



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE AGENTES
ESTROGÉNICOS AMBIENTALES DURANTE LA
DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL CEREBRO SOBRE
EL CONTENIDO DE LOS RECEPTORES A
ESTRÓGENOS Y A PROGESTERONA
EN EL CEREBRO DE LA RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

VICTOR IVÁN HERNÁNDEZ MOLINA



TUTOR

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Como ser un gran escritor

Tienes que cojerte a muchas mujeres
Hermosas mujeres
Y escribir algunos poemas decentes de amor.
Y no preocuparte por la edad
Y / o por los jóvenes talentos
Solo toma más cerveza
Más y más cerveza

Y ve a las carreras de caballos al menos una vez
A la semana, Y si es posible gana.
Aprender a ganar es duro
Cualquier idiota puede ser un buen perdedor

Y no olvides tu Brahms
Ni tu Bach ni tu
Cerveza.

No hagas mucho ejercicio.
Levántate hasta mediodía.
Evita las tarjetas de crédito
Y pagar las cosas a
Tiempo.

Recuerda que no hay un culo
En este mundo que valga mas de 50 USD
Y si tienes capacidad para amar
Primero ámate a ti mismo
Y siempre se consciente de la posibilidad de
Una derrota aun cuando haya sido
Justa
Una probada temprana de muerte no es
Necesariamente algo malo.
Mantente lejos de iglesias, bares y museos,
Y como la araña
Se paciente
El tiempo es una carga para todos
También lo son
El exilio
La derrota
La traición
Toda esa basura.
No olvides la cerveza.
La cerveza es sangre que fluye
Una amante constante

Consíguete una maquina de escribir
Y mientras caminas para arriba y para abajo
Afuera de tu ventana

Dale a esa cosa
Dale duro

Haz como si fuera una pelea de peso completo
Mata al toro antes de que te embista
Recuerda a los perros viejos
Que pelearon bien:
Hemingway, Celine, Dostoievsky, Hamsun.
Si crees que ellos no se volvieron locos
En sus diminutos cuartos
Como tu ahora

Sin mujeres
Sin comida
Sin esperanza

Entonces no estas listo.

Bebe más cerveza.
Tienes tiempo.
Y si no tienes
No te preocupes
No hay problema.

Charles Bukowski

La visión emergente
 Que fluctúa entre la veracidad de lo oculto
 Y la realidad de los mitos
 Condición inherente al carácter metafísico
 Del objeto del que emanan las palabras,
 Que imponen ante mí un campo infinito,
 En el que las formas,
 Los colores y las esencias
 Permiten vislumbrar la majestuosidad del olimpo,
 Figuras semihumanas de indescriptible belleza y poder,
 Dioses que ante el imperativo capricho
 De sus almas eternas, determinan el destino
 De frutos y semillas, de árboles y arbustos,
 De humanos y animales,
 Vociferando, murmurando y cantando,
 Desplazan los enormes bloques, las pesadas vigas,
 En insoportables jornadas que sobrepasan
 Los límites existenciales de estrellas y galaxias,
 Para después entregarse al placer de la ambrosía
 Al vino y al juego, a eruditos desplantes musicales,
 Y lascivos espectáculos de orgías que exceden
 La imaginación de mi pagana existencia,
 Que dichoso he sido al encontrarme con las peroratas
 Nocturnas de las sirenas, en el vaivén de mi barcaza errante
 Sobre este mar de extensiones infinitas.

Con “ciencia”

Los influjos ferales de los cuerpos celestes,
 Han influenciado y trazado los caracteres,
 Que determinan la esencia de mi persona,
 Obligándome a engendrar los más abominables
 E impensables actos.

Sucumbo ante la imperiosa necesidad
 De probar todas las formas que integran
 La visión transfigurada,
 Que mi percepción, en la lucidez del hastío
 Reconoce como realidad.

Mutilo, descarno y asesino,
 Diluyo y transgredo, con el fin de contemplar la totalidad de la dimensionalidad
 Inherente de cada una de las partes,
 Que ilusión tan efímera
 Pensar, que la dimensionalidad individual
 Se puede extrapolar para obtener la dimensionalidad de la totalidad,
 Cuando la realidad es adimensional
 Y resulta estar situada en el objeto de confluencia
 De todas las líneas de cognición,
 Lo que la naturaleza de mi humanidad reconoce como conciencia.

V.I.H.M.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mis papas Gloria y Juan Manuel, que sin su apoyo y constancia no hubiera podido hacerlo, todo fue por ustedes. Espero que estén orgullosos

A mi hermano Masa (Alejandro) y Yanni, por todo lo que hemos pasado esperando que ahora sí se arme.

A mis Tíos Margarita y Prof. y Esperanza por que sin su apoyo y confianza no hubiera podido terminar lo que empecé.

A mi chiquita (Adrianita) por compartir mis metas y ambiciones te amo, y al resto de la familia **Gaytan Caballero** (Rosa Maria, Juan Francisco, Rocio, Yareni, Luis y Familia) que me han apoyado y aceptado en los momentos que mas lo he necesitado.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por haberme tenido toda la paciencia y haberme brindado todo su apoyo.

Al Dr. Christian Guerra, por haberme enseñado y compartido tantas cosas en el laboratorio ¡no seas loco cris!.

A la banda del laboratorio: Tere, Mariana, Gabi, Tania, Milena, Fabián, Edith, Luciano, Mauricio, José, Genoveva, Mago, Irene, Dr. Cerbón, América, Sonia, Carolina, Noemí y el resto de nosotros, por todos los comentarios, chismes y regaños.

Y a toda la banda con la que he compartido esta fase de mi vida (mis carnalitos): Tulio, Rene, Carmen, Marlene, Mari, Erika, Ana, Hugo, Ruben, Jaime, Huesos, Colocho, Josué, Checo, Gabriel, Wendy, Angel, Carlos, Miguel, Cadena, Minerva, Güera, Pablo, Balam, León, Luigi, Bere, Choco, Magda, Pecas, Ram, Ludo, Roy, Gordo, Bollo, Nicap, Calvo, Chente, Astrid, Karla, Pepe, Isaac, Leo, Sandra, Lety, Agus, Ale, Conz, Mirsa, Masita, Victor, Adriana, Jorge, Chiqui, Capuh, Chucha, Arbol, Armando, Emilio, Jose, Alfredo, Barbarina, Gerardo, Rulas, Mario, Marco, Alex, Dr. Gio, Toño, Lorena, Julio, Yuko, Serge, y toda la banda del pirul por todas las fiestas, tertulias y experiencias juntos.

**Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la
U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.
Y fue apoyada por el programa 127 de la Facultad de Química, U.N.A.M.**

ÍNDICE

1 Resumen	7
2 Introducción	8
3 Antecedentes	9
3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides	9
3.2 Receptores a hormonas esteroides	12
3.2.1 Estructura y función del receptor a progesterona	13
3.2.2 Regulación de la expresión del receptor a progesterona en el sistema nervioso central (SNC)	16
3.2.3 Estructura y función del receptor a estrógenos	17
3.2.4 Regulación de la expresión del receptor a estrógenos en el SNC	19
3.3 Diferenciación sexual del cerebro	20
3.4 Agentes estrogénicos ambientales	22
3.4.1 Bisfenol A	22
3.4.2 Atrazina	24
3.4.3 Efectos de la administración de bisfenol A y atrazina en el SNC	25
4 Planteamiento del problema	27
5 Hipótesis	28
6 Objetivos	28
7 Materiales y Métodos	29
7.1 Animales de experimentación	29
7.2 Extracción y cuantificación de proteínas totales	29
7.3 Western Blot	30
7.4 Análisis de resultados	31
8 Resultados	32
9 Discusión	37
10 Conclusiones	40
11 Referencias	41

1. Resumen

La diferenciación sexual del cerebro es un proceso que depende en gran medida de la acción organizacional de las hormonas esteroides. Se han detectado una gran cantidad de compuestos ambientales con actividad endócrina, dentro de los cuales destacan el bisfenol A y la atrazina cuyos efectos no han sido totalmente caracterizados. Se desconoce el efecto de la administración de bisfenol A y atrazina durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro sobre el contenido del receptor a progesterona (RP) y del receptor a estrógenos (RE) en el sistema nervioso central (SNC) de la rata adulta.

En este trabajo se estudiaron los cambios en el contenido de las isoformas del RP: RP-A y RP-B y del RE: RE- α y RE- β en el hipotálamo y el área preóptica de ratas hembra Sprague Dawley adultas administradas con bisfenol A (40 y 80 mg/kg) y atrazina (40 mg/kg) durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro en el día 3 postnatal. Las ratas se sacrificaron a las 10 semanas postnatales, se disectaron el hipotálamo y el área preóptica y mediante la técnica de *Western Blot* se detectaron RP-A, RP-B, RE- α y RE- β . En el hipotálamo se observó un incremento significativo en el contenido del RE- α en las ratas tratadas con bisfenol A (40 mg/kg). El contenido del RE- β y de las isoformas del RP no presentó cambios significativos con ninguno de los tratamientos. En el área preóptica se observó un incremento significativo en el contenido del RE- β en las ratas tratadas con atrazina sin cambios significativos en el contenido del RE- α y del RP. Nuestros datos muestran que la administración de bisfenol A y atrazina durante la diferenciación sexual del cerebro modifica el contenido de las isoformas del RE (α y β respectivamente) más no del RP en el hipotálamo y el área preóptica de la rata adulta.

2. Introducción

Las hormonas esteroideas sexuales son cruciales en la diferenciación sexual del cerebro. Muchos de los efectos de las hormonas sexuales están mediados por receptores intracelulares específicos que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando (Camacho-Arroyo, 2003). La presencia de compuestos parecidos a las hormonas sexuales en nuestro ambiente ha causado un incremento en las enfermedades del sistema neuroendócrino asociado a la reproducción (Kavlock, 1996). Entre estos compuestos están el bisfenol A y la atrazina cuyos efectos no han sido totalmente caracterizados por lo que en este trabajo se estudiarán los efectos de la administración de estas sustancias en el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro sobre la expresión de los receptores a estrógenos y a progesterona en el sistema nervioso central (SNC) de la rata adulta.

3. Antecedentes

3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y cuya estructura consiste en un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclo pentanoperhidrofenantreno debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclo pentano) (Knobil et al., 1988).

Las hormonas esteroides regulan múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrolítica, las respuestas al estrés y la función reproductiva; además de regular distintas conductas. Todas las hormonas esteroides, con excepción del ácido retinoico, se derivan del colesterol, a partir del cual se forma la pregnenolona, que funciona como el principal intermediario para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroides. Los esteroides con 21 átomos de carbono se dividen en pregnanos, glucocorticoides y mineralocorticoides, mientras que los de 19 y 18 átomos se denominan androstanos y estranos, respectivamente (Fig. 1).

La progesterona y el estradiol son producidos principalmente en el ovario, mientras que los andrógenos en su mayoría son sintetizados por los testículos. Estas hormonas regulan principalmente las funciones reproductivas de los mamíferos, por lo que son conocidas como hormonas sexuales (González-Arenas et al., 2001) (Tabla 1).

Las hormonas esteroides tienen una velocidad de recambio elevada y no se almacenan sino una vez que son secretadas pasan al torrente sanguíneo donde pueden circular libres o unidas a proteínas plasmáticas, tales como albúmina (cuando el enlace es inespecífico y poco afín) o las globulinas (cuando el enlace es de gran especificidad y de gran afinidad) (Wilson y Foster, 1992).

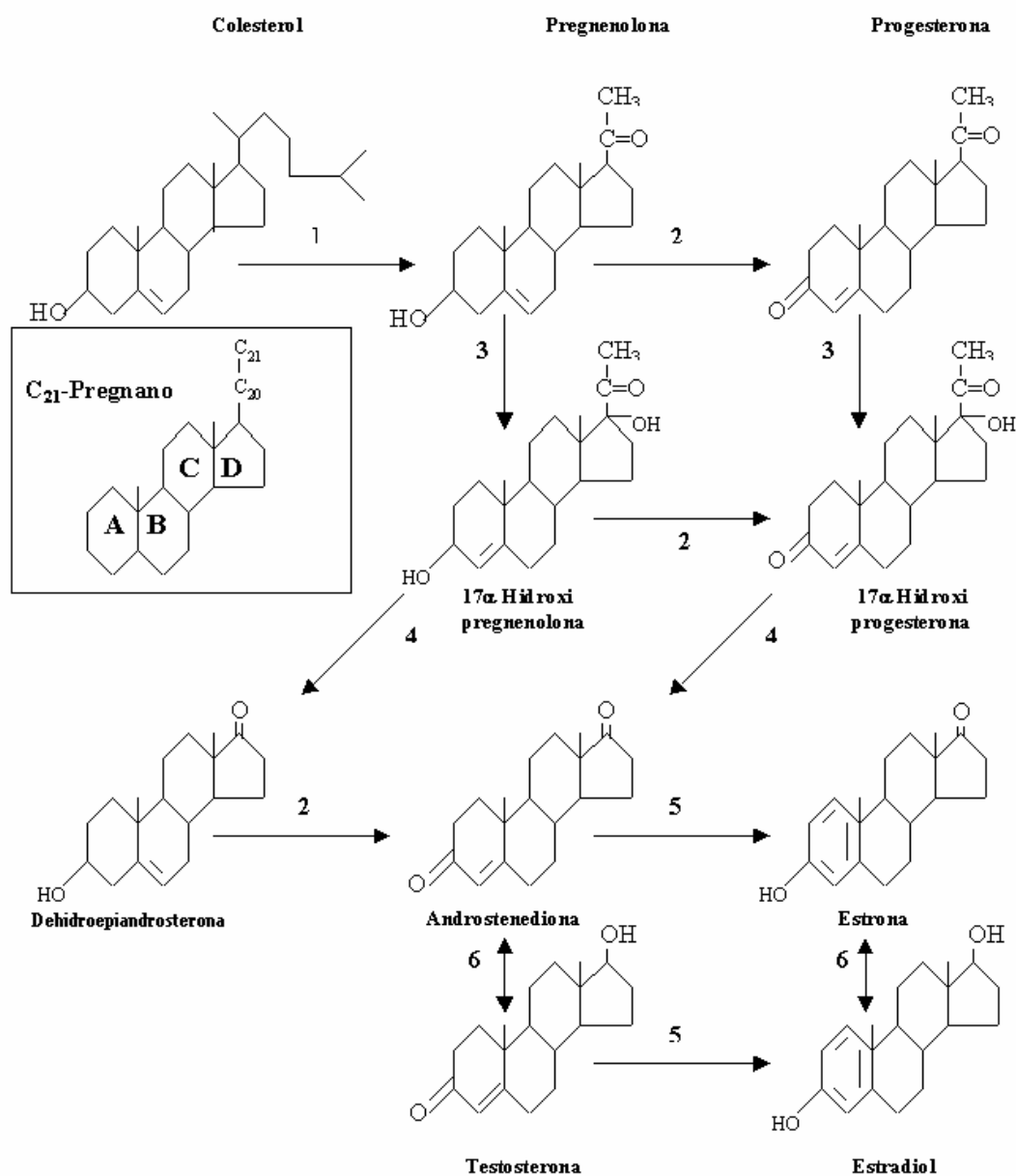
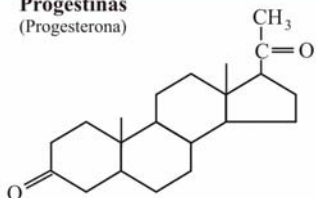
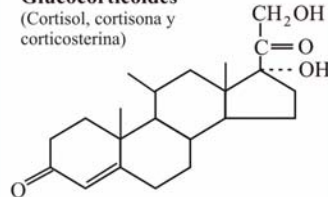
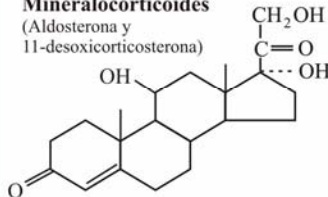
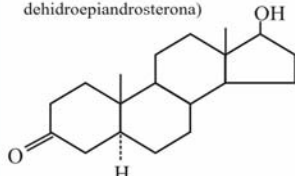
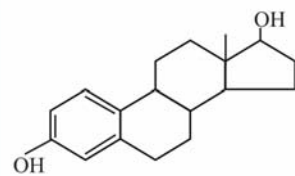


Fig.1. Síntesis de los principales esteroides. 1) 20,22 desmolasa; 2) 3 β -OH-esteroide deshidrogenasa, 3) 17 α -hidroxilasa; 4) 17, 20-esteroide liasa; 5) aromatasa; 6) 17 β -OH-esteroide deshidrogenasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que las letras con las que se denominan a cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroides (Gore-Langton et al., 1988).

El hígado es el órgano principal para el metabolismo de las hormonas esteroides (Greenspan et al., 1998). Los efectos de las hormonas esteroides ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a que éstas tienen diversos mecanismos de acción (Camacho-Arroyo et al., 1995).

Tabla 1. Función y lugar de síntesis de las hormonas esteroides (González-Arenas et al., 2001).

Hormona	Lugar de síntesis	Función
Progestinas (Progesterona) 	Ovario, placenta, SNC	Preparación del endometrio para la implantación del óvulo fertilizado. Mantenimiento del embarazo. Desarrollo de la glándula mamaria. Regulación de diversas actividades en el SNC.
Glucocorticoides (Cortisol, cortisona y corticosterina) 	Corteza adrenal	Regulación de las respuestas al estrés. Modulación del metabolismo de glucosa y la glucogénesis.
Mineralocorticoides (Aldosterona y 11-desoxicorticosterona) 	Corteza adrenal	Metabolismo hidroelectrolítico. Retención de sodio y excreción de potasio.
Andrógenos (Testosterona, dihidrosterona, dehidroepiandrosterona) 	Testículo	Conducta sexual y fenotipo masculino. Espermatogénesis.
Estrógenos (Estradiol y estrona) 	Ovario, placenta, SNC	Diferenciación sexual del cerebro. Conducta sexual femenina. Maduración ósea.

3.2 Receptores a hormonas esteroides

Los receptores nucleares son factores de transcripción inducidos por ligando que regulan específicamente la expresión de genes blanco. Pertenecen a esta superfamilia los receptores a hormonas esteroides cuyos miembros coordinan la morfogénesis y la homeostasis (Kastner et al., 1990). Se han identificado tres tipos principales:

- ✖ Los receptores de tipo I, también conocidos como clásicos o esteroides, entre los que se encuentran los receptores a: progestinas (RP), estrógenos (RE), andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM), los cuales se encuentran unidos a proteínas de choque térmico en ausencia de ligando manteniéndose inactivos. Una vez activados ejercen su acción mediante la interacción con elementos de respuesta a hormonas (HRE), que son secuencias palindrómicas ubicadas en la región promotora de los genes blanco específicos.
- ✖ Los receptores de tipo II, entre los que se encuentran los receptores a: hormonas tiroideas (RT), ácido retinoico trans (RAR), ácido retinoico 9-cis (RXR) y vitamina D₃ (VDR), estos receptores son capaces de unirse al DNA en ausencia de ligando y ejercen un efecto de represión en sus promotores, esto es conocido como silenciación. La interacción ligando-receptor provoca la activación del segundo y la regulación de genes blanco.
- ✖ Los receptores de tipo III, también conocidos como receptores huérfanos, cuyos ligandos no han sido totalmente caracterizados.

Los receptores a hormonas esteroides contienen seis dominios característicos: en el extremo N-terminal se encuentra el dominio A/B, la región de mayor variabilidad entre los diferentes receptores, tanto en secuencia como en longitud. El dominio A/B permite diferenciar entre isoformas del mismo receptor y tiene también la función de activación 1 (AF-1), que es una de las regiones con actividad transcripcional del receptor. En la región C se encuentra el dominio de unión al DNA (DBD), el cual es altamente conservado y está constituido por dos dedos de zinc. El dominio D presenta una secuencia variable conocida como bisagra y contiene una señal de localización nuclear. El dominio E está localizado

hacia el extremo carboxilo terminal de la región D; es relativamente largo y funcionalmente diverso ya que participa en: la unión con el ligando, con proteínas de choque térmico, la dimerización y la interacción con los cofactores. Esta región contiene también una señal de localización nuclear y la función de activación 2 (AF-2) que juega un papel importante en la regulación de la transcripción (Tata, 2002; Prieto et al., 2003). En cuanto al dominio F, existen estudios que muestran que participa en la función transcripcional del receptor y en su unión con agonistas y antagonistas (Schwartz et al., 2002) (Figura 2).

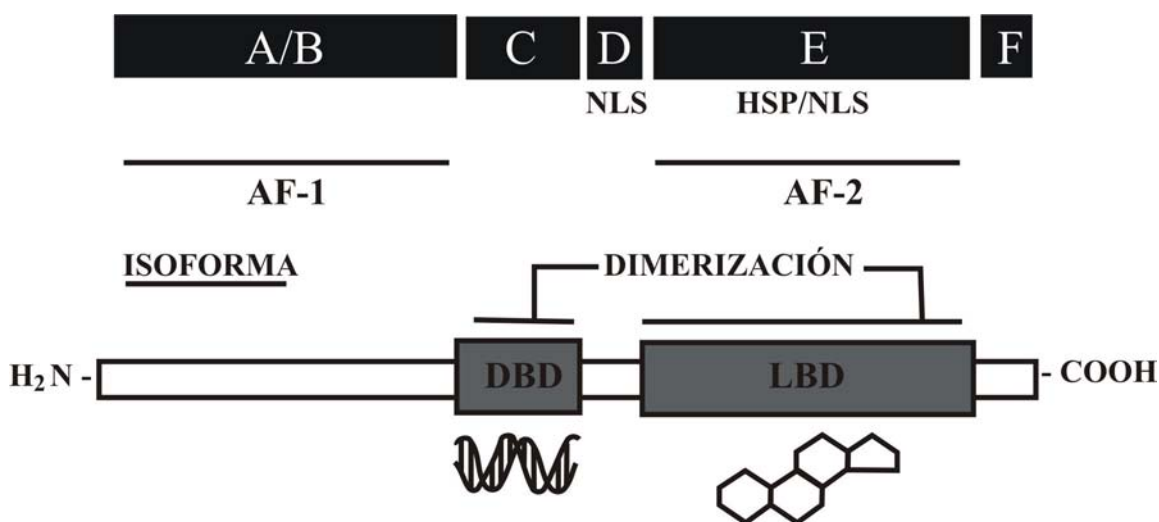


Fig. 2. Dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. A-E dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. AF: función de activación, DBD: dominio de unión al DNA, LBD: dominio de unión al ligando (Prieto et al., 2003).

3.2.1 Estructura y función del receptor a progesterona

El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con secuencias específicas en el DNA (elementos de respuesta hormonal; HRE).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintos grupos de vertebrados (aves, reptiles, roedores, conejos, perros, vacas, primates), así como en distintas áreas del cerebro tales como el hipotálamo ventro-medial, el área preóptica, la corteza frontal, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el cerebelo (Warembourg et

al., 1989; Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2002; Camacho-Arroyo I., 2003).

El mecanismo general de acción del RP activado por la progesterona es el siguiente:

En ausencia del ligando específico, el RP se encuentra transcripcionalmente inactivo formando complejos oligoméricos con proteínas de choque térmico como las Hsp (70, 90, 59) (Beato, 1987; Chambraud et al., 1990; Schowalter et al., 1991). Cuando la hormona circulante entra por difusión a través de las membranas citoplásmica y nuclear (Litwack et al., 1992), se une al receptor provocando cambios conformacionales que promueven la fosforilación de éste y la disociación de las Hsp (Allan et al., 1992; Mirashi et al., 1987; Pasanen et al., 1999; Clemm et al., 2000).

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por sitios en el DNA denominados elementos de respuesta a progesterona, la unión del RP activado a su elemento de respuesta permite reclutar factores de transcripción hacia la región promotora para iniciar y regular la síntesis del RNAm (Mahesh et al., 1996; Beato et al., 1989). Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción del gen, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación (Rodríguez et al., 1990) (Fig. 3).

El RP es regulado a la alta por estrógenos y a la baja por progesterona en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo de ratas hembras, sin embargo, no hay inducción en el hipotálamo de ratas macho lo que sugiere un dimorfismo sexual en la regulación del RP (Graham et al., 1997; Camacho-Arroyo et al., 1994; Mendoza-Rodríguez et al., 1999; Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2002; Camacho-Arroyo I., 2003).

En algunas especies de vertebrados (aves, roedores y primates) se han identificado dos isoformas del RP denominadas A (79,000-94,000 Daltones) y B (108,000-120,000 Daltones; Schrader et al., 1981; Horwitz et al., 1996; Guerra-Araiza et al., 2000; Camacho-Arroyo I., 2003).

En el ser humano (Kasnter et al., 1990) y en la rata (Kraus et al., 1993) las isoformas del RP son originadas por distintos mensajeros, mientras que en las aves se originan por un procesamiento alternativo de un mismo RNAm (Connely et al., 1989).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad tanto por la progesterona como por el elemento de respuesta a progesterona (Christensen et al., 1991).

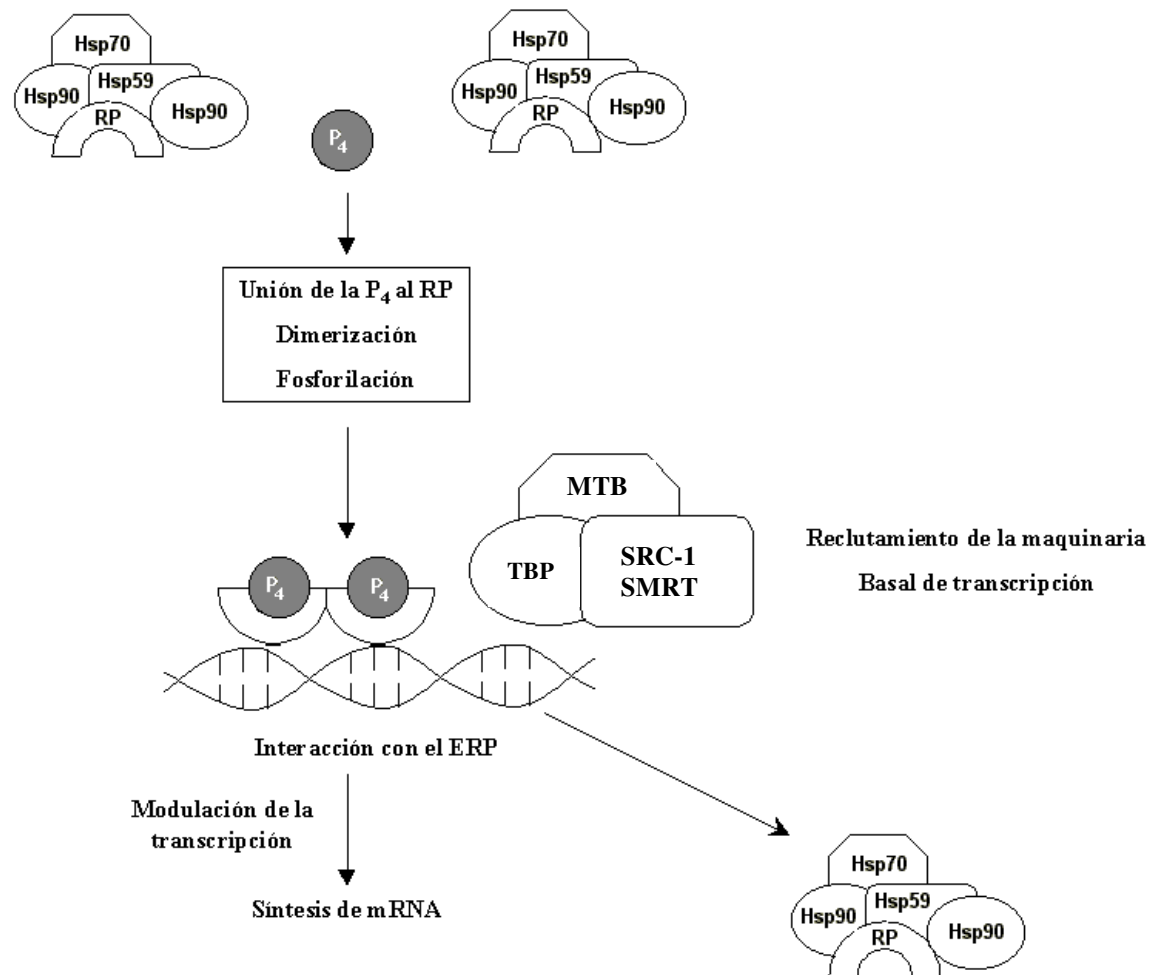


Fig. 3 Mecanismo general de activación del RP por su ligando. La progesterona (P₄) entra al núcleo y se une a su receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en el receptor que aumenta su afinidad al DNA y así el complejo ligando-receptor interactúa con secuencias específicas llamadas elementos de respuesta a progesterona (ERP) lo cual modifica la transcripción del gen blanco. Proteínas de choque térmico (HSP 59, 70, 90); maquinaria basal de transcripción (MTB); coactivador de receptores a esteroides (SRC-1); silenciador mediador para el receptor de hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT); proteína de unión a TATA (TBP) (Giangrande et al., 1997).

3.2.2 Regulación de la expresión del receptor a progesterona en el sistema nervioso central

Se ha reportado la expresión del RP en diversas regiones cerebrales como el tálamo, el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, el cerebelo, la corteza cerebral, la amígdala y el tallo cerebral (Camacho-Arroyo et al., 1994; Cerbón et al., 1989; MacLusky y McEwen, 1978, Kastrop et al., 1999). Se ha detectado la presencia del RP desde etapas embrionarias en el hipotálamo de roedores de ambos sexos, su expresión diferencial en distintas regiones cerebrales, así como su modificación a lo largo del desarrollo (Wagner et al., 1998; Brown et al., 1990), en diferentes condiciones hormonales como sucede durante los ciclos estral, menstrual o en animales ovariectomizados tratados con E₂ o P₄ (Camacho-Arroyo et al., 1998, Bethea et al., 1998, Guerra-Araiza et al., 2000).

En la mayoría de los tejidos estudiados se ha observado que la expresión del RP está regulada de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P₄. La regulación por estrógenos sucede principalmente a nivel transcripcional y está mediada por elementos de respuesta a estrógenos localizados en la región promotora del gen del RP o en regiones intragénicas del mismo (Kraus et al., 1993; Savouret et al., 1991). En el SNC de la rata la expresión del RP es inducida por estrógenos en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, mientras que dicha inducción no sucede en la amígdala y el cerebelo (Cerbón et al., 1989; MacLusky y McEwen, 1978; Camacho-Arroyo et al., 1998; Camacho-Arroyo I., 2003).

Una degradación dependiente de ligando ha sido reportada para el RP y el RE en varios tipos celulares, siendo el incremento de la fosforilación lo que marca al receptor para su degradación vía el sistema ubiquitina proteosoma 26S (Camacho-Arroyo et al., 2002). Recientemente se demostró que el RP y el RE son degradados de manera tejido específica por el proteosoma 26S en el cerebro de la rata en condiciones fisiológicas (Villamar-Cruz et al., 2006).

La tasa de expresión de las isoformas del RP varía de manera tejido-específica, en respuesta a los estímulos hormonales y de acuerdo a la etapa del desarrollo en la que se encuentre el organismo, sin embargo se ha reportado que hay una expresión diferencial

entre las isoformas del RP, ya que se ha encontrado que para la corteza cerebral, el área preóptica y el hipotálamo la isoforma predominante en la rata recién nacida es la RP-B, pero esta expresión se modifica al rededor del día 12, cuando la isoforma predominante es la RP-A (Kato et al., 1993).

En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, la expresión de ambas isoformas del RP fue inducida por estrógenos y reducida por P_4 , y en el área preóptica éstos cambios sólo se presentaron en RP-B, mientras que en hipocampo la isoforma que presentó inducción con estrógenos fue RP-A, sin que la P_4 tuviera efectos en la expresión de ambas isoformas (Camacho-Arroyo et al., 1998). En condiciones fisiológicas como en ciclo estral, RP-B fue predominante en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que en el hipocampo no se detectó una diferencia importante entre la expresión de las dos isoformas a nivel del RNAm (Guerra-Araiza et al., 2000).

3.2.3 Estructura y función del receptor a estrógenos

La mayoría de las acciones fisiológicas de los estrógenos están mediadas por receptores nucleares que actúan como factores de transcripción activados por la unión del ligando (Beekman et al., 1993). El receptor a estrógenos (RE) es también miembro de la superfamilia de los receptores nucleares. Existen dos tipos de receptores nucleares estrogénicos conocidos $RE\alpha$ y $RE\beta$, estos, exhiben la organización característica de los dominios de los receptores nucleares que incluyen un dominio variable de transactivación N-terminal (AF-1), una región para la unión al DNA altamente conservada con dedos de zinc y un dominio de unión a la hormona C-terminal. El LBD es multifuncional y además tiene un sitio de reconocimiento al ligando conteniendo las regiones para la dimerización del receptor y transactivación dependiente del ligando (AF-2).

Ambos receptores unen estrógenos con la misma alta afinidad y se unen a los mismos elementos de respuesta en el DNA (Fig. 4). Existen diferencias significativas en la región de la proteína responsable de las interacciones con la maquinaria transcripcional, lo que sugiere diferentes mecanismos de activación transcripcional (Kuiper et al., 1998; Wilson et al., 2002). Estas isoformas son codificadas por genes diferentes compartiendo la misma regionalización funcional y el 45% de homología (Ogawa et al., 1998; Gustafsson,

J.A., 2000). El RE α es una proteína de 65 kDa (595 aminoácidos, aa) y se expresa principalmente en mama, útero, cerebro, hipófisis y ovario. El gen de RE β codifica para dos isoformas, una de 55 kDa (485 aa) y otra de 60 kDa (530 aa), las cuales se expresan principalmente en riñón, timo, pulmón, bazo, cerebro, próstata, testículo, ovario, sistema digestivo, vejiga y glándula mamaria (Enmark et al., 1997; Moore et al., 1998; Hall et al., 1999).

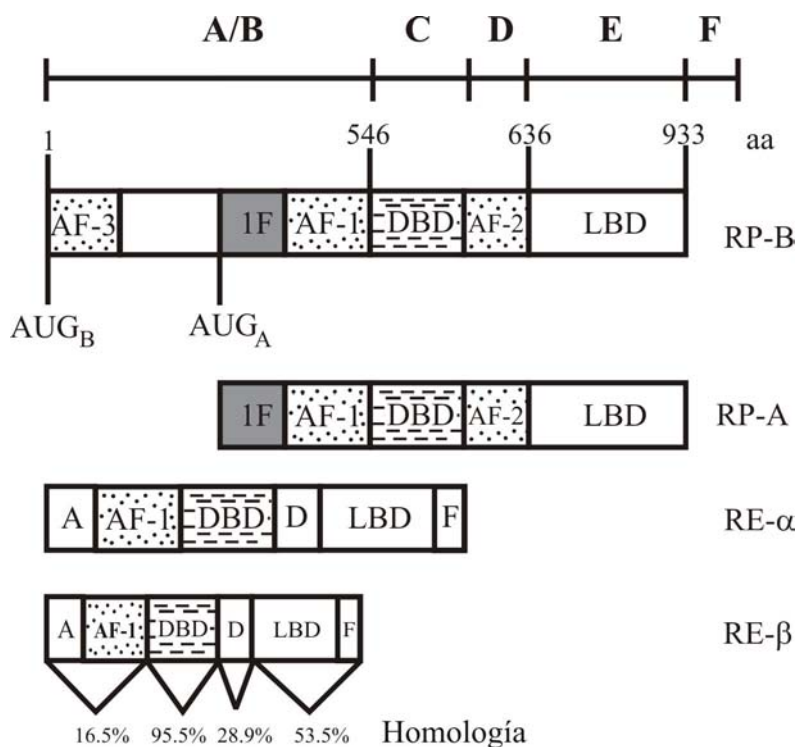


Fig. 4. Comparación de las estructuras de las isoformas del RE: RE α y RE β y del RP: RP-A y RP-B. A-F dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. AF: función de activación, DBD: dominio de unión al DNA, LBD: dominio de unión al ligando.

De manera general el mecanismo de acción del RE activado por estrógenos es similar al de la P₄.

Algunos experimentos sugieren que algunos compuestos estrogénicos se comportan diferencialmente con los RE (Paech et al., 1997), esta observación y el hecho que los RE heterodimerizan sugiere que la actividad de los compuestos estrogénicos dependerá en parte del contenido de RE α , RE β o ambas (Shughrue et al., 1998).

3.2.4 Regulación de la expresión del receptor a estrógenos en el sistema nervioso central

El RE se ha localizado en diversas áreas y tipos celulares del SNC en diferentes especies. El RE ha sido detectado en diencéfalo de ratas hembras y machos en diversas etapas del desarrollo, presentando un patrón de distribución del RE α y del RE β diferente entre ambos sexos; en el área preóptica y en el hipotálamo el RE presenta un patrón de expresión diferencial tejido-edad y sexo específica, siendo mayor la expresión en hembras que en machos (Yokosuka et al., 1997; Simerly et al., 1990; Shughrue et al., 1997).

En general RE α se expresa altamente en el núcleo anteroventral periventricular, preóptico medio, arcuato, ventromedial y amígdala; mientras que RE β se expresa principalmente en la corteza cerebral, en el hipocampo, el núcleo preóptico periventricular, el núcleo de la cama de la estría terminal, el núcleo paraventricular y supraóptico (Wilson et al., 2002).

En el tallo cerebral, el locus coeruleus y el núcleo parabraquial RE α presenta una mayor expresión en hembras que en machos y esta diferencia no se observa para RE β (Zhang et al., 2002; Saleh et al., 2002), en el núcleo hipogloso, en el núcleo del tracto solitario y en núcleo motor dorsal del vago RE presenta una mayor expresión en hembras que en machos (Schlenker et al., 2006).

En cultivos neuronales provenientes de la neocorteza, el hipocampo, el área preóptica y la medula espinal, se ha observado que se expresan ambas isoformas del RE en colocalización con acetilcolina (Hösli et al., 1999; Hösli et al., 2000). En estudios de inmunolocalización en tejido humano se observó que en la corteza hay expresión de RE β más no así de RE α , en oligodendrocitos existe la presencia de ambos, en la capa molecular del cerebelo solo hay presencia de RE β y en las células de Purkinje solo de RE α , mientras que en el hipocampo sólo se encontró RE α , en células endodiales de la medula oblongata se encontró la presencia de RE β (Taylor et al., 2000). Además se ha relacionado la expresión de las isoformas del ER con sitios muscarínicos, colinérgicos, nicotínicos, influyendo también con otros sistemas de neurotransmisores tales como las monoaminas y otros neuropéptidos (Hösli et al., 1999).

De manera general el RE es regulado a la baja por E₂, sin embargo, en tejidos como el hipocampo la regulación depende de la isoforma del receptor (Wang et al., 1999; Mendoza-Garcés L., 2003).

3.3 Diferenciación sexual del cerebro

La diferenciación sexual del cerebro es el proceso durante el cual las hembras y los machos experimentan transformaciones celulares y anatómicas que determinan diferencias en la fisiología cerebral en ambos sexos. Esto depende en gran medida del medio hormonal en el cual esté en contacto el cerebro durante un período crítico de su desarrollo (Gorski, 1968).

El proceso de diferenciación sexual es la consecuencia de la acción organizacional de las hormonas esteroides, es decir, los estrógenos o los andrógenos aromatizables en zonas específicas del cerebro. Así, se han encontrado una gran cantidad de diferencias morfológicas y funcionales entre diversos núcleos del hipotálamo, amígdala y estría terminal. Además, existen diferencias sexuales en el espesor de varias regiones en la corteza cerebral y en el número de neuronas en el esplenio del cuerpo calloso, y de neurotransmisores, neuropéptidos y neuroreguladores (Arnold & Gorski, 1984; Herrera-Gutierrez et al., 2005).

Se ha establecido que la exposición perinatal a estradiol derivada de la aromatización de la testosterona es responsable de la organización cerebral en machos y hembras (Arnold, 1984). En condiciones fisiológicas las hembras de mamíferos en desarrollo presentan ovarios generalmente quiescentes además de proteínas plasmáticas que unen estrógenos con alta afinidad, así el desarrollo normal del cerebro y del tracto reproductivo ocurre en ausencia de estrógenos. En contraste, el cerebro del macho está expuesto a altos niveles de estrógenos sintetizados localmente a través de la aromatización de la testosterona testicular. Estas diferencias sexuales en la síntesis y exposición hormonal resultan en el desarrollo de diferentes circuitos neuroanatómicos, funciones neuroendócrinas y comportamientos entre machos y hembras (Patisaul et al., 2006).

Recientemente se ha verificado la importancia de la α -fetoproteína en la protección de los fetos hembra de la desfeminización o masculinización mediante la unión de estradiol circulante de la madre o de fetos macho vecinos (Bakker et al., 2006). La α -fetoproteína es una glicoproteína que se produce en grandes concentraciones durante la vida embrionaria por los hepatocitos y en menor medida por el tracto gastrointestinal y el riñón (De Mees et al., 2006).

Se ha caracterizado el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro en muchas especies. En roedores, este período abarca desde los cuatro o los tres últimos días de la gestación hasta los primeros cinco días de vida postnatal (Gorski, 2002). Algunos autores han demostrado que este período puede extenderse hasta los primeros 18 días de vida extrauterina (Cooke et al., 1998; Herrera-Gutierrez et al., 2005). En este período ocurre una serie de cambios en el eje hipotálamo-hipófisis que determinan el aumento de la concentración de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona leutinizante (LH) sérica, la FSH induce la actividad enzimática de la aromatasa en el ovario, lo que se traduce en la liberación de estrógenos, hacia el día 10 los niveles de α -fetoproteína sérica disminuyen y por tanto aumenta la concentración de estrógenos libres en la circulación y en el SNC lo que permite que los estrógenos ejerzan sus acciones inhibitoras sobre el eje hipotálamo-hipófisis (Ojeda et al., 1994).

Así, cambios en el medio hormonal durante este período pueden afectar el desarrollo reproductivo y provocar cambios en la organización cerebral en la vida adulta. Los compuestos ambientales con actividad endócrina administrados durante este período tienen el potencial de afectar irreversiblemente el desarrollo del sistema endócrino-reproductivo, lo cual resulta en una disfunción reproductiva en los adultos (Masutomi et al., 2003). Se han caracterizado los efectos de algunos compuestos ambientales (metoxicloro, genisteína, diisononil ftalato, clorotriazinas, DDT, vinclozolina, fenitroton, etc.) con actividad tanto estrogénica como anti-androgénica en roedores administrados tanto por vía oral o por inyección durante el período crítico de diferenciación, resultando en una inducción de anomalías morfológicas en el tracto reproductivo de la hembra, así como, alteraciones en los testículos epidídimo y/o próstata en los machos (Delclos et al., 2001;

Yoshida et al., 2001), alteraciones en el volumen del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica y en la respuesta de la hipófisis a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), alteración de la distancia anogenital y del inicio de la pubertad, así como, del comportamiento reproductivo (Masutomi et al., 2003; Kitamura et al., 2005).

En ratas hembra desfeminizadas por el tratamiento hormonal con E₂ y testosterona durante el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro se observó que el contenido del RNAm del RP aumentaba a corto plazo (3 horas) tanto en el área preóptica como en el hipotálamo, mientras que la inducción del RNAm del RP en respuesta a E₂ después de la apertura vaginal disminuía en el hipotálamo pero no en el área preóptica. Así mismo, se observó la disminución de células inmunoreactivas a RP tanto en el área preóptica como en el hipotálamo (Arrieta, et al. 2003).

3.4 Agentes estrogénicos ambientales

Los compuestos con actividad endócrina son una preocupación creciente entre el público en general y han sido objeto de un largo debate, hasta ahora cientos de compuestos han sido identificados con actividad endócrina potencial, principalmente por su capacidad de unirse al RE *in vitro* e iniciar la transcripción (Kuipier et al., 1998). Las afinidades relativas de unión de estos compuestos por RE son extremadamente bajas (de 1/1000 a 1/1000000 de la del 17 β -estradiol), sin embargo tanto compuestos naturales como sintéticos han demostrado evocar respuestas biológicas en un gran número de especies animales (Patisaul et al., 2006).

3.4.1 Bisfenol A

El bisfenol A (2,2-bis-4-hidroxifenil propano) es uno de los compuestos ambientales más comunes con actividad endócrina (Fig. 5). Se sabe que tiene actividad tanto estrogénica como antiandrogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (Sohoni et al., 1998) y recientemente se demostró que es un antagonista de la acción del receptor a hormonas tiroideas (Zoeller R.T., 2005). El bisfenol A es un xenoestrógeno usado en la manufactura

de plásticos policarbonados y resinas epóxicas de las cuales una gran variedad de productos son fabricados. Además es usado como aditivo en otros tipos de plásticos como el cloruro de polivinil (PVC) y el teraftalato de polietileno (PET) (Welshons et al., 2006).



Fig. 5. Estructura química del bisfenol A (2,2-bis-4-hidroxifenil propano).

Se ha mostrado que una polimerización incompleta de estos productos durante la manufactura y/o una despolimerización debida al incremento de la temperatura, resulta en la dispersión del compuesto en el medio en concentraciones que son suficientes para inducir la proliferación de células reguladas por estrógenos (Biles, 1997). Recientemente muchos estudios han confirmado niveles detectables de bisfenol A en poblaciones estadounidenses, europeas y japonesas en orina, liquido amniotico, plasma materno y fetal, tejido placentario, saliva, y en leche de madres lactantes (Rubin et al. 2006).

En ratas la exposición prenatal a bisfenol A produce una modificación en la distancia anogenital (un caracter sexualmente dimórfico, siendo los machos los que presentan una mayor distancia anogenital), aumento en el tamaño prostático, decremento en el peso del epidídimo, alteración en la ciclicidad estral y de niveles plasmáticos de la hormona leutinizante, además de una inducción de hiperprolactinemia y alteraciones en la expresión de RE (Ramos et al., 2003).

Además, la exposición neonatal a bisfenol A activa el comportamiento agresivo, aumenta los efectos de recompensa dependientes del receptor de dopamina D1 inducidos por metanfetaminas psicoestimulantes y causa una regulación positiva de la respuesta inmune, especialmente de la respuesta de los linfocitos T cooperadores en los adultos (Yoshino et al., 2004; Suzuki et al., 2003). Más aún el bisfenol A induce la liberación de dopamina de manera no genómica a través de proteínas de unión a guanina y canales de calcio tipo N en cultivos de células PC12 ó feocromocitoma de glándula suprarrenal (Yoneda et al., 2003).

El bisfenol A es un agonista estrogénico que puede unirse a ambas isoformas del RE (Pennie et al., 1998), además que a concentraciones bajas puede inducir efectos estrogénicos rápidos iniciados en la membrana lo que sugiere que su administración puede interferir con la señalización estrogénica normal.

3.4.2 Atrazina

La atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) es un herbicida de uso extensivo en la agricultura (Fig. 6). En las plantas el principal modo de acción de la atrazina es a través de la inhibición de la fotosíntesis, específicamente inhibe la transferencia electrónica en el sitio reductor del complejo II del cloroplasto (Eldridge et al., 1999). La exposición en humanos ha sido confirmada y de hecho aproximadamente el 60% de la población estadounidense está expuesta a la atrazina (Gammon et al., 2005). Estudios epidemiológicos han relacionado la exposición ambiental y/o ocupacional a la atrazina con un incremento en la mortalidad y en la incidencia de linfoma de tipo no-Hodgkin (MacLennan et al., 2003). Sin embargo, los efectos en las funciones celulares en los mamíferos están pobremente caracterizados.

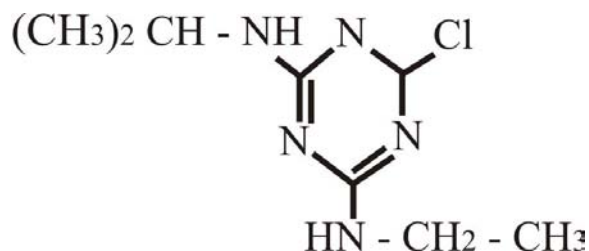


Fig. 6. Estructura química de la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina).

La administración crónica de atrazina en roedores causa una senescencia prematura reproductiva, una condición en la que los ciclos ováricos regulares son reemplazados por una persistente cornificación vaginal y ovarios polifoliculares que determinan la secreción continua de estradiol (Cooper et al., 1995). La atrazina también causa una aparición prematura de tumores mamarios (Laws et al., 2000). En dosis elevadas (50–300 mg/kg) suprime los picos de hormona leutinizante y prolactina inducidos por estrógenos (Cooper, 2000), además se presenta un incremento en la incidencia de pseudoembarazo caracterizado

por períodos prolongados de la etapa del diestro, cuerpos lúteos grandes presentes en los ovarios y P₄ sérica elevada (Cooper et al., 1996).

Así mismo se ha reportado una reducción de los niveles de testosterona y aumento de los niveles de triiodotironina (Friedmann et al., 2002; Stoker et al., 2002), así como, supresión del sistema inmunológico (Rooney et al., 2003). Se ha demostrado también que la atrazina reduce la unión del E₂ a ER α de manera dosis dependiente a través de un mecanismo no competitivo in vitro (McMullin et al., 2004).

3.4.3 Efectos de la administración de bisfenol A y atrazina en el sistema nervioso central

Se ha encontrado que la administración de atrazina disminuye las concentraciones de norepinefrina y aumenta las de dopamina en el hipotálamo (Cooper, 1999). De manera importante estos cambios en la actividad hipotalámica y en la secreción hormonal de la pituitaria inducidos por atrazina son observados tanto en presencia como en ausencia de estradiol endógeno o exógeno (Stoker et al., 2002). De acuerdo con esta observación estudios in vitro en células PC12 mostraron una baja, dependiente de la dosis en los niveles de dopamina intracelulares y en la liberación y la concentración de norepinefrina (Das et al., 2000), además se observó una reducción en la expresión de la dopamina β -hidroxilasa después de la administración de atrazina.

En ratas la exposición aguda (100 mg/kg) a atrazina disminuye la tasa de disparo espontáneo de las células de Purkinje y los potenciales del cerebelo evocados por estimulación eléctrica (Podda et al., 1997). La administración crónica de atrazina modifica los niveles de monoaminas en la corteza frontal, el estriado, el núcleo acumbens y el hipotálamo. Así mismo se reportó que causa pérdida de células tanto tirosina hidroxilasa (TH) positivas como TH negativas en el área tegmental ventral y en la sustancia nigra pars compacta (Rodríguez et al., 2005).

Recientemente se demostró en ratones que la atrazina modifica los niveles de expresión de los subtipos de somatostatina de manera dimorfica y regionalmente específica en áreas del hipotálamo y la amígdala (Giusi et al., 2006). De manera interesante la administración de atrazina no modifica ni la tasa de unión al RE, ni la expresión del RNAm

del RP por E₂ en la región anteroventroperiventricular del hipotálamo (AVPV) y el área preóptica media (MPOA) a dosis que bloquean los picos de LH en ratas SD (McMullin et al., 2004).

En roedores la administración de bisfenol A durante el periodo pre- o postnatal incrementa la expresión del RNAm de RE α en el hipotálamo medio basal de hembras prepúberes y en la hipófisis anterior de machos (Khurana et al., 2000), además interrumpe la diferenciación sexual del locus coeruleus (Kubo et al., 2003). Se ha demostrado que la administración de bisfenol A en ratas adultas induce de manera efectiva la expresión de las isoformas de RP en el núcleo ventromedial del hipotálamo y el área preóptica (Funabashi et al., 2003). Así mismo se ha reportado que la administración prenatal de bisfenol A incrementó la expresión del RNAm del RE β en el área preóptica de ratas macho adultas (Ramos et al., 2003). Recientemente se demostró que dosis bajas de bisfenol A (25 ng a 250 μ g) disminuyen el número total de células inmunoreactivas tanto a TH (cuya expresión es sexualmente dimórfica siendo mayor en hembras que en machos), como, de células que coexpresan TH y RE α en el área preóptica anteroventral periventricular de ratas y ratones hembras y machos (Rubin et al., 2006; Patisaul et al., 2006)

4. Planteamiento del Problema

Se han caracterizado muchos de los efectos fisiológicos del bisfenol A y la atrazina sobre el SNC, sin embargo, se desconocen los efectos sobre el contenido de las isoformas del RP y del RE a nivel de la proteína en diferentes regiones cerebrales como el área preóptica, el hipocampo, el hipotálamo y la corteza cerebral de la rata adulta cuando se administran durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro.

Esta información es importante para conocer los mecanismos por los cuales el bisfenol A y la atrazina ejercen sus efectos sobre el SNC, ya que se ha demostrado que las hormonas esteroides sexuales son cruciales en la diferenciación sexual del cerebro y que muchos de los efectos de las hormonas sexuales están mediados por sus receptores intracelulares específicos. Por lo que en el presente proyecto se estudió el efecto de la administración de bisfenol A y atrazina en el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro sobre el contenido de las isoformas del RE y RP a nivel de la proteína en el SNC de la rata adulta, usando la técnica de Western Blot.

5. Hipótesis

La administración de bisfenol A y atrazina durante la etapa de la diferenciación sexual del cerebro modificará el contenido de las isoformas del RP y del RE en el cerebro de la rata adulta.

6. Objetivos

Objetivo General: Conocer los efectos de la administración de bisfenol A y de atrazina durante la diferenciación sexual del cerebro sobre el contenido del RP y del RE en el hipotálamo y el área preóptica de la rata adulta.

Objetivos Específicos:

Determinar la isoforma predominante del RP y del RE en las diferentes regiones cerebrales de la rata adulta después de la administración de bisfenol A y atrazina durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro.

Caracterizar los efectos tejido-específicos de la administración de bisfenol A y atrazina sobre el contenido del RE y RP en el cerebro de la rata.

7. Materiales y Métodos

7.1 Animales de Experimentación

Se utilizaron ratas hembra recién nacidas de la cepa Sprague Dawley (10 g). Al día 3 postnatal las ratas fueron asignadas de manera aleatoria a los siguientes tratamientos vía subcutánea (n=4): 1) bisfenol A (40 mg/kg); 2) bisfenol A (80 mg/kg); 3) atrazina (40 mg/kg); 4) vehículo (propilenglicol); 5) control (benzoato de estradiol); 6) machos intactos. Se utilizó benzoato de estradiol como control debido a que se conocen los efectos de la desfeminización por estradiol sobre la expresión del RE y del RP en el hipotálamo y el área preóptica, además se utilizaron ratas macho intactas para comparar los cambios sobre el patrón de expresión de los receptores en las ratas hembra tratadas.

Las ratas fueron alimentadas por sus madres hasta el destete, posteriormente se separaron a las ratas inyectadas de sus madres, manteniéndose bajo un ciclo luz:oscuridad 12:12 con agua y comida “*ad libitum*”.

A las 10 semanas de edad en la etapa adulta se determinó el ciclo estral mediante frotis vaginales clasificándolas de acuerdo a la citología: diestro (leucocitos), proestro (células epiteliales nucleadas), estro (células epiteliales cornificadas), metaestro (leucocitos y células epiteliales cornificadas). Se sacrificaron a los animales por decapitación en estro (ya que el benzoato de estradiol utilizado como control positivo de desfeminización arresta el ciclo estral en estro) e inmediatamente se disecaron los diferentes tejidos cerebrales: área preóptica, hipocampo, hipotálamo, y corteza, manteniéndolos a -70°C, para su posterior procesamiento.

7.2 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Se homogenizaron los diferentes tejidos en buffer de lisis con una solución de inhibidores de proteasas (Tris-HCl 10 mM, ditiotretitol 1 mM, glicerol al 30%, triton al 1%,

Azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4 μ g/ml, aprotinina 22 μ g/ml, PMSF 1mM, ortovanadato de sodio 1mM), en una relación de 1 ml de buffer/1 g de tejido a 4°C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15000 rpm, durante 15 min, a 4°C para obtener en el sobrenadante las proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford.

7.3 Western Blot

Las proteínas totales de cada región se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 7.5% a 80 V durante 2 horas. Cada muestra se preparó con buffer de carga (tris 0.5 M pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 2%, β – mercaptoetanol al 5%) en un volumen 1:1, las cuales se hirvieron durante 5 min, para posteriormente depositarse en los geles.

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 15 v por 1 hora en una cámara semihúmeda. Las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS.

Las membranas fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente con anticuerpo primario (1:250; Santa-Cruz, sc-810 que reconoce a las isoformas del RP; sc-6821 que reconoce al RE β ; sc-8002 que reconoce a RE α). Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 min.

Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1:3000; Santa-Cruz, sc-2005). Para determinar la presencia de los receptores se utilizó un método de detección (quimioluminiscencia potenciada) de alta sensibilidad, en el que la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario actúa sobre el

peróxido de luminol en presencia de un potenciador de la reacción y se detecta una señal quimioluminiscente al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total analizada en los geles, se determinó el contenido de α -tubulina (control de carga) en cada una de las muestras en cada experimento.

7.4 Análisis de resultados

Cada placa radiográfica fue sometida a un análisis densitométrico utilizando el programa Scion Image, para cuantificar el contenido de los receptores, de acuerdo a la intensidad de cada banda. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post-hoc de Tukey. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para dicho análisis.

8. Resultados

Para determinar el contenido de las isoformas del RP y del RE en el hipotálamo y el área preóptica de las ratas tratadas con bisfenol A y atrazina, se extrajeron proteínas totales del hipotálamo y área preóptica de ratas hembra Sprague Dawley adultas. Se realizaron ensayos de Western Blot como se describió en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 7 se presenta la detección de las isoformas del RP y del RE en el hipotálamo. Se detectaron bandas de 110, 80, 66 y 55 kDa correspondientes a RP-B, RP-A, RE- α y RE- β , respectivamente en cada uno de los tratamientos. Como se observa en las figuras 7 y 8A no hubo cambios significativos en el contenido de las dos isoformas del RP.

El contenido de RE- α incrementó significativamente en el hipotálamo de las ratas tratadas con bisfenol A a la dosis de 40 mg/kg en comparación con el vehiculo, BE y atrazina ($p < 0.05$). (Figs. 7 y 8B). Los machos presentaron un mayor contenido de RE- α en comparación con los distintos grupos de ratas hembra. En el caso del RE- β se observó un incremento no significativo en su contenido con los tratamientos de bisfenol A (40 mg/kg) y atrazina (Figs. 7 y 8B).

En lo que respecta al área preóptica, no se observaron cambios significativos en el contenido de ninguna de las isoformas del RP (Figs. 9 y 10). Para el caso del RE, el contenido del RE- β presentó un aumento significativo ($p < 0.05$) después del tratamiento con atrazina comparado con el BE (Fig. 9 y 10B). En el contenido de RE- α se observó un aumento no significativo con el tratamiento con atrazina (Fig. 10).

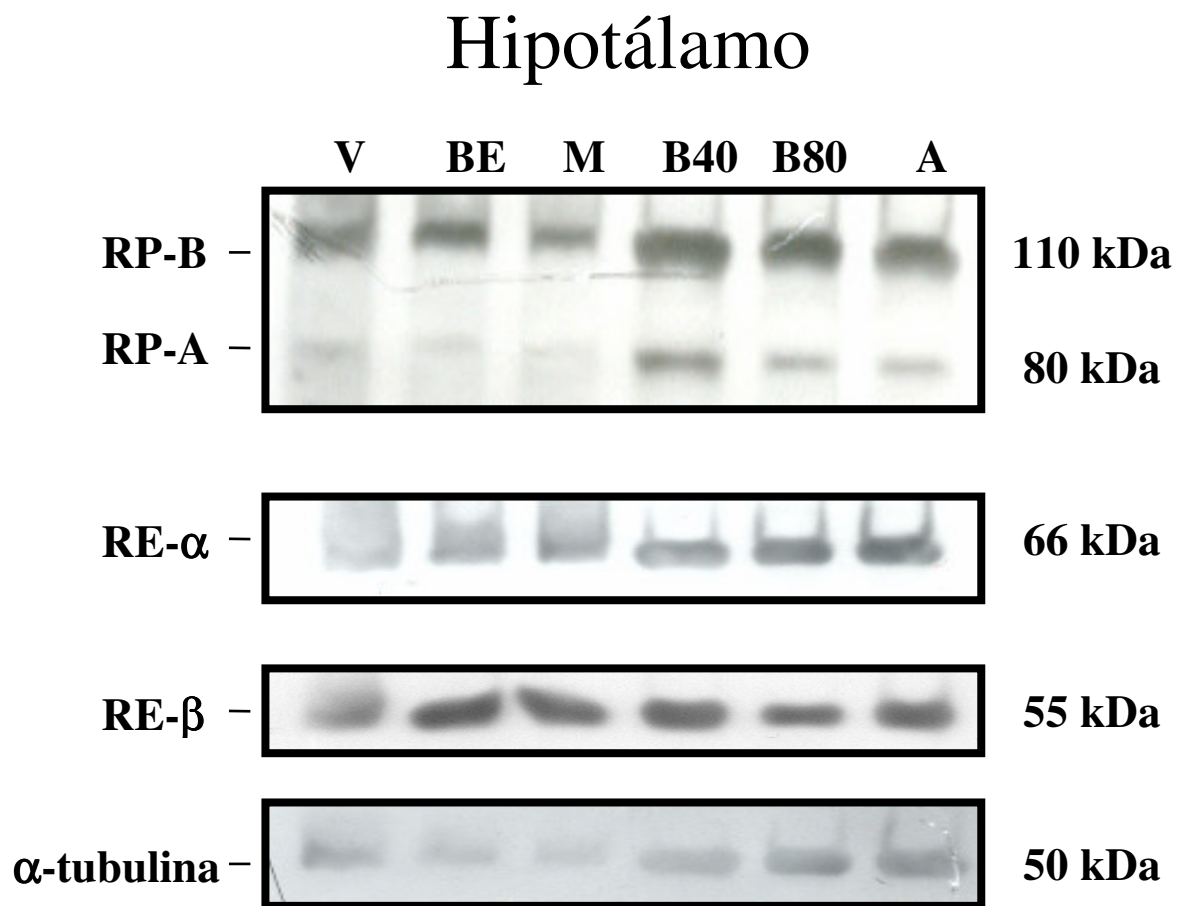


Figura 7. Ensayo de *Western Blot* de las isoformas del RP y del RE en el hipotálamo de ratas adultas tratadas con bisfenol A y atrazina durante el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro. Ensayo representativo de 4 experimentos de Western Blot. Se muestra también un ensayo para α -tubulina que se utilizó como control de carga. V: Vehículo; BE: Benzoato de estradiol; M: Machos; B40: Bisfenol A (40 mg/kg); B80: Bisfenol A (80 mg/kg); A: Atrazina.

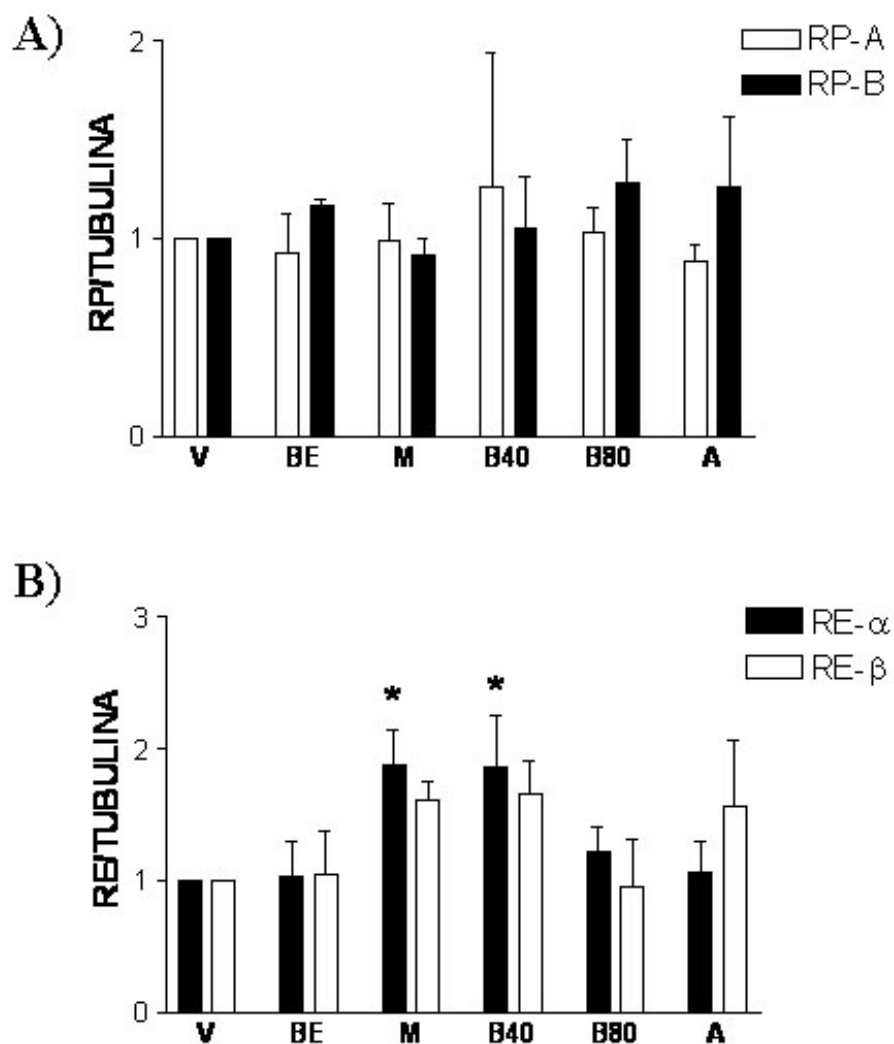


Figura 8. Análisis densitométrico del contenido de las isoformas del RP y del RE en el hipotálamo de ratas adultas tratadas con bisfenol A y atrazina durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro. Las isoformas del RP (A) y del RE (B) detectadas por Western Blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los de α -tubulina. Las gráficas muestran el promedio $\pm$ E.S. de 4 ensayos. * $p < 0.05$ vs Veh, BE y Atrazina. V: Vehículo; BE: Benzoato de estradiol; M: Machos; B40: Bisfenol A (40 mg/kg); B80: Bisfenol A (80 mg/kg); A: Atrazina.

Área preóptica

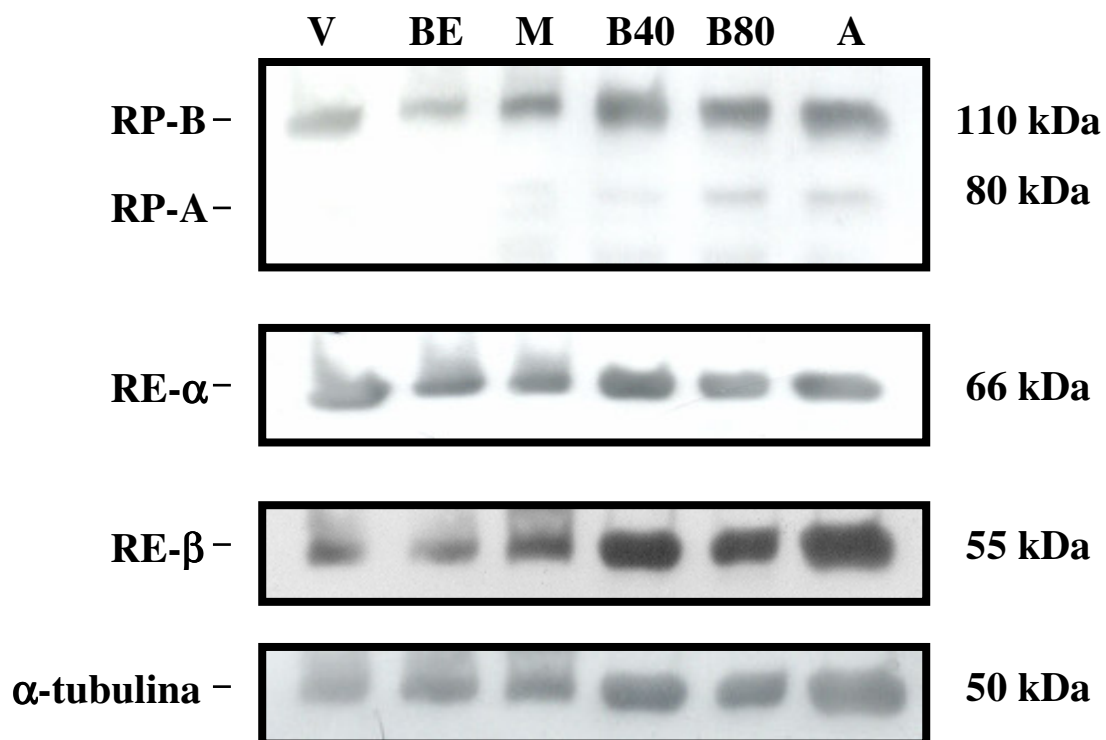


Figura 9. Ensayo de *Western Blot* de las isoformas del RP y del RE en el área preóptica de ratas adultas tratadas con bisfenol A y atrazina durante el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro. Ensayo representativo de 4 experimentos de Western Blot. Se muestra también un ensayo para α -tubulina que se utilizó como control de carga. V: Vehículo; BE: Benzoato de estradiol; M: Machos; B40: Bisfenol A (40 mg/kg); B80: Bisfenol A (80 mg/kg); A: Atrazina.

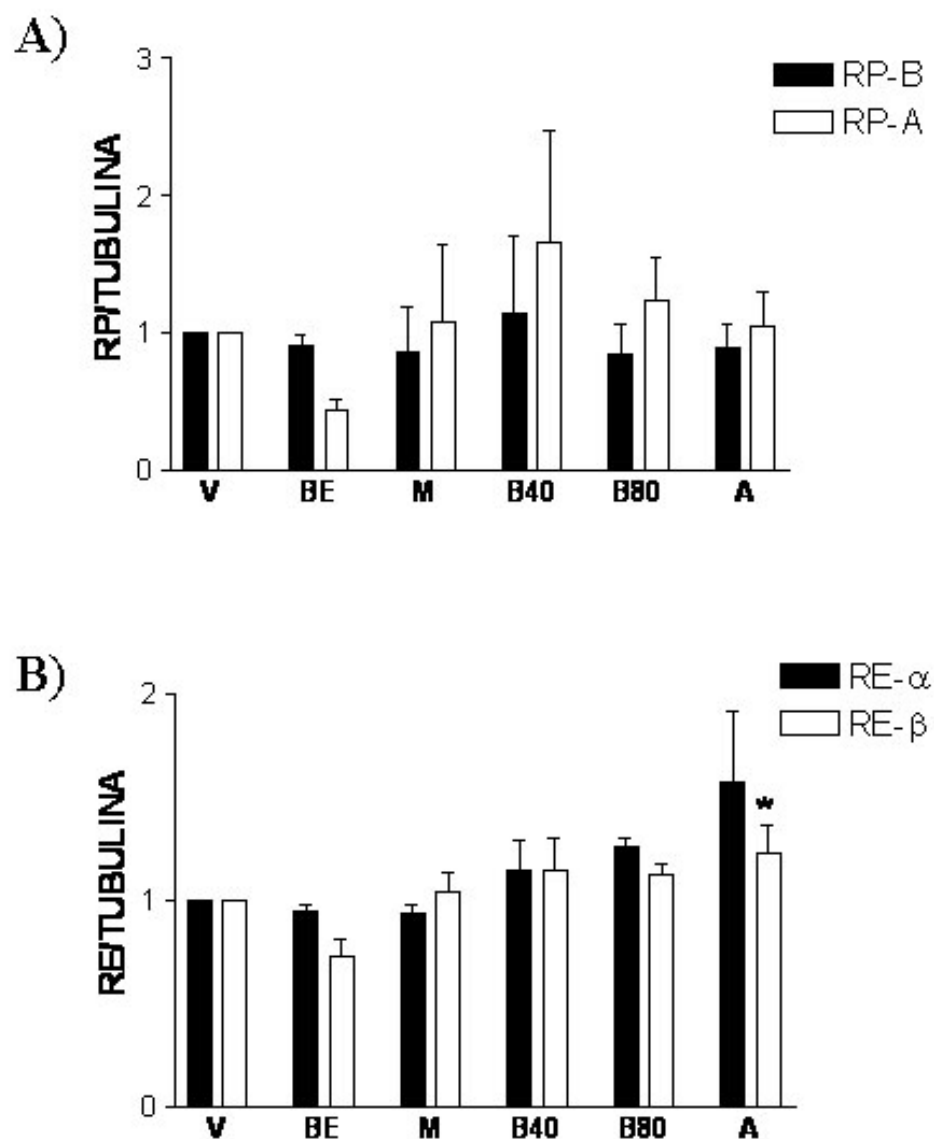


Figura 10. Análisis densitométrico del contenido de las isoformas del RP y del RE en el área preóptica de ratas adultas tratadas con bisfenol A y atrazina durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro. Las isoformas del RP (A) y del RE (B) detectadas por Western Blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los de α -tubulina. Las gráficas muestran el promedio $\pm$ E.S. de 4 ensayos. * $p < 0.05$ vs BE. V: Vehículo; BE: Benzoato de estradiol; M: Machos; B40: Bisfenol A (40 mg/kg); B80: Bisfenol A (80 mg/kg); A: Atrazina.

9. Discusión

En este trabajo se estudió la expresión de las isoformas del RP y del RE a nivel de la proteína en ratas adultas hembra después de la administración de atrazina y bisfenol A durante la diferenciación sexual del cerebro mediante el uso de la técnica de *Western Blot*.

Los resultados obtenidos muestran que tanto el bisfenol A (40 mg/kg) como la atrazina modifican el contenido de las isoformas del RE de manera tejido-específica. En el hipotálamo las ratas tratadas con bisfenol A (40 mg/kg) presentaron un incremento significativo en el contenido del RE- α , esto concuerda con lo reportado respecto a que el bisfenol A induce un aumento en la expresión a nivel del RNAm en el hipotálamo de ratas hembra (Khurana et al., 2000).

De manera general los estrógenos regulan a la baja sus receptores, sin embargo debido a la existencia de coactivadores de RE tejido-específicos y a la baja afinidad del bisfenol A por el receptor, la activación de éste podría estar desligada de eventos que determinan la degradación del receptor como la fosforilación (Khurana et al., 2000; Kubo et al., 2003).

Los machos presentaron un mayor contenido del RE- α en comparación con los demás grupos de ratas hembra. Esto sugiere que el tratamiento con el bisfenol A durante el período crítico de diferenciación sexual modifica el contenido del receptor adquiriendo un patrón de expresión más parecido al observado en los machos (desfeminización). Se ha reportado que el bisfenol A disminuye también el comportamiento sexual (Kubo et al., 2003).

En el hipotálamo se observó un incremento en el contenido de RE- β con los tratamientos de bisfenol A (40 mg/kg) y atrazina que no resultó significativo. Esto se relaciona con lo reportado previamente en donde el bisfenol A no ejerció efecto alguno sobre la expresión del RE- β a nivel del RNAm en el hipotálamo y la hipófisis de ratas hembra adultas, en lo que respecta a la atrazina y aunque el cambio no fue significativo, la

regulación de la expresión pudiera estar determinada por un mecanismo indirecto (Khurana et al., 2000; McMullin et al., 2004).

En lo que respecta al contenido del RP no se observaron cambios significativos, de manera contraria a lo que se había reportado para el RNAm del RP en diversos núcleos hipotálamicos. Se ha observado ampliamente que el aumento en el RNAm no necesariamente conlleva al aumento de la proteína por lo que el receptor pudiera estar regulado de manera diferente a nivel transcripcional y a nivel traduccional por el bisfenol A (Funabashi et al., 2003). En cuanto a la atrazina, se reportó previamente que no presenta efectos sobre la expresión del RP a nivel del RNAm ni sobre el contenido del receptor (McMullin et al., 2004).

En el área preóptica las ratas tratadas con atrazina presentaron un incremento significativo en el contenido del RE- β en comparación con las tratadas con benzoato de estradiol. Las ratas tratadas con este último presentaron una disminución tanto en el contenido del RP como del RE- α en los tejidos analizados pero no fue significativa, lo que concuerda con lo previamente reportado (Arrieta, et al. 2003). La atrazina no compite con el E₂ por el RE por lo que el mecanismo por el cual la primera induce el aumento del RE- β , podría deberse a la interacción con coactivadores dependientes de RE (McMullin et al., 2004) o por el incremento en la concentración de E₂ circulante debido a la senescencia sexual prematura concomitante a la administración de atrazina (Cooper et al., 1995).

De forma interesante se ha reportado que el bisfenol A induce un aumento en el RNAm del RE- β en ratas macho adultas más no en hembras, lo que coincide con nuestros resultados para el contenido del receptor. No se observaron cambios significativos en el contenido del RE- α ni del RP por la administración de atrazina lo cual concuerda con lo reportado sobre la expresión del RNAm del RP en el hipotálamo y área preóptica de ratas hembra que no fue modificada por la administración de atrazina (McMullin et al., 2004). Sin embargo para el bisfenol A se había reportado una inducción del receptor a nivel del RNAm del RP que no se observa para la proteína lo que pudiera estar relacionado con lo ocurrido en hipotálamo.

Existen muchas controversias al respecto de las dosis y las afinidades de unión de los compuestos ambientales con actividad endócrina. De manera general debido a la baja afinidad de unión por los receptores se utilizaban dosis extremadamente altas para tratar animales experimentales. Sin embargo, un gran número de factores pudieran estar contribuyendo a aumentar la efectividad de estos compuestos *in vivo* como son: almacenaje en grasas, conversión a metabolitos activos, resistencia a la degradación o baja afinidad de unión por proteínas séricas. También ha sido ampliamente reportado que dosis altas y dosis bajas de estrógenos comúnmente resultan en efectos opuestos (Takai et al., 2000). En este trabajo las dosis bajas de bisfenol A y atrazina tuvieron un efecto igual o más efectivo que las dosis altas.

10. Conclusiones

- El contenido de las isoformas del RE se modificó de manera tejido-específica en el cerebro de la rata adulta administrada con bisfenol A y atrazina durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro.
- En el hipotálamo el contenido de RE- α aumentó con el tratamiento de bisfenol A, mientras que en el área preóptica la isoforma que cambió fue RE- β cuyo contenido aumentó con el tratamiento con atrazina.
- El tratamiento con bisfenol A y atrazina durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro no modificó el contenido de las isoformas del RP en el hipotálamo y el área preóptica de la rata hembra adulta.

11. Referencias

- ◆ Allan, G.F., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding *PNAS U S A.* **89**, 11750-11754 (1992).
- ◆ Arnold, A., Gorsky, R.A., Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**, 413-442 (1984).
- ◆ Arrieta, I. Díaz-Ibáñez, L.B., Morales, T., Mendoza-Garcés, L., Morimoto, S., Moreno-Mendoza, N., Cerbon, M.A. Progesterone receptor gene and protein expression in the anterior preoptic area and hypothalamus of defeminized rats. *J. Neurobiol.* **56**, 338-346 (2003).
- ◆ Bakker, J., De Mees, C., Douhard, Q., Balthazart, J., Gabant, P., Szpirer, J., Szpirer, C. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat. Neurosci.* **9**, 220-226 (2006).
- ◆ Beato, M. Induction of transcription by steroid hormones. *Biochem. and Biophys. Acta.* **910**, 95-102 (1987).
- ◆ Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* **56**, 335-344 (1989).
- ◆ Beekman, J.M., Allan, G.F., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1266-1274 (1993).
- ◆ Belle, M.D., Tsutsui, K., Lea, R.W. Sex steroid communication in the ring dove brain during courtship. *Can. J. of Physiol and Pharmacol.* **81**, 359-370 (2003).
- ◆ Belle, M.D., Sharp, P.J., Lea, R.W. Aromatase inhibition abolishes courtship behaviours in the ring dove (*Streptopelia risoria*), and reduces androgen and progesterone receptors in the hypothalamus and anterior pituitary gland. *Mol. and cell. Biochem.* **276**, 193-204 (2005).
- ◆ Bernard, D.J., Bentley, G.E., Balthazart, J., Turek, F.W., Ball, G.F. Androgen receptor, estrogen receptor α and estrogen receptor β show distinct patterns of expression in forebrain song control nuclei of european starlings. *Endocrinol.* **140**, 4633-4643 (1999).
- ◆ Bethea, C.L., Widmann, A.A. Differential expression of progestin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology.* **139**, 677-687 (1998).
- ◆ Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H., Hollifield, H.C. Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3541-3544 (1997).
- ◆ Bottoni, L., Lucini, V., Massa, R. Effect of progesterone on the sexual behaviour of the male japanese quail. *Gen. and Comp. Endocrinol.* **57**, 345-351 (1985).

- ◆ Brown, T.J., MacLusky, N.J., Shanabrough, M., Naftolin, E. Comparison of age- and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progestin receptor induction in the rat brain. *Endocrinology*. **126**, 2965-2972 (1990).
- ◆ Camacho-Arroyo, I., Ruiz, A., Gamboa-Domínguez, A., Pérez-Palacios, G., Cerbón, M.A. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J. of Endocrinol.* **142**, 311-316 (1994).
- ◆ Camacho-Arroyo, I., Pérez-Palacios, G., Pasapera, A.M., Cerbón, M.A. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and cerebral cortex of the rabbit. *J. of Steroid Biochem. and Mol. Biol.* **50**, 299-303 (1994).
- ◆ Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., Pérez-Palacios, G., Cerbón, M.A. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev. de Invest. Clin.* **47**, 329-340 (1995).
- ◆ Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Cerbón, MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport*. **9**, 3993-3996 (1998).
- ◆ Camacho-Arroyo, I., Villamar-Cruz, O., Gonzalez-Arenas, A., Guerra-Araiza, C. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology*. **76**, 267-271 (2002).
- ◆ Camacho-Arroyo, I. Progesterone Receptor Isoforms Expression and Progesterone Actions in the Brain. *Recent Research in Developmental Life Sciences*. **1**, 221-242 (2003).
- ◆ Camacho-Arroyo, I., Gonzalez-Arenas, A., Gonzalez-Agüero, G., Guerra-Araiza, C., Gonzalez-Moran, G. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp. Biochem. and Physiol.* **136**, 447-452 (2003).
- ◆ Cerbon, M.A., Pasapera, A.M., Gutiérrez-Sagal, R., García G.A., Pérez-Palacios, G. Variable expression of the uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid Biochem.* **36**, 1-6 (1990).
- ◆ Chambraud, B., Berry, M., Redeuilh, G., Chambon, P., Baulieu, E.E. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of heat shock protein-90 complex. *J. of Biol. Chem.* **265**, 20686-20691 (1990).
- ◆ Christensen, K., Estes, P.A., Onate, S.A., Beck, C.A., DeMarzo, A., Altman, M., Liberman, B.A., St John, J., Nordeen, S.K., Edwards, D.P. Characterisation and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1755-1770 (1991).
- ◆ Clemm, D.L., Sherman, L., Boonyaratanakornkit, V., Schrader, W., Weigel, N., Edwards, D.P. Differential hormone-depend phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol.* **14**, 52-65 (2000).

- ◆ Coneely, O.M., Kettelberger, D.M., Tsai, M.J., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translational initiation event. *J. of Biol. Chem.* **264**, 14062-14064 (1989).
- ◆ Cooke, B., Hegstrom, C.D., Villeneuve, L.S., Breedlove, S.M. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* **19**, 323-362 (1998).
- ◆ Cooper, R.L., Parrish, M.B., McElroy, W.K., Rehnberg, G.L., Hein, J.F., Goldman, J.M., Stoker, T.E., Tyrey, L. Effect of atrazine on the hormonal control of the ovary. *Toxicologist.* **15**, 294-297 (1995).
- ◆ Cooper, R.L., Stoker, T.E., Goldman, J.M., Parrish, M.B., Tyrey, L. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reprod. Toxicol.* **10**, 257-264 (1996).
- ◆ Cooper, R.L., Kavlock, R.J. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *J. Endocrinol.* **152**, 159-166 (1997).
- ◆ Cooper, R.L., Goldman, J.M., Stoker, T.E. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. *Toxicol. Ind. Health.* **15**, 26-36 (1999).
- ◆ Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Goldman, J.M., McElroy, W.K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.* **53**, 297-307 (2000).
- ◆ Das, P.C., McElroy, W.K., Cooper, R.L. Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Toxicol. Sci.* **56**, 324-331 (2000).
- ◆ Delclos, K.B., Bucci, T.J., Lomax, L.G., Latendresse, J.R., Warbritton, A., Weis, C.C., Newbold, R.R. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague Dawley) rats. *Reprod. Toxicol.* **15**, 647-663 (2001).
- ◆ De Mees, C., Laes, J.F., Bakker, J., Smits, J., Hennuy, B., Van Vooren, P., Gabant, P., Szpirer, J., Szpirer, C. Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol. Cell Biol.* **26**, 2012-2018 (2006).
- ◆ Eldridge, J.C., Wetzel, L.T., Tyrey, L. Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. *Reprod. Toxicol.* **13**, 491-499 (1999).
- ◆ Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., Gustafsson, J.A. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 4258-4265 (1997).
- ◆ Friedmann, A.S. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod. Toxicol.* **16**, 275-279 (2002).
- ◆ Funabashi, T., Sano, A., Mitsushima, D., Kimura, F. Bisphenol A increases progesterone receptor immunoreactivity in the hypothalamus in a dose-dependent manner and affects sexual behaviour in adult ovariectomized rats. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 134-140 (2003).

- ◆ Gahr, M. Distribution of sex steroid hormone receptors in the avian brain; functional implications for neural sex differences and sexual behaviours. *Micros. Res. and Tech.* **55**, 1-11 (2001).
- ◆ Gammon, D.W., Aldous, C.N., Carr, W.C. Jr., Sanborn, J.R., Pfeifer, K.F. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Manag. Sci.* **61**, 331-355 (2005).
- ◆ Gasc, J.M., Baulieu, E.E. Regulation by estradiol of the progesterone receptor in the hypothalamus and pituitary: An immunohistochemical study in the chicken. *Endocrinol.* **122**, 1357-1365 (1988).
- ◆ Giangrande, P.H., Pollio, G., McDonnell. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. of Biol. Chem.* **272**, 32889-32900 (1997).
- ◆ Giusi, G., Faccioso, R.M., Canonaco, M., Alleva, E., Vellón, V., Dessi`-Fulgheri, F., Santucci, D. The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somatostatinergic neuronal expression pattern in mice. *Toxicol. Sci.* **89**, 257-264 (2006).
- ◆ González-Arenas, A.A., Reyna-Neyra, A., Gomez, M.J., Mendez, I., Larrieta-Carrasco, M.E., Haces, M.L., Jiménez, B., Camacho-Arroyo, I. Los mensajeros químicos del sistema neuroendócrino. *Edu. Quím.* **3**, 158-162 (2001).
- ◆ Gonzalez-Morán, G., Camacho-Arroyo, I. Changes in the presence of progesterone receptor isoforms in the oviduct magnum of newly-hatched chicks after gonadotropins treatment. *Life Sciences.* **73**, 871-82 (2003).
- ◆ Gonzalez-Morán, G., Camacho-Arroyo, I. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat. Histol. and Embriol.* **27**, 277-282 (1998).
- ◆ Gonzalez-Morán, G., García-Izquierdo, J., Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms in ovary of newly-hatched chick after gonadotropin treatment during embryonic development. *Comp. Biochem. and Physiol.* **132**, 519-526 (2002).
- ◆ Gore-Langton, R.E. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol. and Cell. Endocrinol.* **57**, 187-198 (1988).
- ◆ Gorski, R.A., Influence of age on the response to paranatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinol.* **82**, 1001-1004 (1968).
- ◆ Gorski, R.A. Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Adv. Exp. Med. Biol.* **511**, 57-70 (2002).
- ◆ Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L. Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P., Gaido, K.W. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol. Cell Endocrinol.* **142**, 203-214 (1998).

- ◆ Gustafsson, J.A. Novel aspects of estrogen action. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **7**, 8-9 (2000).
- ◆ Graham, J.D., Clarke, C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrinol. Rev.* **18**, 502-519 (1997).
- ◆ Greenspan, F.S., Strewler, G.J. Endocrinología básica y clínica. Manual Moderno, México, pp. 967 (1998).
- ◆ Guennoun, R., Gasc, J.M. Estrogen-independent and estrogen-induced progesterone receptors, and their regulation by progestins in the hypothalamus and pituitary of the chick embryo: an immunohistochemical study. *Dev. Brain Res.* **55**, 151-159 (1990).
- ◆ Guennoun, R., Reyss-Brion, M., Gasc, J.M. Progesterone receptor in hypothalamus and pituitary during embryonic development of the chick: regulation by sex steroid hormones. *Dev. Brain Res.* **37**, 1-9 (1987).
- ◆ Guerra-Araiza, C., Cerbón, M.A., Morimoto, S., Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expresión pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sciences.* **73**, 1743-1752 (2000).
- ◆ Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., Gonzalez-Arenas, A., Chavira, R., Camacho-Arroyo, I. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. of Neuroendocrinol.* **15**, 984-90 (2003).
- ◆ Guerra-Araiza, C., Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptors isoforms: function and regulation. *Rev. de Inv. Clín.* **52**, 686-691 (2000).
- ◆ Guerra-Araiza, C., Coyoy-Salgado, A., Camacho-Arroyo, I. Sex differences in the regulation of progesterone receptors isoforms expression in the rat brain. *Brain Res. Bull.* **59**, 105-109 (2002).
- ◆ Hall, J.M., McDonnell, D.P. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* **140**, 5566-5578 (1999).
- ◆ Herrera-Gutiérrez, H., Vergara-Onofre, M., Rosado-Garcia, A., Rosales-Torres, A.M. Diferenciación sexual en el sistema nervioso central. *Vet. Mexicana.* **36**, 339-360 (2005).
- ◆ Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takamoto, G.S., Tung, L. Nuclear receptor coactivators and represors. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1167-1177 (1996).
- ◆ Hösli, E., Hösli, L. Cellular localization of estrogen receptors on neurons in various regions of cultured rat CNS: coexistence with cholinergic and galanin receptors. *Int. J. Devl. Neurosci.* **17**, 317-330 (1999).
- ◆ Hösli, E., Rühl, W., Hösli, L. Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors. *Int. J. Devl. Neurosci.* **18**, 101-111 (2000).

- ◆ Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO Journal* **9**, 1603-1614 (1990).
- ◆ Kastrup, Y., Hallbeck, M., Amandusson, A., Hirata, S., Hermanson, O., Blomqvist, A. Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett.* **275**, 85-88 (1999).
- ◆ Kato, J., Hirata, S., Nozawa, A., Mouri, N. The ontogeny of gene expression of progestin receptors in the female rat brain. *J. steroid Biochem. Mol. Biol.* **47**, 173-182 (1993).
- ◆ Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A. Research needs for the risk assessments of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspec.* **104**, 715-740 (1996).
- ◆ Khurana, S., Ranmal, S., Ben-Jonathan, N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology.* **141**, 4512-4517 (2000).
- ◆ Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.* **84**, 249-259 (2005).
- ◆ Knobil, E. The hypothalamic gonadotrophic hormone releasing hormone (GnRH) pulse generator in the rhesus monkey and its neuroendocrine control. *Human Rep.* **3**, 29-31 (1988).
- ◆ Knobil, E., Neil, J. The Physiology of Reproduction. Raven Press, Ltd. USA, pp. 3250 (1998).
- ◆ Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone end sex steroid hormone antagonists. *Endocrinol.* **132**, 2371-2396 (1993).
- ◆ Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R., Aou, S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.* **45**, 345-356 (2003).
- ◆ Kuiper, G.G., Shughrue, P.J., Merchantaler, I., Gustafsson, J.A. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* **19**, 253-286 (1998).
- ◆ Laws, S.C., Carey, S.A., Ferrell, J.M., Bodman, G.J., Cooper, R.L. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol. Sci.* **54**, 154-167 (2000).
- ◆ Lea, R.W., Clarke, J.A., Tsutsui, K. Changes in central steroid receptor expression, steroid synthesis and dopaminergic activity related to the reproductive cycle of the ring dove. *Micros. Res. and Tech.* **55**, 12-26 (2001).

- ◆ Leboucher, G., Beguin, N., Lacroix, A., Kreutzer, M. Progesterone inhibits courtship behaviour in domestic canaries (*Serinus canaria*). *Horm. and Behav.* **38**, 123-129 (2000).
- ◆ Lubischer, J.L., Arnold, A.P. Autoradiographic localization of progestin-concentrating cells in the brain of the zebra finch. *J. of Comp. Neurol.* **291**, 450-456 (1990).
- ◆ Litwack, G. Remembrance: steps leading to the identification, purification, and characterization of the glucocorticoid receptor. *Endocrinol.* **130**, 2433-2434 (1992).
- ◆ MacLennan, P.A., Delzell, E., Sathiakumar, N., Myers, S.L. Mortality among triazine herbicide manufacturing workers. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **66**, 501-517 (2003).
- ◆ MacLusky, N.J., McEwen, B.S. Oestrogen modulates progestin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature.* **274**, 276-278 (1978).
- ◆ Mahesh, V., Brann, D., Hendry, L. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J. of Steroid Biochem. and Mol. Biol.* **56**, 209-219 (1996).
- ◆ Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M. Impact of dietary exposure to methoxchlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology.* **192**, 149-170 (2003).
- ◆ McMullin, T.S., Andersen, M.E., Nagahara, A., Lund, T.D. Pak, T., Handa, R.J., Hanneman, W.H. Evidence that atrazine and diaminochlorotriazine inhibit the estrogen/progesterone induced surge of luteinizing hormone in female Sprague Dawley rats without changing estrogen receptor action. *Toxicol. Sci.* **79**, 278-286 (2004).
- ◆ Mendoza-Rodríguez, C.A., Camacho-Arroyo, I., García, G.A., Cerbón, M.A. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception.* **59**, 339-343 (1999).
- ◆ Mendoza-Garces, L. Expresión de las isoformas α y β del receptor a estrógenos en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral. Tesis, Facultad de Química, UNAM (2003).
- ◆ Misrashi, M., Atger, M., d'Auriol, L., Loosfelt, H., Meriel, C., Fridlansky, F., Guiochon-Mantel, A., Galibert, F., Milgrom, E. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **143**, 740-748 (1987).
- ◆ Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.L., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., Willson, T.M. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 75-78 (1998).
- ◆ Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., De Mayo, F.J., Lydon, J.P., Conneely, O.M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science.* **289**, 1751-1754 (2000).
- ◆ Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hERbeta) and its

- heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 122-126 (1998).
- ◆ Ojeda, S.R., Urbanski, H.F. Puberty in the rat. In: *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. Knobil, E. and Neill, J.D. (eds). 363-409 (1994).
 - ◆ Paech, K., Webb, P., Kuiper, J.M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., Kushner, P. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*. **227**, 1508-1510 (1997).
 - ◆ Pasanen, S., Ylikomi, T., Syväälä, H., Tuohimaa, P. Distribution of progesterone receptor in chicken: novel target organs for progesterone and estrogen action. *Mol. and Cell. Endocrinol.* **135**, 79-91 (1997).
 - ◆ Pasanen, S., Haverinen, M., Pekki, A., Rauta, J., Paranko, J., Syvala, H., Tuohimaa, P., Yikomi, T. Only a small portion of cytoplasmic progesterone receptor is associated with Hsp 90 in vivo. *J. of Cell. Biochem.* **74**, 458-467 (1999).
 - ◆ Patisaul, H.B., Fortino, A.E., Polston, E.K. Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. *Neurotoxicol. Teratol.* **28**, 111-118 (2006).
 - ◆ Pennie, W.D., Aldridge, T.C., Brooks, A.N. Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. *J. Endocrinol.* **158**, R11-14 (1998).
 - ◆ Podda, M.V., Deriu, F., Solinas, A., Demontis, M.P., Varoni, M.V. Spissu, A., Ananay, V., Tolu, E. Effect of atrazine administration on spontaneous and evoked cerebellar activity in the rat. *Pharmacol. Res.* **36**, 199-202 (1997).
 - ◆ Prieto, A., Villamar-Cruz, O., Saqui-Salces, M., Neri-Gomez, T., Almaraz-Nieves, A., Hernández-Molina, V.I., Valdez-Rodriguez, H., Camacho-Arroyo, I. Como Actúan las hormonas esteroides. *Edu. Quím.* **14**, 196-201 (2003).
 - ◆ Ramos, J.G., Varayoud, J. Kass, L., Rodríguez, H., Costabel, L., Munoz-De Toro, M., Luque, E.H. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*. **144**, 3206-3215 (2003).
 - ◆ Rodríguez, R., Carson, M.A., Weigel, N.L., O'Malley, B.W., Schrader, W.T. Dimerization of the chicken progesterone receptor in vitro can occur in the absence of hormone and DNA. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1782-1790 (1990).
 - ◆ Rodriguez, V.M., Thiruchelvam, M., Cory-Slechta, D.A. Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. *Environ. Health Perspec.* **113**, 708-715 (2005).
 - ◆ Rooney, A.A. Matulka, R.A., Luebke, R.W. Developmental atrazines exposure suppresses immune function in male, but not female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* **76**, 366-375 (2003).

- ◆ Rubin, B.S., Lenkowski, J.R., Schaeberle, C.M., Vandenberg, L.N., Ronsheim, P.M., Soto, A.M. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*. **147**, 3681-3691 (2006).
- ◆ Saleh, T.M., Saleh, M.C., Deacon, C.L., Chisholm, A. 17beta-estradiol release in the parabrachial nucleus of the rat evoked by visceral afferent activation. *Mol. Cell Endocrinol.* **186**, 101-110 (2002).
- ◆ Savouret, J.F., Bailly, A., Misrahi, M., Rauch, C., Redeuilh, G., Chauchereau A., Milgrom, E. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J.* **10**, 1875-1883 (1991).
- ◆ Schlenker, E.H., Hansen, S.N. Sex-especific densities of estrogen receptors alpha and beta in the subnuclei of the nucleus tractus solitarius, hypoglossal nucleus, and dorsal vagal motor nucleus weanling rats. *Brain Res.* **1123**, 89-100 (2006).
- ◆ Schowalter, D.B., Sullivan, W.P., Maihle, N.J., Dobson, A.D.W., Soneely, O'Malley, B.W., Toft, D.O. Characterization of progesterone receptor binding to the 90 and 70-kDa heat shock proteins. *J. of Biol. Chem.* **266**, 21165-21173 (1991).
- ◆ Schrader, W.T., Birnbaumer, M.E., Hughes, M.R., Weigel, N.L., Grody, W.W., O'Malley, B.W. Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. *Rec. Prog. of Horm. Res.* **37**, 583-633 (1981).
- ◆ Schwartz, J. A., Zhong, L., Deighton-Collins, J., Zhao, C., Skafar, D. Mutations targeted to predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor- α after its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J. of Biol. Chem.* **277**, 13202-13209 (2002).
- ◆ Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **388**, 507-525 (1997).
- ◆ Shughrue, P.J., Scrimo, P.J., Merchenthaler, I. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology*. **139**, 5267-5270 (1998).
- ◆ Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* **294**, 76-95 (1990).
- ◆ Sohoni, P., Sumpter, J.P. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* **158**, 327-339 (1998).
- ◆ Stoker, T.E., Guidici, D.L., Laws, S.C., Cooper, R.L. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol. Sci.* **67**, 198-206 (2002).
- ◆ Suzuki, T., Mizuo, K., Nakazawa, H., Funae, Y., Fushiki, S., Fukushima, S., Shirai, T., Nanita, M. Prenatal and neonatal exposure to bisphenol A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*. **117**, 639-644 (2003).

- ◆ Syväälä, H., Vienonen, A., Ylikomi, T., Bläuer, M., Zhuang, Y., Tuohimaa, P. Expression of the chicken progesterone receptor forms A and B is differentially regulated by estrogen *in Vivo*. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **231**, 573-576 (1997).
- ◆ Takai, Y., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Hiroi, H., Osuga, Y., Momoeda, M., Yano, T., Taketani, Y. Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on pre-implantation mouse embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 918-921 (2000).
- ◆ Tata, J. R. Signalling through nuclear receptors. *Nat. Rev. of Mol. and Cell. Biol.* **3**, 702-710 (2002).
- ◆ Taylor, A.H., Al-Azzawi, F. Immunolocalization of estrogen receptor beta in human tissues. *J. Mol. Endocrinol.* **24**, 145-155 (2000).
- ◆ Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P., Chambon, P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature.* **333**, 185-189 (1988).
- ◆ Tuohimaa, P., Joensuu, T., Isola, J., Keinänen, R., Kunnas, T., Niemelä, A., Pekki, A., Wallen, M., Ylikomi, T., Kulomaa, M. Development of progestin-specific response in the chicken oviduct. *Int. J. of Dev. Biol.* **33**, 125-134 (1989).
- ◆ Turcotte, B., Meyer, M.E., Bellard, M., Dretzen, G., Gronemeyer, H., Chambon, P. Control of transcription of the chicken progesterone receptor gene: *in Vitro* and *in Vivo* studies. *J. of Biol. Chem.* **266**, 2582-2589 (1991).
- ◆ Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R., Camacho-Arroyo, I. Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res. Bull.* **69**, 276-281 (2006).
- ◆ Wagner, C.K., Nakayama, A.Y., De Vries, G.J. Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology.* **139**, 3658-3661 (1998).
- ◆ Wagner, B.L., Norris, J.D., Knotts, T.A., Weigel, N.L., McDonnell, D.P. The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1369-1378 (1998).
- ◆ Wang, H., Masironi, B., Eriksson, H., Sahlin, L. A comparative study of estrogen receptors alpha and beta in the rat uterus. *Biol. Reprod.* **61**, 955-964 (1999).
- ◆ Warembourg, M., Jolivet, A., Milgrom, E. Immunohistochemical evidence the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea-pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.* **480**, 1-15 (1989).
- ◆ Welshons, W.V., Nagel, S.C., vom Saal, F.S. Large effects from small exposures. III. endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology.* **147**, S56-S59 (2006).

- ◆ Wilson, J. D., Foster, D. W., Williams, J. Textbook of endocrinology. Ed Saunders Company, Philadelphia. Pp. 35-164 (1992).
- ◆ Wilson, M.E., Rosewell, K.L., Kashon, M.L., Shughrue, P.J., Merchentaler, I., Wise, P.M. Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 593-601 (2002).
- ◆ Yoneda, T., Hiroi, T., Osada, M., Asada, A., Funae, Y. Non-genomic modulation of dopamine release by bisphenol A in PC12 cells. *J. Neurochem.* **87**, 1499-1508 (2003).
- ◆ Yoshida, M., Katusda, S., Takenaka, A., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A. Effects of neonatal exposure to a high dose *p-tert*-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicol. Lett.* **121**, 21-33 (2001).
- ◆ Yoshino, S., Yamaki, K., Li, X., Sai, T., Yanagisawa, R., Takano, H., Taneda, S., Hayashi, H., Mori, Y. Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunology.* **112**, 489-495 (2004).
- ◆ Yokozuka, M., Okamura, H., Hayashi, S. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diendencephalon and the amygdala in the rat. *J. Comp. Neurol.* **389**, 81-93 (1997).
- ◆ Zhang, J.Q., Cai, W.Q., Su, B.Y., Zhou, S. Immunocytochemical localization of estrogen receptor beta in the rat brain. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* **35**, 15-20 (2002).
- ◆ Zoeller, R.T. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Mol. Cell Endocrinol.* **242**, 10-15 (2005).