron menores en machos, y en crías hembra expuestas a DES y BPA20. En el AvPv de hembras BPA.05 observamos un aumento en la expresión de ER α . En DPN21 los niveles de ER α en crías macho, hembras DES y hembras BPA20 se mantuvieron reducidos; mientras que en hembras BPA.05 se mantuvieron elevados. No se observaron diferencias en los niveles séricos de 17 β -estradiol entre ratas prepuberales de DPN21 de los distintos grupos.

Desarrollo de un anticuerpo específico para REA. Para estudiar la expresión de REA mediante inmunohistoquímica se amplificó por PCR una fracción antigénica de la secuencia del gen de REA, se clonó en un vector plasmídico y se expresó en *E.coli*. El antígeno purificado fue luego inoculado en conejos de los cuales se obtuvo el antisuero específico, el cual fue purificado mediante doble cromatografía y luego positivamente caracterizado en tejido de hígado, mama e hipotálamo utilizando las técnicas de western blot, doble inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

Efectos de la exposición neonatal a BPA en hembras adultas. Mediante el estudio de la citología vaginal determinamos que las hembras expuestas a BPA.05 presentan ciclos estrales alterados. Para evaluar la respuesta de la vía

estrogénica, en DPN85 los animales fueron OVX y sometidos a un modelo de estimulación estrogénica del pico de LH. En las hembras expuestas a BPA.05 se observó un pico de LH similar al observado en las hembras control, mientras que en las hembras BPA20 no se observó un pico normal de LH. Observamos que la exposición neonatal a BPA genera efectos opuestos dosis-dependientes sobre la expresión del ARNm maduro de LHRH en la etapa adulta. En hembras BPA20 los niveles del ARNm maduro de LHRH fueron menores, mientras que en hembras BPA.05 estos niveles fueron mayores que en los controles. Por el contrario, los niveles del ARN de LHRH que aún conserva el intrón A disminuyeron en ambos grupos expuestos a BPA. Utilizando inmunohistoquímica, observamos que en el AvPv la expresión de ER α fue mayor en las hembras BPA20 y BPA.05, mientras que en el Arc dicha expresión fue menor en ambos grupos. La expresión de la proteína de PR disminuyó en el AvPv de las hembras BPA.05 pero no fue afectada en el Arc de ninguno de los grupos expuestos a BPA. La expresión de SRC-1 en las hembras BPA.05 fue menor en el AvPv respecto de los controles. La expresión de REA en AvPv, y REA y SCR-1 en el Arc no mostró cambios en los grupos tratados con BPA. En el MPN, la expresión de ER α disminuyó a la mitad en los grupos BPA20 y BPA.05. Del mismo modo, en el VMHvl la expresión de ER α disminuyó en ambos grupos tratados con BPA. No se observaron cambios en la expresión de las variantes transcripcionales del PR (PR-A y PR-B) en el hipotálamo. La expresión de SRC-1 aumentó en el MPN y disminuyó en el VMHvl de hembras BPA.05. Por otro lado, observamos un aumento en la expresión de REA en BPA20 y BPA.05. Las respuestas de lordosis de las hembras BPA20 y BPA.05 fueron similares a las observadas en las hembras control. En las hembras BPA20 y BPA.05, la conducta proceptiva de saltos y corridas disminuyó aproximadamente a la mitad.

Efectos de la exposición neonatal a DES sobre la neurogénesis. Las células en proliferación fueron detectadas en la capa molecular, el hilus, la ZSG y en la porción interior de la capa de células granulares (CCG) del giro dentado. En DPN8, el tratamiento con DES disminuyó la proliferación celular. Las células precursoras que expresan nestina se clasifican en: CPN tipo-I y tipo-II. Utilizando doble IHQ, detectamos que tanto las CPN tipo-I como las tipo-II

están proliferando en machos controles y tratados con DES. En DPN8, la actividad proliferativa de las CPN disminuyó en los animales tratados con DES sin embargo, dicha disminución se observó sólo en las CPN tipo-II. En esta misma edad, observamos un posible efecto anti-apoptótico de la exposición neonatal a xenoestrógenos. En concordancia con lo anteriormente mencionado, se observó un aumento en la expresión de p27^{kip1} en la ZSG de machos DES. Demostramos que sólo las células tipo-II expresan p27^{kip1}, y que su expresión fue mayor en machos DES. En DPN21, el número de células BrdU-(+) remanentes fue mayor en los machos DES y el tratamiento con DES no alteró la proporción de células que expresan calbindina o GFAP. Al contrario de lo observado en DPN8, los machos DES inyectados con BrdU en DPN21 mostraron un aumento en el número de células BrdU-(+)/nestina(+). Además, los machos DES mostraron una disminución en la expresión de p27^{kip1}. En esta misma edad, no se observaron diferencias en el número de figuras apoptóticas. La expresión de ER α sólo fue observada en hilus y en ZSG, y no se observaron diferencias en el número o distribución de las células ER α (+) en DPN8 y DPN21. No se observaron diferencias en los volúmenes de la CCG y la ZSG. La exposición neonatal a DES disminuyó el ARNm de VEGF en el hipocampo de ratas de DPN8 y la aumentó en DPN21. Los niveles del ARNm de BDNF fueron mayores en machos DES en ambas edades estudiadas.

Conclusiones

- 1) La exposición neonatal a BPA y a DES altera la diferenciación sexual del área preóptica hipotalámica de la rata hembra, con las siguientes características:
 - ✓ La dosis alta de BPA y el DES masculinizan la expresión del ER α en el AvPv de las hembras prepuberales.
 - ✓ La perturbación producida por el BPA sobre la transcripción y traducción hipotalámica del ER α es dependiente de la dosis.
 - ✓ Tanto el BPA como el DES son capaces de desregular la transcripción de ER α utilizando promotores específicos.
 - ✓ De acuerdo a la dosis de exposición, el BPA es capaz de inhibir la transcripción de los promotores del gen de ER α .
 - ✓ La activación de los promotores del gen de ER α en animales expuestos a BPA y DES es dependiente del momento en que se realiza la evaluación.

- ✓ El BPA y el DES no alteran los patrones de metilación de los promotores activos del gen de ER α en hembras tratadas neonatalmente. La diferenciación sexual de la expresión del gen de ER α en los machos tampoco utilizaría un mecanismo de metilación diferencial.
 - ✓ Los niveles endógenos de estradiol no se vieron afectados en los animales prepúberes expuestos neonatalmente a los xenoestrógenos estudiados.
- 2) La exposición neonatal a BPA altera el procesado hipotalámico del pre-ARNm de LHRH y la respuesta estrógeno-dependiente de núcleos neuronales encargados de controlar el ciclo estral en la rata adulta, pudiéndose destacar las siguientes características:
- ✓ Las alteraciones observadas en la expresión y maduración del mensajero de LHRH hipotalámico fueron dependientes de la dosis de BPA utilizada.
 - ✓ En las hembras expuestas a BPA20 la menor expresión del ARNm de LHRH y los bajos niveles de LH en respuesta al estradiol, sugieren una alteración en el mecanismo estrogénico de feedback positivo en este grupo.
 - ✓ La mayor expresión del ARNm de LHRH y la producción de un pico normal de LH en respuesta al estradiol en las hembras expuestas a BPA.05, sugieren un mecanismo interno de compensación.
 - ✓ Las hembras expuestas a la dosis baja de BPA presentaron patrones anormales en sus ciclos estrales, posiblemente debido a alteraciones en los mecanismos de amplificación del pico de LHRH y/o LH.
 - ✓ Ambas dosis de BPA alteraron en forma permanente el control hormonal de la expresión de ER α en los núcleos AvPv y Arc.
- 3) La exposición neonatal a BPA produjo importantes alteraciones en los mecanismos estrógeno-dependientes encargados de regir la conducta sexual en la rata hembra adulta:
- ✓ Ambas dosis de BPA desregularon en forma permanente el control hormonal de la expresión de ER α en los núcleos MPN y VMHvl.
 - ✓ Ambas dosis de BPA provocaron un aumento en los niveles de expresión del represor específico de la acción estrogénica (REA) en el VMHvl.
 - ✓ Severas alteraciones en la conducta sexual proceptiva, pero no en la conducta receptiva, fueron observadas en las ratas hembra adultas expuestas a BPA.

- 4) La exposición a DES produjo alteraciones en la dinámica poblacional de las células precursoras neurales en el giro dentado de ratas macho, destacándose:
- ✓ Una caída en la actividad proliferativa de las CPN hipocampales en DPN8, y un incremento en DPN21.
 - ✓ Solamente las CPN tipo-II expresaron la proteína p27^{kip1}, observándose un aumento de la expresión de p27^{kip1} en los animales expuestos a DES y una correlación inversa con la proliferación.
 - ✓ En DPN8, una reducción en los niveles de transcritos hipocampales de VEGF fue observada en animales expuestos a DES en paralelo con una reducción en la proliferación de las CPNs. Por el contrario, en DPN21 los niveles del ARNm de VEGF aumentaron junto con la proliferación de las CPNs.
 - ✓ La expresión del ARNm de BDNF aumentó en los animales expuestos a DES en las dos edades estudiadas.

8- Abstract

Males and females of a species display distinct patterns of copulatory behaviors and neuroendocrine physiology. These distinctive responses are so vital to the success of mammalian species that robust developmental mechanisms have evolved to produce distinct yet complimentary neural systems that ensure the coordinated expression of reproductive function. The central tenet of sexual differentiation is that the brain is bipotential but develops differently in males and females under the influence of sex steroid hormones during the perinatal period.

Estrogens elicit their biological effects through estrogens receptors, mainly including estrogen receptor alpha (ER α) and the recent ER β . Both receptors are highly expressed in limbic structures and important differences on its biological actions have been reported between them, as their affinity for estrogenic compounds, DNA sequences recognized and tissue specific expression. In the normal cycling rat, a spontaneous surge of luteinizing hormone (LH) occurs in the afternoon of the day of proestrous. The release of this spontaneous LH preovulatory surge is triggered by the neurosecretion of LH-releasing hormone (LHRH) by neurons located in the preoptic area of the hypothalamus. Studies on LHRH gene structure have indicated that it consists of four short exons (denoted as 1, 2, 3, and 4) and three intervening introns (A, B and C), being the precise and efficient excision of intron A a key regulatory step for the post-transcriptional regulation of LHRH biosynthesis. Activation of steroid receptors in specific hypothalamic regions like the anteroventral periventricular nucleus (AvPv) and the arcuate nucleus (Arc) is also necessary to achieve a normal LH surge. In coordination with LH surge, female rats exhibit a repertoire of sexual behaviors. These are partly achieved by hormonal activation of ER α and progesterone receptor (PR) in the medial preoptic area (MPN) and the ventromedial nucleus (VMHv), being two key nuclear receptor-associated cofactors the steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) and the repressor of ER activity (REA).

Neurogenesis occurs throughout life in mammals including man. Neural precursor cells (NPC), located in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus, proliferate and integrate in hippocampal circuits and may be involved in certain forms of hippocampal-dependent learning. Estrogens have been shown

as regulators of synaptic plasticity, cognitive function, memory, mood and behavior; however, their roles in the control of neuronal and glial proliferation and differentiation are still not fully understood. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been proposed as a key molecule that could regulate neurogenesis, mediating the effects of environment on hippocampal plasticity during adulthood. In addition, brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin involved in synaptic plasticity and neuroprotection and its expression is estrogen-dependent.

The discovery of chemical compounds present in the environment with endogenous hormones agonistic/antagonistic activity (endocrine disruptors) has awakened the interest to know their relationship with reproductive pathologies and development in wild animals, species with zootecnical potential and humans. Bisphenol A (BPA) its a remarkable example of endocrine disruptor due to its wide employment in plastics manufacture and its broad distribution. In addition, diethylstilbestrol (DES) it's a synthetic estrogen that was extensively prescribed to pregnant women to prevent miscarriage. In 1971, DES prescription was suspended because women exposed *in utero* to DES exhibit genital tract abnormalities, higher cáncer predisposition and infertility later in life. Xenoestrogen exposure during critical periods of embrionary and fetal development, in environmentally relevant doses, produce biological effects that could last in time and become a problema in adult life. This biological effect is not restricted to peripheral tissues as alterations in the central nervous system and in neuroendocrine circuits has been reported. Alterations provoked by xenoestrogen exposure could modify hypophysial and gonadal hormones secretory patterns, predispose the development of proliferative hormone-dependent disorders, alter sexual behavior and deteriorate hippocampus-dependent learning in adulthood.

Objectives

The general objective of this work is to evaluate the influence of early neonatal xenoestrogen exposure on the development of the limbic system in rats.

To achieve this we proposed to study the effects of the exposure to high and low doses of xenoestrogens on hypothalamic structures in the sexual differentiation of the brain.

- ✓ Evaluating in newborn and prepubertal females the effects on the hypothalamic mechanisms of sexual differentiation.
- ✓ Developing a polyclonal antibody specific for the immunohistochemical evaluation of REA hypothalamic expression.
- ✓ In adult female rats evaluating the effects of neonatal xenoestrogen exposure on the sexually dimorphic mechanisms that regulates estrous cycle neuroendocrinology and sexual behavior.

In other stage of the present work we propose the evaluation of neonatal xenoestrogen exposure on hippocampal neurogenesis.

- ✓ Determining the effects on neural progenitor cells (NPC) population dynamics in the dentate gyrus of prepubertal animals.
- ✓ Evaluating the effects on the hippocampic expression of estrogen-dependent growth factors.

Material and Methods Pups were obtained from timely pregnant female Wistar rats. Upon delivery (postnatal day 0, PND0), pups were sexed and distributed among different mothers. Each new litter was assigned to one out of four experimental groups: corn oil vehicle treated pups (control females and control males), DES (0.02 mg/kg of DES), BPA20 (20 mg/kg of BPA) and BPA.05 (0.05 mg/kg of BPA). All pups received sc injections every 48 h from PND1 to PND7, with either 40 µl of corn oil alone or 40 µl of corn oil containing the appropriate amount of DES or BPA.

In the first stage of this work, control females, control males, and females exposed to DES, BPA20 and BPA.05 were used, and PND8 and PND21 ages were studied. Trunk blood was collected and estradiol serum levels were studied by radioimmunoassay. For immunohistochemistry, brains were fixed and embedded in paraffin and ER α expression in the AvPv was evaluated. For nucleic acid extraction, the hypothalamic preoptic area was dissected and stored at -80°C. Using real time RT-PCR we studied active ER α promoters and total ER α mRNA expression in the preoptic area. To study if xenoestrogens caused alterations through a differential methylation mechanism of ER α gene, a COBRA approach was used. To achieve this, genomic DNA was extracted from

preoptic area tissue blocks and it was chemically modified using sodium bisulfite. Modified samples were amplified by PCR and methylation of CpG islands was studied by means of restrictions assays. To study the expression of the repressor REA an antigen was designed. The antigen was obtained by PCR, cloned, expressed and inoculated in rabbits. Immunoglobulins were purified from rabbits's blood and the policlonal antibody raised against REA was then obtained. Characterization of this antibody was done in liver, mammary gland and hypothalamus using western blot, doble immunofluorescence and immunohistochemistry.

In the second stage of this work PND85 female rats of control, BPA20 and BPA.05 groups were used. Long term effects of neonatal exposure to BPA on the estrous cycle were studied through vaginal cytology. Using an estrogenic stimulation model we studied the induction of the preovulatory LH surge in females neonatally exposed to BPA. Whithin this model, postranscripcional control of LHRH expression was studied using real time RT-PCR, detecting cytoplasmic presence of LHRH transcripts bearing intron A sequence, and through immunohistochemistry we studied the expression of ER α and PR, and their expression cofactors SRC-1 and REA, in the nuclei AvPv and Arc. Then, we evaluated long term effects of neonatal exposure to BPA on the receptive and proceptive sexual behaviors, and the estrogen-dependent response of hypothalamic nuclei involved in the control of sexual behavior. To achieve this, females from the above mentioned groups were administred with a hormonal protocol to induce sexual behavior and were then placed with an experimented male stud in an observational cage to evaluate sexual performance. Using the above mentioned estrogenic stimulation model, through immunohistochemistry we studied the expression of ER α and PR, and their expression cofactors SRC-1 and REA, in the nuclei MPN and VMHvl.

In the last stage of this work we used male rats from control and DES exposed groups. In PND8, males from both groups were ip injected with the thymidine analog, bromodeoxyuridine (BrdU, 60mg/kg of body weight). To determine the NPC proliferation index animals were sacrificed 4 h after BrdU injection. To determine the NPC survival index, other animals were sacrificed in PND21. To

determine NPC proliferation two weeks after DES treatment, another set of animals was injected with BrdU on PND21 and sacrificed 4 h later.

To identify the immunophenotype of the proliferating or quiescent cells, a second round of immunolabeling was performed after BrdU or p27^{kip1} detection using anti-nestin, anti-calbindin, or anti-GFAP as a second primary antibody. Hippocampal expression of VEGF and BDNF mRNA was evaluated by real time RT-PCR.

Results *Effects of neonatal BPA exposure on prepubertal females.* In PND8, control females showed higher expression of ER α mRNA in the preoptic area than control males and DES females. BPA treatment showed opposite and dose-dependent effects: BPA20 decreased and BPA.05 increased hypothalamic ER α mRNA content. On PND21 in both BPA-exposed groups, ER α mRNA expression was clearly augmented. We determined that ER α gene transcription in the preoptic area is regulated by means of promoters OT, E1, and O. At PND8, expression of these ER α gene variants showed a great sexual dimorphism. DES females showed low levels of ER α -OT and ER α -O transcripts, and high levels of ER α -E1. BPA exposure showed a dose-dependent perturbation of ER α 5'UTR variant expression: BPA20 diminished ER α -OT and ER α -O transcript content and augmented the ER α -E1 expression. BPA.05 showed a rise in the expression of ER α -E1. In PND21, expression of transcripts of ER α -OT and ER α -O augmented in DES, BPA20 and BPA.05 females. ER α -E1 expression decreased in BPA20 and BPA.05 females. At this age, control males showed no differences in the studied transcripts compared to control females. In all experimental groups, exon 1 and promoter ER α -O were completely unmethylated, while the ER α -OT promoter presented low levels of methylation. ER α protein levels were reduced in the AvPv of male pups and in DES and BPA20 females. The AvPv of BPA.05 females showed a clear increase in ER α protein expression. In PND21 ER α protein levels remained reduced in male pups and in DES and BPA20 females; while in BPA.05 it were still increased. No differences in 17 β -estradiol serum levels were observed between prepubertal PND21 rats of all experimental groups.

Generation of a specific antibody against REA. To study REA expression by immunohistochemistry an antigenic fraction of REA gene was amplified by

PCR, cloned in a plasmidic vector and expressed in *E.coli*. The purified antigen was inoculated in rabbits, then antiserum was obtained and purified using double chromatography and characterized in liver, mammary gland and hypothalamic tissue using western blot, double immunofluorescence and immunohistochemistry techniques.

Effects of neonatal BPA exposure on adult females. Vaginal smears revealed that rats from the group BPA.05 presented abnormal estrous cycles. To evaluate the response of estrogenic pathways, animals were OVX in PND85 and subjected to a model of estrogenic stimulation of LH surge. In females exposed to BPA.05 an LH surge similar to the control females was observed, while in BPA20 females no LH surge was observed. We observed that BPA has an inverse dose-dependent effect on the expression of mature LHRH mRNA: LHRH mRNA levels were reduced in BPA20 females and increased in BPA.05. In contrast, levels of unprocessed intron A-containing LHRH RNA were reduced in both BPA-exposed groups. Using immunohistochemistry, we observed that expression of ER α was increased in the AvPv of BPA20 and BPA.05 females, while in the Arc this expression was decreased in both groups. PR expression decreased in the AvPv of BPA.05 females but remained unaltered in the Arc of both BPA exposed groups. SRC-1 expression was diminished in the AvPv of BPA.05 females. REA expression in the AvPv, and both REA and SRC-1 expression in the Arc were unaffected in both BPA exposed groups. In the MPN, ER α expression was decreased to half in BPA20 and BPA.05 groups. Similarly, ER α expression in the VMHvl diminished in both BPA exposed groups. No changes were observed in the hypothalamic expression of PR transcriptional variants (PR-A and PR-B). SRC-1 expression was increased in the MPN and decreased in the VMHvl of BPA.05 females. On the other hand, REA expression was augmented in the VMHvl of BPA20 and BPA.05. Lordosis response of both BPA exposed groups was similar to control females. In BPA exposed females, proceptive behavior of hops and darts was decreased to the half.

Effects of neonatal DES exposure on hippocampal neurogenesis. Proliferating cell were detected in the molecular layer, hilus, SGZ and in the internal portion of granular cell layer (GCL) of dentate gyrus. In PND8, DES exposure

decreased cellular proliferation. Precursor cells expressing nestin were classified in: NPC type-I and type-II. Using double IHQ, we observed that both NPC type-I and -II are proliferating in either control males or DES exposed males. In PND8, proliferative activity of NPC's was decreased in DES exposed males, however, such decrease was only observed in NPC type-II. At this age, we observed a possibly anti-apoptotic effect of neonatal xenoestrogen exposure. In agreement with this, we observed an augment in the expression of p27^{kip1} in the SGZ of DES males. We showed that p27^{kip1} is expressed only by NPC type-II, and such expression was increased in DES males. In PND21, the number of remaining BrdU-(+) cells was higher in DES males and DES exposure had no effect on the proportion of cells expressing calbindin or GFAP. Contrary to the observed in PND8, DES males injected with BrdU on PND21 showed an increment in the number of BrdU-(+)/nestin-(+) cells. Moreover, DES males showed a decrease in the expression of p27^{kip1}. At this age, no changes were observed in the number of apoptotic bodies. ER α expression was only observed in the hilus and in the SGZ, and no changes were observed in the number or distribution of ER α -(+) cells in PND8 and PND21. No changes were observed in the volumes of GCL and SGZ. Neonatal DES exposure decreased hippocampal VEGF mRNA expression in PND8 and augmented it in PND21. BDNF mRNA levels were increased in DES males in both ages studied.

Conclusions

- 1) Neonatal DES and BPA exposure alter sexual differentiation of hypothalamic preoptic area in female rats, with the following characteristics:
 - ✓ The high dose of BPA and DES masculinized ER α expression in the AvPv of prepubertal females.
 - ✓ BPA disruption of hypothalamic ER α transcription and transduction is dose-dependent.
 - ✓ Both BPA and DES are capable of deregulate ER α transcription using specific promoters.
 - ✓ According to dose, BPA exposure is able to inhibit transcription of specific ER α gene promoters.
 - ✓ Activation of ER α gene promoters in DES and BPA exposed females is time-dependent.

- ✓ Both BPA and DES caused no changes in the methylation patterns of active ER α gene promoters of females neonatally exposed.
 - ✓ Endogenous levels of estradiol were unchanged in prepubertal animals neonatally exposed to the xenoestrogens studied.
- 2) Neonatal BPA exposure alter hypothalamic processing of LHRH pre-mRNA and estrogen-dependent response of neuronal nuclei governing estrous cycle in adult female rat, with the following characteristics:
- ✓ Neonatal BPA exposure disrupted expression and maturation of hypothalamic LHRH mRNA in a dose-dependent fashion.
 - ✓ In BPA20 females, the decrease in the expression of LHRH mRNA and the lower levels of LH in response to estrogenic stimulation, suggests a disruption in the estrogen positive feedback mechanism.
 - ✓ The increase in the expression of LHRH mRNA and the production of a normal LH surge in females from BPA.05 group, suggests an internal mechanism of compensation.
 - ✓ Females exposed to the low dose of BPA presented altered patterns of estrous cyclicity, possibly due to alterations in the mechanisms of amplification of LHRH and/or LH surges.
 - ✓ Both BPA doses permanently altered the hormonal control of ER α expression in the AvPv and Arc nuclei.
- 3) Neonatal BPA exposure produced major alterations in the estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat, with the following characteristics:
- ✓ Both BPA doses permanently disrupted hormonal control of ER α expression in the MPN and VMHvl nuclei.
 - ✓ Both BPA doses provoked an increase in the expression levels of the repressor of estrogen receptor action (REA) in the VMHvl.
 - ✓ Severe alterations in proceptive sexual behavior, but not in receptive behavior, were observed in BPA exposed female rats.
- 4) DES exposure disrupted neural progenitor cells population dynamics in male rat's dentate gyrus, with the following characteristics:
- ✓ Proliferative activitie of hippocampal NPC decreased in PND8 and increased in PND21.

- ✓ Only NPC type-II expressed p27^{kip1}, observing an increase in p27^{kip1} expression in DES exposed males and an inverse correlation with proliferation.
- ✓ In PND8, a decrease in the levels of hippocampal VEGF mRNA was observed in DES exposed males in parallel with a decrease in NPC's proliferation. On the contrary, in PND21 levels of hippocampal VEGF mRNA increased together with NPC's proliferation.
- ✓ BDNF mRNA expression was increased in DES exposed females in both ages studied.

9- Bibliografía

Bibliografía

Acconcia, F.; Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Spisni, E.; Tomasi, V.; Trentalance, A.; Visca, P. y Marino, M. (2005) *Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol*. Mol.Biol.Cell 16: 231-237.

Adams, M. M.; Fink, S. E.; Shah, R. A.; Janssen, W. G.; Hayashi, S.; Milner, T. A.; McEwen, B. S. y Morrison, J. H. (2002) *Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats*. J.Neurosci. 22: 3608-3614.

Adelman, J. P.; Mason, A. J.; Hayflick, J. S. y Seeburg, P. H. (1986) *Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 83: 179-183.

Adewale, H. B.; Jefferson, W. N.; Newbold, R. R. y Patisaul, H. B. (2009) *Neonatal Bisphenol-A Exposure Alters Rat Reproductive Development and Ovarian Morphology Without Impairing Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons*. Biol.Reprod.

Aloisi, A. M.; Della, S. D.; Ceccarelli, I. y Farabollini, F. (2001) *Bisphenol-A differently affects estrogen receptors-alpha in estrous-cycling and lactating female rats*. Neurosci.Lett. 310: 49-52.

Antequera, F. y Bird, A. (1993) *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90: 11995-11999.

Arnold, A. P. y Gorski, R. A. (1984) *Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system*. Annu.Rev.Neurosci. 7: 413-442.

Bagot, C. N.; Troy, P. J. y Taylor, H. S. (2000) *Alteration of maternal Hoxa10 expression by in vivo gene transfection affects implantation*. Gene Ther. 7: 1378-1384.

Banasr, M.; Hery, M.; Brezun, J. M. y Daszuta, A. (2001) *Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus*. Eur.J.Neurosci. 14: 1417-1424.

Barfield, R. J. y Chen, J. J. (1977) *Activation of estrous behavior in ovariectomized rats by intracerebral implants of estradiol benzoate*. Endocrinology 101: 1716-1725.

Bond, C. T.; Hayflick, J. S.; Seeburg, P. H. y Adelman, J. P. (1989) *The rat gonadotropin-releasing hormone: SH locus: structure and hypothalamic expression*. Mol.Endocrinol. 3: 1257-1262.

- Bora, S. H.; Liu, Z.; Kecojevic, A.; Merchenthaler, I. y Koliatsos, V. E. (2005) *Direct, complex effects of estrogens on basal forebrain cholinergic neurons*. Exp.Neurol. 194: 506-522.
- Bosquiazzo, V. L.; Varayoud, J.; Munoz-De-Toro, M.; Luque, E. H. y Ramos, J. G. (2009) *Effects of Neonatal Exposure to Bisphenol A on Steroid Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Endothelial Cell Proliferation in the Adult Rat Uterus*. Biol.Reprod.
- Boulware, M. I.; Kordasiewicz, H. y Mermelstein, P. G. (2007) *Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons*. J.Neurosci. 27: 9941-9950.
- Brede, C.; Fjeldal, P.; Skjevrak, I. y Herikstad, H. (2003) *Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing*. Food Addit.Contam 20: 684-689.
- Broca, P. (1878) *Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: Le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série mammiférés*. Rev Anthropol 1: 385-498.
- Calafat, A. M.; Kuklennyik, Z.; Reidy, J. A.; Caudill, S. P.; Ekong, J. y Needham, L. L. (2005) *Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population*. Environ.Health Perspect. 113: 391-395.
- Calafat, A. M.; Ye, X.; Wong, L. Y.; Reidy, J. A. y Needham, L. L. (2008) *Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004*. Environ.Health Perspect. 116: 39-44.
- Caligaris, L.; Astrada, J. J. y Taleisnik, S. (1971) *Release of luteinizing hormone induced by estrogen injection into ovariectomized rats*. Endocrinology 88: 810-815.
- Cao, L.; Jiao, X.; Zuzga, D. S.; Liu, Y.; Fong, D. M.; Young, D. y Doring, M. J. (2004) *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. Nat.Genet. 36: 827-835.
- Carr, R.; Bertasi, F.; Betancourt, A.; Bowers, S.; Gandy, B. S.; Ryan, P. y Willard, S. (2003) *Effect of neonatal rat bisphenol a exposure on performance in the Morris water maze*. J.Toxicol.Environ.Health A 66: 2077-2088.
- Caviness, V. S., Jr.; Takahashi, T. y Nowakowski, R. S. (1999) *The G1 restriction point as critical regulator of neocortical neuronogenesis*. Neurochem.Res. 24: 497-506.
- Ceccarelli, I.; Della, S. D.; Fiorenzani, P.; Farabollini, F. y Aloisi, A. M. (2007) *Estrogenic chemicals at puberty change ERalpha in the hypothalamus of male and female rats*. Neurotoxicol.Teratol. 29: 108-115.

- Chappell, P. E. y Levine, J. E. (2000) *Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors*. *Endocrinology* 141: 1477-1485.
- Chiba, S.; Suzuki, M.; Yamanouchi, K. y Nishihara, M. (2007) *Involvement of granulin in estrogen-induced neurogenesis in the adult rat hippocampus*. *J.Reprod.Dev.* 53: 297-307.
- Choleris, E.; Ogawa, S.; Kavaliers, M.; Gustafsson, J. A.; Korach, K. S.; Muglia, L. J. y Pfaff, D. W. (2006) *Involvement of estrogen receptor alpha, beta and oxytocin in social discrimination: A detailed behavioral analysis with knockout female mice*. *Genes Brain Behav.* 5: 528-539.
- Christie, B. R. y Cameron, H. A. (2006) *Neurogenesis in the adult hippocampus*. *Hippocampus* 16: 199-207.
- Ciaroni, S.; Cuppini, R.; Cecchini, T.; Ferri, P.; Ambrogini, P.; Cuppini, C. y Del Grande, P. (1999) *Neurogenesis in the adult rat dentate gyrus is enhanced by vitamin E deficiency*. *J.Comp Neurol.* 411: 495-502.
- Clark, S. J. y Melki, J. (2002) *DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?* *Oncogene* 21: 5380-5387.
- Cooper-Kuhn, C. M.; Winkler, J. y Kuhn, H. G. (2004) *Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat*. *J.Neurosci.Res.* 77: 155-165.
- Cordoba Montoya, D. A. y Carrer, H. F. (1997) *Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats*. *Brain Res.* 778: 430-438.
- Couse, J. F.; Dixon, D.; Yates, M.; Moore, A. B.; Ma, L.; Maas, R. y Korach, K. S. (2001) *Estrogen receptor-alpha knockout mice exhibit resistance to the developmental effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on the female reproductive tract*. *Dev.Biol.* 238: 224-238.
- Couse, J. F.; Yates, M. M.; Walker, V. R. y Korach, K. S. (2003) *Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta*. *Mol.Endocrinol.* 17: 1039-1053.
- Cowley, S. M. y Parker, M. G. (1999) *A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta*. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 69: 165-175.
- Crespo, D.; Stanfield, B. B. y Cowan, W. M. (1986) *Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus*. *Exp.Brain Res.* 62: 541-548.
- Davies, A. M. (1994) *The role of neurotrophins in the developing nervous system*. *J.Neurobiol.* 25: 1334-1348.
- Delage-Mourroux, R.; Martini, P. G.; Choi, I.; Kraichely, D. M.; Hoeksema, J. y Katzenellenbogen, B. S. (2000) *Analysis of estrogen receptor interaction with a*

- repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA.* J.Biol.Chem. 275: 35848-35856.
- Diel, P.; Schmidt, S.; Vollmer, G.; Janning, P.; Upmeier, A.; Michna, H.; Bolt, H. M. y Degen, G. H. (2004) *Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens.* Arch.Toxicol. 78: 183-193.
- Dobrzycka, K. M.; Townson, S. M.; Jiang, S. y Oesterreich, S. (2003) *Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer?* Endocr.Relat Cancer 10: 517-536.
- Doetsch, F.; Verdugo, J. M.; Caille, I.; Alvarez-Buylla, A.; Chao, M. V. y Casaccia-Bonnel, P. (2002) *Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis.* J.Neurosci. 22: 2255-2264.
- Domoradzki, J. Y.; Thornton, C. M.; Pottenger, L. H.; Hansen, S. C.; Card, T. L.; Markham, D. A.; Dryzga, M. D.; Shiotsuka, R. N. y Waechter, J. M., Jr. (2004) *Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal sprague-dawley rats following oral administration.* Toxicol.Sci. 77: 230-242.
- Donaghy, C.; Westley, B. R. y May, F. E. (1999) *Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen.* Mol.Endocrinol. 13: 1934-1950.
- DonCarlos, L. L.; McAbee, M.; Ramer-Quinn, D. S. y Stancik, D. M. (1995) *Estrogen receptor mRNA levels in the preoptic area of neonatal rats are responsive to hormone manipulation.* Brain Res.Dev.Brain Res. 84: 253-260.
- Dubal, D. B.; Zhu, H.; Yu, J.; Rau, S. W.; Shughrue, P. J.; Merchenthaler, I.; Kindy, M. S. y Wise, P. M. (2001) *Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98: 1952-1957.
- Durando, M.; Kass, L.; Piva, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A. M.; Luque, E. H. y Munoz-De-Toro, M. (2007) *Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats.* Environ.Health Perspect. 115: 80-86.
- Edwards, D. A. y Pfeifle, J. K. (1983) *Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation.* Physiol Behav. 30: 437-443.
- Emsley, J. G.; Mitchell, B. D.; Kempermann, G. y Macklis, J. D. (2005) *Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells.* Prog.Neurobiol. 75: 321-341.
- Engel, S. M.; Levy, B.; Liu, Z.; Kaplan, D. y Wolff, M. S. (2006) *Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid.* Reprod.Toxicol. 21: 110-112.

- Eriksson, P. S.; Perfilieva, E.; Bjork-Eriksson, T.; Alborn, A. M.; Nordborg, C.; Peterson, D. A. y Gage, F. H. (1998) *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat.Med. 4: 1313-1317.
- Erskine, M. S. (1989) *Solicitation behavior in the estrous female rat: a review*. Horm.Behav. 23: 473-502.
- European-Union (2003) *Risk Assessment Report-4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol A)*. http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/bisphenolareport325.pdf.
- Farabollini, F.; Porrini, S.; Della, S. D.; Bianchi, F. y Dessi-Fulgheri, F. (2002) *Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats*. Environ.Health Perspect. 110 Suppl 3: 409-414.
- Fernandez, M.; Bianchi, M.; Lux-Lantos, V. y Libertun, C. (2009) *Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats*. Environ.Health Perspect. 117: 757-762.
- Fernandez, M. F.; Arrebola, J. P.; Taoufiki, J.; Navalon, A.; Ballesteros, O.; Pulgar, R.; Vilchez, J. L. y Olea, N. (2007) *Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women*. Reprod.Toxicol. 24: 259-264.
- Filippov, V.; Kronenberg, G.; Pivneva, T.; Reuter, K.; Steiner, B.; Wang, L. P.; Yamaguchi, M.; Kettenmann, H. y Kempermann, G. (2003) *Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes*. Mol.Cell Neurosci. 23: 373-382.
- Flouriot, G.; Griffin, C.; Kenealy, M.; Sonntag-Buck, V. y Gannon, F. (1998) *Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage*. Mol.Endocrinol. 12: 1939-1954.
- Freyschuss, B. y Grandien, K. (1996) *The 5' flank of the rat estrogen receptor gene: structural characterization and evidence for tissue- and species-specific promoter utilization*. J.Mol.Endocrinol. 17: 197-206.
- Fujimoto, T.; Kubo, K. y Aou, S. (2006) *Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats*. Brain Res. 1068: 49-55.
- Funabashi, T.; Kleopoulos, S. P.; Brooks, P. J.; Kimura, F.; Pfaff, D. W.; Shinohara, K. y Mobbs, C. V. (2000) *Changes in estrogenic regulation of estrogen receptor alpha mRNA and progesterone receptor mRNA in the female rat hypothalamus during aging: an in situ hybridization study*. Neurosci.Res. 38: 85-92.
- Galea, L. A. (2008) *Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents*. Brain Res.Rev. 57: 332-341.

Gerall AA & Givon L 1992 Early androgen and age-related modifications in female rat reproduction. In *Handbook of Behavioral Neurobiology*, pp 313-354. New York: Plenum.

Gore, A. C. y Roberts, J. L. (1997) *Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro*. *Front Neuroendocrinol.* 18: 209-245.

Gorski, R. A.; Gordon, J. H.; Shryne, J. E. y Southam, A. M. (1978) *Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain*. *Brain Res.* 148: 333-346.

Gorski RA & Jacobson CD 1981 Sexual differentiation of the brain. In *Clinics in Andrology*, pp 109-134. Eds SJ Kogan & ESE Hafez. The Hague: Martinus Nijhoff.

Gould, E. y Tanapat, P. (1999) *Stress and hippocampal neurogenesis*. *Biol.Psychiatry* 46: 1472-1479.

Grandien, K. (1996) *Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform*. *Mol.Cell Endocrinol.* 116: 207-212.

Grandien, K.; Backdahl, M.; Ljunggren, O.; Gustafsson, J. A. y Berkenstam, A. (1995) *Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines*. *Endocrinology* 136: 2223-2229.

Grandien, K. F.; Berkenstam, A.; Nilsson, S. y Gustafsson, J. A. (1993) *Localization of DNase I hypersensitive sites in the human oestrogen receptor gene correlates with the transcriptional activity of two differentially used promoters*. *J.Mol.Endocrinol.* 10: 269-277.

Gu, Q. y Moss, R. L. (1996) *17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade*. *J.Neurosci.* 16: 3620-3629.

Gundersen, H. J.; Bendtsen, T. F.; Korbo, L.; Marcussen, N.; Moller, A.; Nielsen, K.; Nyengaard, J. R.; Pakkenberg, B.; Sorensen, F. B.; Vesterby, A. y . (1988) *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. *APMIS* 96: 379-394.

Hall, J. M.; Couse, J. F. y Korach, K. S. (2001) *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling*. *J.Biol.Chem.* 276: 36869-36872.

Hamada, T.; Wada-Kiyama, Y. y Sakuma, Y. (2005) *Visualizing forebrain-specific usage of an estrogen receptor alpha promoter for receptor downregulation in the rat*. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 139: 42-51.

Han, J.; Seong, J. Y.; Kim, K.; Wuttke, W. y Jarry, H. (2001) *Analysis of exonic splicing enhancers in the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene*. *Mol.Cell Endocrinol.* 173: 157-166.

- Hart, S. A.; Snyder, M. A.; Smejkalova, T. y Woolley, C. S. (2007) *Estrogen mobilizes a subset of estrogen receptor-alpha-immunoreactive vesicles in inhibitory presynaptic boutons in hippocampal CA1*. J.Neurosci. 27: 2102-2111.
- Hastings, N. B. y Gould, E. (1999) *Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells*. J.Comp Neurol. 413: 146-154.
- Herath, C. B.; Watanabe, G.; Katsuda, S.; Yoshida, M.; Suzuki, A. K. y Taya, K. (2001) *Exposure of neonatal female rats to p-tert-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood*. Biol.Reprod. 64: 1216-1224.
- Herbst, A. L.; Ulfelder, H. y Poskanzer, D. C. (1971) *Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women*. N.Engl.J.Med. 284: 878-881.
- Herman, J. G. y Baylin, S. B. (2003) *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N.Engl.J.Med. 349: 2042-2054.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. y Watson, R. (1993) *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N.Y.) 11: 1026-1030.
- Hirata, S.; Koh, T.; Yamada-Mouri, N.; Hoshi, K. y Kato, J. (1996a) *The untranslated first exon 'exon 0S' of the rat estrogen receptor (ER) gene*. FEBS Lett. 394: 371-373.
- Hirata, S.; Koh, T.; Yamada-Mouri, N. y Kato, J. (1996b) *The novel untranslated first exon "exon 0N" of the rat estrogen receptor gene*. Biochem.Biophys.Res.Comm. 225: 849-854.
- Ho, S. M.; Tang, W. Y.; Belmonte, d. F. y Prins, G. S. (2006) *Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4*. Cancer Res. 66: 5624-5632.
- Horwitz, K. B.; Jackson, T. A.; Bain, D. L.; Richer, J. K.; Takimoto, G. S. y Tung, L. (1996) *Nuclear receptor coactivators and corepressors*. Mol.Endocrinol. 10: 1167-1177.
- Hoshina, Y.; Takeo, T.; Nakano, K.; Sato, T. y Sakuma, Y. (1994) *Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior*. Behav.Brain Res. 61: 197-204.
- Hsieh-Li, H. M.; Witte, D. P.; Weinstein, M.; Branford, W.; Li, H.; Small, K. y Potter, S. S. (1995) *Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility*. Development 121: 1373-1385.

Hughes, T. A. (2006) *Regulation of gene expression by alternative untranslated regions*. Trends Genet. 22: 119-122.

Ikeda, Y.; Nagai, A.; Ikeda, M. A. y Hayashi, S. (2003) *Sexually dimorphic and estrogen-dependent expression of estrogen receptor beta in the ventromedial hypothalamus during rat postnatal development*. Endocrinology 144: 5098-5104.

Integrated Risk Information System (1993) *Bisphenol A (CASRN 80-05-7)*.

Isgor, C. y Sengelaub, D. R. (1998) *Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats*. Horm.Behav. 34: 183-198.

Jakubowski, M. y Roberts, J. L. (1994) *Processing of gonadotropin-releasing hormone gene transcripts in the rat brain*. J.Biol.Chem. 269: 4078-4083.

Jin, K.; Zhu, Y.; Sun, Y.; Mao, X. O.; Xie, L. y Greenberg, D. A. (2002) *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99: 11946-11950.

Kalita, K.; Szymczak, S. y Kaczmarek, L. (2005) *Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats*. Hippocampus 15: 404-412.

Kaplan, M. S. y Hinds, J. W. (1977) *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs*. Science 197: 1092-1094.

Karishma, K. K. y Herbert, J. (2002) *Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression*. Eur.J.Neurosci. 16: 445-453.

Kass, L.; Varayoud, J.; Ortega, H.; Munoz, D. T. y Luque, E. H. (2000) *Detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissue. DNA denaturation following microwave or enzymatic digestion pretreatment is required*. Eur.J.Histochem. 44: 185-191.

Kastner, P.; Krust, A.; Turcotte, B.; Stropp, U.; Tora, L.; Gronemeyer, H. y Chambon, P. (1990) *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. EMBO J. 9: 1603-1614.

Kato, A. y Sakuma, Y. (2000) *Neuronal activity in female rat preoptic area associated with sexually motivated behavior*. Brain Res. 862: 90-102.

Kato, J.; Hirata, S.; Koh, T.; Yamada-Mouri, N.; Hoshi, K. y Okinaga, S. (1998) *The multiple untranslated first exons and promoters system of the oestrogen receptor gene in the brain and peripheral tissues of the rat and monkey and the developing rat cerebral cortex*. J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 65: 281-293.

- Katzenellenbogen, J. A.; O'Malley, B. W. y Katzenellenbogen, B. S. (1996) *Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones*. Mol.Endocrinol. 10: 119-131.
- Kelly, M. J. y Ronnekleiv, O. K. (2008) *Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons*. Mol.Cell Endocrinol. 290: 14-23.
- Khurana, S.; Ranmal, S. y Ben Jonathan, N. (2000) *Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression*. Endocrinology 141: 4512-4517.
- Koike, S.; Sakai, M. y Muramatsu, M. (1987) *Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA*. Nucleic Acids Res. 15: 2499-2513.
- Kos, M.; Reid, G.; Denger, S. y Gannon, F. (2001) *Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region*. Mol.Endocrinol. 15: 2057-2063.
- Kraus, W. L.; Montano, M. M. y Katzenellenbogen, B. S. (1994) *Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene*. Mol.Endocrinol. 8: 952-969.
- Krey, L. C.; Tyrey, L. y Everett, J. W. (1973) *The estrogen-induced advance in the cyclic LH surge in the rat: dependency on ovarian progesterone secretion*. Endocrinology 93: 385-390.
- Kronenberg, G.; Reuter, K.; Steiner, B.; Brandt, M. D.; Jessberger, S.; Yamaguchi, M. y Kempermann, G. (2003) *Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli*. J.Comp Neurol. 467: 455-463.
- Krust, A.; Green, S.; Argos, P.; Kumar, V.; Walter, P.; Bornert, J. M. y Chambon, P. (1986) *The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors*. EMBO J. 5: 891-897.
- Kuhn, H. G.; Dickinson-Anson, H. y Gage, F. H. (1996) *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation*. J.Neurosci. 16: 2027-2033.
- Kuiper, G. G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S. y Gustafsson, J. A. (1997) *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology 138: 863-870.
- Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Nilsson, S. y Gustafsson, J. A. (1996) *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93: 5925-5930.

- Kuo, H. W. y Ding, W. H. (2004) *Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry*. J.Chromatogr.A 1027: 67-74.
- Kurtev, V.; Margueron, R.; Kroboth, K.; Ogris, E.; Cavailles, V. y Seiser, C. (2004) *Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases*. J.Biol.Chem. 279: 24834-24843.
- Kuruto-Niwa, R.; Tateoka, Y.; Usuki, Y. y Nozawa, R. (2007) *Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum*. Chemosphere 66: 1160-1164.
- Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L.; Scanlan, T. S.; Shiau, A. K.; Uht, R. M. y Webb, P. (2000) *Estrogen receptor pathways to AP-1*. J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 74: 311-317.
- Kwon, S.; Stedman, D. B.; Elswick, B. A.; Cattley, R. C. y Welsch, F. (2000) *Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development*. Toxicol.Sci. 55: 399-406.
- Laflamme, N.; Nappi, R. E.; Drolet, G.; Labrie, C. y Rivest, S. (1998) *Expression and neuroptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype*. J.Neurobiol. 36: 357-378.
- Lauber, A. H.; Romano, G. J. y Pfaff, D. W. (1991) *Sex difference in estradiol regulation of progestin receptor mRNA in rat mediobasal hypothalamus as demonstrated by in situ hybridization*. Neuroendocrinology 53: 608-613.
- Leuner, B.; Gould, E. y Shors, T. J. (2006) *Is there a link between adult neurogenesis and learning?* Hippocampus 16: 216-224.
- Levine, E. S.; Dreyfus, C. F.; Black, I. B. y Plummer, M. R. (1995) *Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92: 8074-8077.
- Levine, J. E. (1997) *New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats*. Biol.Reprod. 56: 293-302.
- Levine, J. E. y Ramirez, V. D. (1980) *In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalami of ovariectomized, steroid-primed rats*. Endocrinology 107: 1782-1790.
- Li, L.; Haynes, M. P. y Bender, J. R. (2003a) *Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100: 4807-4812.
- Li, S.; Hansman, R.; Newbold, R.; Davis, B.; McLachlan, J. A. y Barrett, J. C. (2003b) *Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-*

fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus. Mol.Carcinog. 38: 78-84.

Lie, D. C.; Song, H.; Colamarino, S. A.; Ming, G. L. y Gage, F. H. (2004) *Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases.* Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 44: 399-421.

Luine, V. N. (1997) *Steroid Hormone Modulation of Hippocampal Dependent Spatial Memory.* Stress. 2: 21-36.

Luine, V. N.; Richards, S. T.; Wu, V. Y. y Beck, K. D. (1998) *Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters.* Horm.Behav. 34: 149-162.

Maffini, M. V.; Rubin, B. S.; Sonnenschein, C. y Soto, A. M. (2006) *Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A.* Mol.Cell Endocrinol. 254-255: 179-186.

Maguire, E. A.; Mummery, C. J. y Buchel, C. (2000) *Patterns of hippocampal-cortical interaction dissociate temporal lobe memory subsystems.* Hippocampus 10: 475-482.

Mani, S. K.; Reyna, A. M.; Chen, J. Z.; Mulac-Jericevic, B. y Conneely, O. M. (2006) *Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity.* Mol.Endocrinol. 20: 1322-1332.

Marin Bivens, C. L. y Olster, D. H. (1997) *Abnormal estrous cyclicity and behavioral hyporesponsiveness to ovarian hormones in genetically obese Zucker female rats.* Endocrinology 138: 143-148.

Marino, M. y Ascenzi, P. (2006) *Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation.* IUBMB.Life 58: 716-719.

Markey, C. M.; Luque, E. H.; Munoz, D. T.; Sonnenschein, C. y Soto, A. M. (2001) *In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland.* Biol.Reprod. 65: 1215-1223.

Matsumoto, J.; Yokota, H. y Yuasa, A. (2002) *Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy.* Environ.Health Perspect. 110: 193-196.

Matsuzaki, H.; Tamatani, M.; Yamaguchi, A.; Namikawa, K.; Kiyama, H.; Vitek, M. P.; Mitsuda, N. y Tohyama, M. (2001) *Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades.* FASEB J. 15: 1218-1220.

McAbee, M. D. y DonCarlos, L. L. (1999a) *Estrogen, but not androgens, regulates androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in the developing male rat forebrain.* Endocrinology 140: 3674-3681.

- McAbee, M. D. y DonCarlos, L. L. (1999b) *Regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in the developing rat forebrain*. Endocrinology 140: 1807-1814.
- McAllister, A. K. (1999) *Subplate neurons: a missing link among neurotrophins, activity, and ocular dominance plasticity?* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96: 13600-13602.
- McAllister, A. K.; Katz, L. C. y Lo, D. C. (1999) *Neurotrophins and synaptic plasticity*. Annu.Rev Neurosci. 22: 295-318.
- McEwen, B. S. (1983) *Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation*. Int.Rev Physiol 27: 99-145.
- McEwen, B. S. y Alves, S. E. (1999) *Estrogen actions in the central nervous system*. Endocr.Rev. 20: 279-307.
- McInerney, E. M.; Tsai, M. J.; O'Malley, B. W. y Katzenellenbogen, B. S. (1996) *Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93: 10069-10073.
- Meijer, O. C.; Steenbergen, P. J. y de Kloet, E. R. (2000) *Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-2 in brain and pituitary*. Endocrinology 141: 2192-2199.
- Melnick, R.; Lucier, G.; Wolfe, M.; Hall, R.; Stancel, G.; Prins, G.; Gallo, M.; Reuhl, K.; Ho, S. M.; Brown, T.; Moore, J.; Leakey, J.; Haseman, J. y Kohn, M. (2002) *Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review*. Environ.Health Perspect. 110: 427-431.
- Mericskay, M.; Carta, L. y Sassoon, D. (2005) *Diethylstilbestrol exposure in utero: a paradigm for mechanisms leading to adult disease*. Birth Defects Res.A Clin.Mol.Teratol. 73: 133-135.
- Micevych, P.; Sinchak, K.; Mills, R. H.; Tao, L.; LaPolt, P. y Lu, J. K. (2003) *The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats*. Neuroendocrinology 78: 29-35.
- Miller, C.; Degenhardt, K. y Sassoon, D. A. (1998) *Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis*. Nat.Genet. 20: 228-230.
- Milner, T. A.; Ayoola, K.; Drake, C. T.; Herrick, S. P.; Tabori, N. E.; McEwen, B. S.; Warriar, S. y Alves, S. E. (2005) *Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation*. J.Comp Neurol. 491: 81-95.
- Milner, T. A.; McEwen, B. S.; Hayashi, S.; Li, C. J.; Reagan, L. P. y Alves, S. E. (2001) *Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites*. J.Comp Neurol. 429: 355-371.

- Mohapel, P.; Leanza, G.; Kokaia, M. y Lindvall, O. (2005) *Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning*. Neurobiol.Aging 26: 939-946.
- Molenda, H. A.; Griffin, A. L.; Auger, A. P.; McCarthy, M. M. y Tetel, M. J. (2002) *Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats*. Endocrinology 143: 436-444.
- Molenda-Figueira, H. A.; Murphy, S. D.; Shea, K. L.; Siegal, N. K.; Zhao, Y.; Chadwick, J. G., Jr.; Denner, L. A. y Tetel, M. J. (2008) *Steroid receptor coactivator-1 from brain physically interacts differentially with steroid receptor subtypes*. Endocrinology 149: 5272-5279.
- Monje, L.; Varayoud, J.; Luque, E. H. y Ramos, J. G. (2007) *Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area*. J.Endocrinol. 194: 201-212.
- Monje, L.; Varayoud, J.; Munoz-De-Toro, M.; Luque, E. H. y Ramos, J. G. (2009) *Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat*. Reprod.Toxicol. 28: 435-442.
- Montano, M. M.; Ekena, K.; Delage-Mourroux, R.; Chang, W.; Martini, P. y Katzenellenbogen, B. S. (1999) *An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96: 6947-6952.
- Montaron, M. F.; Petry, K. G.; Rodriguez, J. J.; Marinelli, M.; Aourousseau, C.; Rougon, G.; Le Moal, M. y Abrous, D. N. (1999) *Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus*. Eur.J.Neurosci. 11: 1479-1485.
- Moors, S.; Blaszkewicz, M.; Bolt, H. M. y Degen, G. H. (2007) *Simultaneous determination of daidzein, equol, genistein and bisphenol A in human urine by a fast and simple method using SPE and GC-MS*. Mol.Nutr.Food Res. 51: 787-798.
- Munoz-De-Toro, M.; Durando, M.; Beldomenico, P. M.; Beldomenico, H. R.; Kass, L.; Garcia, S. R. y Luque, E. H. (2006) *Estrogenic microenvironment generated by organochlorine residues in adipose mammary tissue modulates biomarker expression in ERalpha-positive breast carcinomas*. Breast Cancer Res. 8: R47.
- Munoz-De-Toro, M.; Markey, C. M.; Wadia, P. R.; Luque, E. H.; Rubin, B. S.; Sonnenschein, C. y Soto, A. M. (2005) *Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice*. Endocrinology 146: 4138-4147.

Murakami, K.; Ohashi, A.; Hori, H.; Hibiya, M.; Shoji, Y.; Kunisaki, M.; Akita, M.; Yagi, A.; Sugiyama, K.; Shimozato, S.; Ito, K.; Takahashi, H.; Takahashi, K.; Yamamoto, K.; Kasugai, M.; Kawamura, N.; Nakai, S.; Hasegawa, M.; Tomita, M.; Nabeshima, K.; Hiki, Y. y Sugiyama, S. (2007) *Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients*. *Blood Purif.* 25: 290-294.

Musatov, S.; Chen, W.; Pfaff, D. W.; Kaplitt, M. G. y Ogawa, S. (2006) *RNAi-mediated silencing of estrogen receptor {alpha} in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviors*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103: 10456-10460.

Mussi, P.; Liao, L.; Park, S. E.; Ciana, P.; Maggi, A.; Katzenellenbogen, B. S.; Xu, J. y O'Malley, B. W. (2006) *Haploinsufficiency of the corepressor of estrogen receptor activity (REA) enhances estrogen receptor function in the mammary gland*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103: 16716-16721.

Naylor, M.; Bowen, K. K.; Sailor, K. A.; Dempsey, R. J. y Vemuganti, R. (2005) *Preconditioning-induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus*. *Neurochem.Int.* 47: 565-572.

Nishizawa, H.; Morita, M.; Sugimoto, M.; Imanishi, S. y Manabe, N. (2005) *Effects of in utero exposure to bisphenol A on mRNA expression of arylhydrocarbon and retinoid receptors in murine embryos*. *J.Reprod.Dev.* 51: 315-324.

Niswender, G. D.; Midgley, A. R., Jr.; Monroe, S. E. y Reichert, L. E., Jr. (1968) *Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH-131-I*. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 128: 807-811.

NTP-CERHR Report (2008) *NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A*. NTP.CERHR.MON. i-III1.

Ogawa, S.; Chan, J.; Chester, A. E.; Gustafsson, J. A.; Korach, K. S. y Pfaff, D. W. (1999) *Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 12887-12892.

Ogawa, S.; Eng, V.; Taylor, J.; Lubahn, D. B.; Korach, K. S. y Pfaff, D. W. (1998) *Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice*. *Endocrinology* 139: 5070-5081.

Ogawa, S.; Gordan, J. D.; Taylor, J.; Lubahn, D.; Korach, K. y Pfaff, D. W. (1996) *Reproductive functions illustrating direct and indirect effects of genes on behavior*. *Horm.Behav.* 30: 487-494.

Ogawa, S.; Olazabal, U. E.; Parhar, I. S. y Pfaff, D. W. (1994) *Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat*. *J.Neurosci.* 14: 1766-1774.

Ogunshola, O. O.; Antic, A.; Donoghue, M. J.; Fan, S. Y.; Kim, H.; Stewart, W. B.; Madri, J. A. y Ment, L. R. (2002) *Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system*. J.Biol.Chem. 277: 11410-11415.

Olea, N.; Pulgar, R.; Perez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A. M. y Sonnenschein, C. (1996) *Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry*. Environ.Health Perspect. 104: 298-305.

Onate, S. A.; Boonyaratanakornkit, V.; Spencer, T. E.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J.; Edwards, D. P. y O'Malley, B. W. (1998) *The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors*. J.Biol.Chem. 273: 12101-12108.

Onate, S. A.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J. y O'Malley, B. W. (1995) *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science 270: 1354-1357.

Ormerod, B. K. y Galea, L. A. (2001) *Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol*. Neuroscience 102: 369-379.

Ormerod, B. K.; Lee, T. T. y Galea, L. A. (2003) *Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats*. J.Neurobiol. 55: 247-260.

Osada, N.; Hirata, S.; Shoda, T. y Hoshi, K. (2001) *The novel untranslated exon "exon 0T" encoded between the exon 0 and exon 1 of the rat estrogen receptor alpha (ER alpha) gene*. Endocr.J. 48: 465-472.

Osterlund, M. K.; Grandien, K.; Keller, E. y Hurd, Y. L. (2000) *The human brain has distinct regional expression patterns of estrogen receptor alpha mRNA isoforms derived from alternative promoters*. J.Neurochem. 75: 1390-1397.

Padmanabhan, V.; Siefert, K.; Ransom, S.; Johnson, T.; Pinkerton, J.; Anderson, L.; Tao, L. y Kannan, K. (2008) *Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem?* J.Perinatol. 28: 258-263.

Paech, K.; Webb, P.; Kuiper, G. G.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.; Kushner, P. J. y Scanlan, T. S. (1997) *Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites*. Science 277: 1508-1510.

Palanza, P.; Gioiosa, L.; vom Saal, F. S. y Parmigiani, S. (2008) *Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice*. Environ.Res. 108: 150-157.

Palkovits MJ & Brownstein MJ 1983 Microdissection of brain areas by the punch technique. In *Brain Microdissection Techniques*, pp 1-36. Ed Cuello A.C. Chichester: John Wiley and Sons.

- Palmer, T. D.; Willhoite, A. R. y Gage, F. H. (2000) *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J.Comp Neurol. 425: 479-494.
- Papez, J. W. (1995) *A proposed mechanism of emotion*. 1937. J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci. 7: 103-112.
- Pappas, T. C.; Gametchu, B. y Watson, C. S. (1995) *Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding*. FASEB J. 9: 404-410.
- Park, S. E.; Xu, J.; Frolova, A.; Liao, L.; O'Malley, B. W. y Katzenellenbogen, B. S. (2005) *Genetic deletion of the repressor of estrogen receptor activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo*. Mol.Cell Biol. 25: 1989-1999.
- Patisaul, H. B.; Fortino, A. E. y Polston, E. K. (2006) *Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV*. Neurotoxicol.Teratol. 28: 111-118.
- Paxinos G (1995) *The Rat Nervous System*.
- Paxinos G & Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Penolazzi, L.; Lambertini, E.; Giordano, S.; Sollazzo, V.; Traina, G.; del Senno, L. y Piva, R. (2004) *Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells*. J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 91: 1-9.
- Perez-Martin, M.; Salazar, V.; Castillo, C.; Ariznavarreta, C.; Azcoitia, I.; Garcia-Segura, L. M. y Tresguerres, J. A. (2005) *Estradiol and soy extract increase the production of new cells in the dentate gyrus of old rats*. Exp.Gerontol. 40: 450-453.
- Pfaff D (1999) *Drive: neural and molecular mechanisms for sexual motivation*.
- Pfaff, D. W. (1966) *Morphological changes in the brains of adult male rats after neonatal castration*. J.Endocrinol. 36: 415-416.
- Pfaff DW (1999) *Drive: neurobiological and molecular mechanisms of sexual motivation*. Cambridge, Mass: MIT Press.
- Pfaffl, M. W. (2001) *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res. 29: e45.
- Pleim, E. T.; Brown, T. J.; MacLusky, N. J.; Etgen, A. M. y Barfield, R. J. (1989) *Dilute estradiol implants and progesterin receptor induction in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: correlation with receptive behavior in female rats*. Endocrinology 124: 1807-1812.
- Pombo, M. y Castro-Feijoo, L. (2005) *Endocrine disruptors*. J.Pediatr.Endocrinol.Metab 18 Suppl 1: 1145-1155.

- Porrini, S.; Belloni, V.; Della, S. D.; Farabollini, F.; Giannelli, G. y Dessi-Fulgheri, F. (2005) *Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats*. Brain Res.Bull. 65: 261-266.
- Qiu, J.; Bosch, M. A.; Tobias, S. C.; Grandy, D. K.; Scanlan, T. S.; Ronnekleiv, O. K. y Kelly, M. J. (2003) *Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C*. J.Neurosci. 23: 9529-9540.
- Raisman, G. y Field, P. M. (1971) *Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat*. Science 173: 731-733.
- Ramos, J. G.; Varayoud, J.; Bosquiazzo, V. L.; Luque, E. H. y Munoz-De-Toro, M. (2002) *Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics*. Biol.Reprod. 67: 735-742.
- Ramos, J. G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodriguez, H.; Costabel, L.; Munoz-De-Toro, M. y Luque, E. H. (2003) *Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats*. Endocrinology 144: 3206-3215.
- Ramos, J. G.; Varayoud, J.; Monje, L.; Moreno-Piovanio, G.; Munoz-De-Toro, M. y Luque, E. H. (2007) *Diethylstilbestrol alters the population dynamic of neural precursor cells in the neonatal male rat dentate gyrus*. Brain Res.Bull. 71: 619-627.
- Ramos, J. G.; Varayoud, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A. M.; Munoz, D. T. y Luque, E. H. (2001) *Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate*. Biol.Reprod. 65: 1271-1277.
- Razandi, M.; Alton, G.; Pedram, A.; Ghonshani, S.; Webb, P. y Levin, E. R. (2003) *Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane*. Mol.Cell Biol. 23: 1633-1646.
- Razandi, M.; Pedram, A.; Greene, G. L. y Levin, E. R. (1999) *Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells*. Mol.Endocrinol. 13: 307-319.
- Reid, G.; Denger, S.; Kos, M. y Gannon, F. (2002) *Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation*. Cell Mol.Life Sci. 59: 821-831.
- Rey, F.; Ramos, J. G.; Stoker, C.; Busmann, L. E.; Luque, E. H. y Munoz-De-Toro, M. (2006) *Vitellogenin detection in Caiman latirostris (Crocodylia: Alligatoridae): a tool to assess environmental estrogen exposure in wildlife*. J.Comp Physiol [B] 176: 243-251.

Rissman, E. F.; Early, A. H.; Taylor, J. A.; Korach, K. S. y Lubahn, D. B. (1997a) *Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity*. *Endocrinology* 138: 507-510.

Rissman, E. F.; Wersinger, S. R.; Taylor, J. A. y Lubahn, D. B. (1997b) *Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects*. *Horm.Behav.* 31: 232-243.

Rosenfeld, M. G. y Glass, C. K. (2001) *Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors*. *J.Biol.Chem.* 276: 36865-36868.

Rubin, B. S.; Lenkowski, J. R.; Schaeberle, C. M.; Vandenberg, L. N.; Ronsheim, P. M. y Soto, A. M. (2006) *Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A*. *Endocrinology* 147: 3681-3691.

Rubin, B. S.; Murray, M. K.; Damassa, D. A.; King, J. C. y Soto, A. M. (2001) *Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels*. *Environ.Health Perspect.* 109: 675-680.

Sapolsky, R. M. y Meaney, M. J. (1986) *Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period*. *Brain Res.* 396: 64-76.

Sato, K.; Matsuki, N.; Ohno, Y. y Nakazawa, K. (2002) *Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in an organotypic hippocampal culture*. *Neuroendocrinology* 76: 223-234.

Satokata, I.; Benson, G. y Maas, R. (1995) *Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice*. *Nature* 374: 460-463.

Savouret, J. F.; Bailly, A.; Misrahi, M.; Rauch, C.; Redeuilh, G.; Chauchereau, A. y Milgrom, E. (1991) *Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene*. *EMBO J.* 10: 1875-1883.

Savu, L.; Benassayag, C.; Vallette, G. y Nunez, E. A. (1979) *Ligand properties of diethylstilbestrol: studies with purified native and fatty acid-free rat alpha 1-fetoprotein and albumin*. *Steroids* 34: 737-748.

Schonfelder, G.; Wittfoht, W.; Hopp, H.; Talsness, C. E.; Paul, M. y Chahoud, I. (2002) *Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit*. *Environ.Health Perspect.* 110: A703-A707.

Seong, J. Y.; Park, S. y Kim, K. (1999) *Enhanced splicing of the first intron from the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) primary transcript is a prerequisite for mature GnRH messenger RNA: presence of GnRH neuron-specific splicing factors*. *Mol.Endocrinol.* 13: 1882-1895.

- Shors, T. J.; Townsend, D. A.; Zhao, M.; Kozorovitskiy, Y. y Gould, E. (2002) *Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning*. *Hippocampus* 12: 578-584.
- Shughrue, P. J.; Askew, G. R.; Delovade, T. L. y Merchenthaler, I. (2002) *Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain*. *Endocrinology* 143: 1643-1650.
- Shughrue, P. J.; Lane, M. V. y Merchenthaler, I. (1997a) *Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system*. *J.Comp Neurol.* 388: 507-525.
- Shughrue, P. J.; Lane, M. V. y Merchenthaler, I. (1997b) *Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study*. *Endocrinology* 138: 5476-5484.
- Simerly, R. B. (2002) *Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain*. *Annu.Rev.Neurosci.* 25: 507-536.
- Simerly, R. B.; Carr, A. M.; Zee, M. C. y Lorang, D. (1996) *Ovarian steroid regulation of estrogen and progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat*. *J.Neuroendocrinol.* 8: 45-56.
- Simerly, R. B.; Zee, M. C.; Pendleton, J. W.; Lubahn, D. B. y Korach, K. S. (1997) *Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 14077-14082.
- Simoncini, T.; Hafezi-Moghadam, A.; Brazil, D. P.; Ley, K.; Chin, W. W. y Liao, J. K. (2000) *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*. *Nature* 407: 538-541.
- Smith, C. L. (1998) *Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways*. *Biol.Reprod.* 58: 627-632.
- Smith, J. T.; Cunningham, M. J.; Rissman, E. F.; Clifton, D. K. y Steiner, R. A. (2005a) *Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse*. *Endocrinology* 146: 3686-3692.
- Smith, J. T.; Dungan, H. M.; Stoll, E. A.; Gottsch, M. L.; Braun, R. E.; Eacker, S. M.; Clifton, D. K. y Steiner, R. A. (2005b) *Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse*. *Endocrinology* 146: 2976-2984.
- Smith, M. S.; Freeman, M. E. y Neill, J. D. (1975) *The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy*. *Endocrinology* 96: 219-226.

Smith, S. S. (1994) *Female sex steroid hormones: from receptors to networks to performance--actions on the sensorimotor system*. Prog.Neurobiol. 44: 55-86.

Solum, D. T. y Handa, R. J. (2002) *Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus*. J.Neurosci. 22: 2650-2659.

Son, G. H.; Jung, H.; Seong, J. Y.; Choe, Y.; Geum, D. y Kim, K. (2003) *Excision of the first intron from the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) transcript serves as a key regulatory step for GnRH biosynthesis*. J.Biol.Chem. 278: 18037-18044.

Soto, A. M.; Sonnenschein, C.; Chung, K. L.; Fernandez, M. F.; Olea, N. y Serrano, F. O. (1995) *The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants*. Environ.Health Perspect. 103 Suppl 7: 113-122.

Stahlhut, R. W.; Welshons, W. V. y Swan, S. H. (2009) *Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both*. Environ.Health Perspect. 117: 784-789.

Stoker, C.; Rey, F.; Rodriguez, H.; Ramos, J. G.; Sirosky, P.; Larriera, A.; Luque, E. H. y Munoz-De-Toro, M. (2003) *Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A*. Gen.Comp Endocrinol. 133: 287-296.

Tajima, S. y Suetake, I. (1998) *Regulation and function of DNA methylation in vertebrates*. J.Biochem. 123: 993-999.

Takahashi, O. y Oishi, S. (2000) *Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses*. Environ.Health Perspect. 108: 931-935.

Tan, B. L. y Ali, M. M. (2003) *Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer*. Talanta 61: 385-391.

Tanapat, P.; Hastings, N. B. y Gould, E. (2005) *Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner*. J.Comp Neurol. 481: 252-265.

Tanapat, P.; Hastings, N. B.; Reeves, A. J. y Gould, E. (1999) *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat*. J.Neurosci. 19: 5792-5801.

Taylor, J. A.; Welshons, W. V. y vom Saal, F. S. (2008) *No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24h after administration in neonatal female mice*. Reprod.Toxicol. 25: 169-176.

Tetel, M. J.; Siegal, N. K. y Murphy, S. D. (2007) *Cells in behaviourally relevant brain regions coexpress nuclear receptor coactivators and ovarian steroid receptors*. J.Neuroendocrinol. 19: 262-271.

Thammacharoen, S.; Lutz, T. A.; Geary, N. y Asarian, L. (2008) *Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor-alpha-expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats*. Endocrinology 149: 1609-1617.

Thomas, P.; Pang, Y.; Filardo, E. J. y Dong, J. (2005) *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells*. Endocrinology 146: 624-632.

Toran-Allerand, C. D. (2005) *Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol*. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1052: 136-144.

Toran-Allerand, C. D.; Guan, X.; MacLusky, N. J.; Horvath, T. L.; Diano, S.; Singh, M.; Connolly, E. S., Jr.; Nethrapalli, I. S. y Tinnikov, A. A. (2002) *ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury*. J.Neurosci. 22: 8391-8401.

Vaitukaitis, J.; Robbins, J. B.; Nieschlag, E. y Ross, G. T. (1971) *A method for producing specific antisera with small doses of immunogen*. J.Clin.Endocrinol.Metab 33: 988-991.

Vallieres, L.; Campbell, I. L.; Gage, F. H. y Sawchenko, P. E. (2002) *Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6*. J.Neurosci. 22: 486-492.

Van der, B. K.; Mulder, J.; Keijser, J. N.; Eggen, B. J.; Luiten, P. G. y Van der Zee, E. A. (2005) *Input from the medial septum regulates adult hippocampal neurogenesis*. Brain Res.Bull. 67: 117-125.

van Praag, H.; Christie, B. R.; Sejnowski, T. J. y Gage, F. H. (1999) *Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96: 13427-13431.

Varayoud, J.; Monje, L.; Bernhardt, T.; Munoz-De-Toro, M.; Luque, E. H. y Ramos, J. G. (2008a) *Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17beta-estradiol*. Reprod.Toxicol. 26: 138-145.

Varayoud, J.; Ramos, J. G.; Bosquiazso, V. L.; Munoz-De-Toro, M. y Luque, E. H. (2008b) *Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult*. Endocrinology 149: 5848-5860.

Varayoud, J.; Ramos, J. G.; Joazeiro, P. P.; Montes, G. S.; Munoz de Toro, M. M. y Luque, E. H. (2001) *Characterization of fibroblastic cell plasticity in the lamina propria of the rat uterine cervix at term*. Biol.Reprod. 65: 375-383.

Varayoud, J.; Ramos, J. G.; Monje, L.; Bosquiazzo, V.; Munoz-De-Toro, M. y Luque, E. H. (2005) *The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus.* J.Endocrinol. 186: 51-60.

Vemuri, M. C. y Chetty, C. S. (2005) *Alcohol impairs astroglialogenesis by stem cells in rodent neurospheres.* Neurochem.Int. 47: 129-135.

Vizi, E. S. y Kiss, J. P. (1998) *Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions.* Hippocampus 8: 566-607.

vom Saal, F. S. y Hughes, C. (2005) *An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment.* Environ.Health Perspect. 113: 926-933.

vom Saal, F. S. y Welshons, W. V. (2006) *Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A.* Environ.Res. 100: 50-76.

Wagner, C. K.; Pfau, J. L.; De Vries, G. J. y Merchenthaler, I. J. (2001) *Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression.* J.Neurobiol. 47: 176-182.

Wasterlain, C. G. y Plum, F. (1973) *Vulnerability of developing rat brain to electroconvulsive seizures.* Arch.Neurol. 29: 38-45.

Weigel, R. J.; Crooks, D. L.; Iglehart, J. D. y deConinck, E. C. (1995) *Quantitative analysis of the transcriptional start sites of estrogen receptor in breast carcinoma.* Cell Growth Differ. 6: 707-711.

Weisz, J. y Ward, I. L. (1980) *Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring.* Endocrinology 106: 306-316.

Wetherill, Y. B.; Fisher, N. L.; Staubach, A.; Danielsen, M.; Vere White, R. W. y Knudsen, K. E. (2005) *Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status.* Cancer Res. 65: 54-65.

White, R.; Lees, J. A.; Needham, M.; Ham, J. y Parker, M. (1987) *Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor.* Mol.Endocrinol. 1: 735-744.

Williams, C. L. y Blaustein, J. D. (1988) *Steroids induce hypothalamic progesterin receptors and facilitate female sexual behavior in neonatal rats.* Brain Res. 449: 403-407.

Winocur, G.; Wojtowicz, J. M.; Sekeres, M.; Snyder, J. S. y Wang, S. (2006) *Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function.* Hippocampus 16: 296-304.

- Wintermantel, T. M.; Campbell, R. E.; Porteous, R.; Bock, D.; Grone, H. J.; Todman, M. G.; Korach, K. S.; Greiner, E.; Perez, C. A.; Schutz, G. y Herbison, A. E. (2006) *Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility*. *Neuron* 52: 271-280.
- Wong, C. W.; Komm, B. y Cheskis, B. J. (2001) *Structure-function evaluation of ER alpha and beta interplay with SRC family coactivators. ER selective ligands*. *Biochemistry* 40: 6756-6765.
- Woolley, C. S. y McEwen, B. S. (1992) *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat*. *J.Neurosci.* 12: 2549-2554.
- Wu, H. Y.; Hamamori, Y.; Xu, J.; Chang, S. C.; Saluna, T.; Chang, M. F.; O'Malley, B. W. y Kedes, L. (2005) *Nuclear hormone receptor coregulator GRIP1 suppresses, whereas SRC1A and p/CIP coactivate, by domain-specific binding of MyoD*. *J.Biol.Chem.* 280: 3129-3137.
- Xiong, Z. y Laird, P. W. (1997) *COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay*. *Nucleic Acids Res.* 25: 2532-2534.
- Ye, X.; Kuklenyik, Z.; Needham, L. L. y Calafat, A. M. (2006) *Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry*. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 831: 110-115.
- Yeo, T. T.; Gore, A. C.; Jakubowski, M.; Dong, K. W.; Blum, M. y Roberts, J. L. (1996) *Characterization of gonadotropin-releasing hormone gene transcripts in a mouse hypothalamic neuronal GT1 cell line*. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 42: 255-262.
- Zhang, J. Q.; Cai, W. Q.; Su, B. Y. y Zhou, d. S. (2002) *Immunocytochemical localization of estrogen receptor beta in the rat brain*. *Shi Yan.Sheng Wu Xue.Bao.* 35: 15-20.
- Zsarnovszky, A.; Le, H. H.; Wang, H. S. y Belcher, S. M. (2005) *Ontogeny of rapid estrogen-mediated extracellular signal-regulated kinase signaling in the rat cerebellar cortex: potent nongenomic agonist and endocrine disrupting activity of the xenoestrogen bisphenol A*. *Endocrinology* 146: 5388-5396.