

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología



TESIS DOCTORAL:

*Mecanismos moleculares de acción del Bisfenol A en
próstata y corteza prefrontal de rata*

Memoria para optar al Grado de Doctora por la Universidad de
Granada, presentada por:

Beatriz Castro Bohórquez

Dirigida por:

Esperanza Ortega Sánchez

M^a Pilar Sánchez Medina

Granada, 2014

UNIVERSITY OF GRANADA

School of Medicine

Department of Biochemistry and Molecular Biology III and
Immunology



DOCTORAL THESIS:

*Molecular mechanisms of Bisphenol A action on prostate
and prefrontal cortex of rat*

Submitted to the University of Granada for the degree of Doctor of
Philosophy by:

Beatriz Castro Bohórquez

Thesis Supervisors:

Esperanza Ortega Sánchez

M^a Pilar Sánchez Medina

Granada, 2014

Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales
Autora: Beatriz Castro Bohórquez
ISBN: 978-84-9125-452-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42056>



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Dra. ESPERANZA ORTEGA SÁNCHEZ, Catedrática de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Granada y **Dra. MARÍA PILAR SÁNCHEZ MEDINA**, Profesora Contratada Doctora de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral titulada “MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DEL BISFENOL A EN PRÓSTATA Y CORTEZA PREFRONTAL DE RATA”, de la que es autora BEATRIZ CASTRO BOHÓRQUEZ, ha sido dirigida bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología de la Universidad de Granada.

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, expedimos y firmamos el presente certificado en Granada, a 26 de noviembre de 2014.

Fdo. Esperanza Ortega Sánchez

Fdo. María Pilar Sánchez Medina

La doctoranda Beatriz Castro Bohórquez y las directoras de la tesis Esperanza Ortega Sánchez y Pilar Sánchez Medina, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de las directoras de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 26 de noviembre de 2014

Directoras de la Tesis



Fdo.: Esperanza Ortega
Sánchez

Fdo.: Pilar Sánchez
Medina

Doctoranda



Fdo.: Beatriz Castro
Bohórquez

*Dedicado a la memoria de un ser querido,
mi abuela Práxedes*

Agradecimientos

En primer lugar, mi más amplio agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Esperanza Ortega, por haberme dado esta oportunidad y cuya orientación y conocimientos han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

Gracias asimismo, a la Dra. Pilar Sánchez, mi codirectora de tesis, por su sencillez, paciencia y ayuda.

Agradecerles también a ambas el tiempo y esfuerzo invertidos en este trabajo.

También quisiera hacer patente mi agradecimiento al Dr. Jesús Torres, por su inestimable colaboración.

Al personal del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología (secretaria, técnicos, profesores e investigadores) por su cálida acogida, por tratarme como a una compañera más.

A los centros y departamentos que nos han prestado sus servicios para realizar algunos de los experimentos de la presente tesis doctoral.

A los compañeros predoctorales de diversas disciplinas con los que he tenido el placer de "toparme por el camino", por compartir experiencias enriquecedoras y por ese apoyo mutuo.

A la gente que he conocido durante mis estancias en Londres y Boston, a ellos les debo sin duda el gran recuerdo que guardo al respecto.

Mi agradecimiento sincero para todos

"Lo difícil se consigue, lo imposible se intenta"

•••

(Napoleón Bonaparte)

A Ramsés

Por contagiarme
su optimismo y
creer en mí

A mi familia

A mis padres
(M^a del Mar y
Pepe); a mi
hermano Jorge, a
mi tía Elena y a
mi abuelo Emilio

Por su apoyo
incondicional

I would like to thank Prof. William David Richardson for giving me the opportunity of being part of his lab at the Wolfson Institute for Biomedical Research (UCL) during a short scientific stay abroad. I also thank all the members of the Richardson lab, in particular to Richa Tripathi for her mentoring and guidance along my stay.

I would also like to express my gratitude to Toshihiro Shioda, director of the Molecular Profiling Laboratory (MGH) and associate professor at the Harvard Medical School, for offering me the opportunity to carry out a scientific stay in his lab. I am particularly grateful to Keiko Shioda for her support, help and guidance during my stay.

TABLA DE CONTENIDOS

Índice de Figuras	I
Índice de Tablas	V
Abreviaturas	VII
<i>Abstract</i>	<i>XI</i>
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
1. Marco teórico y antecedentes	3
1.1. Introducción a los disruptores endocrinos	3
1.2. El origen del Bisfenol A y su polémica	5
1.3. Exposición en humanos	7
1.4. Toxicocinética	11
1.5. Efectos generales	13
1.6. Mecanismos de acción propuestos	15
1.7. Marco legal	18
2. Justificación de la Tesis doctoral y de su unidad temática	25
2.1. Estudios en Próstata	25
2.2. Estudios en Corteza Prefrontal	29
<i>Research objectives</i>	<i>37</i>
Capítulo 2: MATERIAL Y MÉTODOS	39
<hr/>	
1. Animales de experimentación	41
2. Equipos, material y reactivos utilizados	42
3. Metodología general	44
3.1. Recogida y procesamiento de las muestras	44
3.2. Análisis hormonal	44
3.3. Análisis de ácidos nucleicos	45
3.3.1. Extracción de ARN y cuantificación	45
3.3.2. Retrotranscripción de ARN	47
3.3.3. Diseño de oligonucleótidos usados para la amplificación	48
3.3.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	50
3.3.5. PCR-Array	54
3.4. Análisis de proteínas	56
3.4.1. Extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares	56
3.4.2. Western blot	58
3.4.3. Inmunohistoquímica	63
3.5. Análisis estadísticos	64

I. Efectos de la exposición adulta a BPA sobre 5α-R y aromatasa en próstata de ratas intactas	69
Diseño experimental	69
Resultados	71
Evaluación del análisis hormonal de sangre (niveles de T y E2)	71
Regulación transcripcional de las isoenzimas 5 α -R y aromatasa	72
Análisis del perfil de expresión proteica	73
Discusión	75
II. Efectos de la exposición adulta a BPA sobre 5α-R1 y 5α-R2 en próstata de ratas castradas	79
Diseño experimental	79
Resultados	81
Evaluación del análisis hormonal de sangre (niveles de T y DHT)	81
Regulación transcripcional de 5 α -R1 y 5 α -R2	82
Implicaciones sobre el peso prostático	83
Discusión	83
III. Efectos de la exposición adulta a BPA sobre genes implicados en neurotoxicidad en CPF de rata	87
Diseño experimental	87
Resultados	89
Análisis del perfil de expresión de los isoenzimas 5 α -R	89
Evaluación de los niveles de expresión de aromatasa	90
Análisis del perfil de expresión de los isoenzimas Tph	91
Regulación transcripcional de genes implicados en respuestas neurotóxicas (PCR-array)	92
Discusión	97
IV. Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en la CPF de ratas macho jóvenes y adultas	101
Diseño experimental	101
Resultados	103
Análisis de la transcripción a PND21	103
Análisis de la transcripción a PND90	105
Discusión	106

V. Efectos de la exposición perinatal a BPA y sus análogos (BPF y BPS) sobre isoenzimas 5α-R y genes relacionados con los sistemas dopaminérgico/serotoninérgico en la CPF de rata hembra joven	111
Diseño experimental	111
Resultados	113
Análisis del perfil de expresión de los isoenzimas 5 α -R	113
Regulación transcripcional de genes relacionados con los sistemas dopaminérgico/serotoninérgico (PCR-arrays)	115
Discusión	119
Capítulo 4: DISCUSIÓN GENERAL	125
<hr/>	
1. Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad	127
2. Mecanismos de acción específicos de tejido	128
3. Implicaciones del período de exposición	129
4. Evaluación de los efectos sexo-específicos	131
5. Otras consideraciones	133
<i>Conclusions</i>	135
REFERENCIAS	137
<hr/>	
ANEXOS	159
<hr/>	
Anexo A: Información complementaria	161
Anexo B: Financiación y contribuciones científicas derivadas	165

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1.1.	Reacción de síntesis del Bisfenol A	5
Figura 1.2.	Estructuras moleculares de (a) Bisfenol A (BPA); (b) Dietilestilbestrol (DES); (c) Estradiol (E2)	6
Figura 1.3.	Tipos de plásticos que pueden liberar BPA	9
Figura 1.4.	Niveles de preocupación del NTP respecto a la posibilidad de que el desarrollo o la reproducción humana puedan ser afectados negativamente por la exposición a BPA	20
Figura 1.6.	Principales hitos en el estudio de los efectos del BPA en la glándula prostática	27
Figura 1.7.	Lóbulos de la próstata de rata	28
Figura 1.8.	Vista coronal de la corteza prefrontal de rata	32
Figura 1.9.	Estructuras moleculares de Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF) y Bisfenol S (BPS)	36

CAPÍTULO 2

Figura 2.1.	Proceso de transcripción inversa	48
Figura 2.2.	Fórmula utilizada para el cálculo de moléculas en la elaboración de la curva estándar para qRT-PCR	52
Figura 2.3.	Formato RT ² Profiler PCR-array utilizado	54
Figura 2.4.	Montaje de la transferencia (western blot)	61

CAPÍTULO 3

Figure 3.1.	<i>Experimental design Study 1: Effects of adult exposure to BPA on 5α-Reductase (5α-R) isozymes and aromatase in prostate of rats</i>	70
Figure 3.2.	<i>Plasma testosterone (T) concentration (panel A), estradiol (E2) concentration (panel B), and estradiol/testosterone (E2/T) ratio (panel C) in control and BPA-treated rats at doses of 25, 50, 300, or 600 μg/kg/d for 4 days</i>	71
Figure 3.3.	<i>mRNA levels of 5α-Reductase type 1 (5α-R1)(panel A), 5α-Reductase type 2 (5α-R2)(panel B), 5α-Reductase type 3 (5α-R3) (panel C) and aromatase(panel D) in prostate of control and BPA-treated rats at doses of 25, 50, 300, or 600 μg/kg/d for 4days</i>	72
Figure 3.4.	<i>Immunohistochemical staining of 5α-Reductase type 1 (5α-R1), 5α-Reductase type 2 (5α-R2) and Aromatase in prostate of control and BPA-treated rats at doses of 25, 50, 300, or 600 μg/kg/d for 4 days</i>	73
Figure 3.5.	<i>Western blots for the detection of 5α-Reductase type 1 (5α-R1) (panel A), 5α-Reductase type 2 (5α-R2) (panel B) and aromatase (panel C) in prostate of control and BPA-treated rats at tolerable daily intake (TDI) dose of 50 μg/kg/d for 4 days</i>	74

Figure 3.6.	<i>Experimental design Study 2: Effects of adult exposure to BPA on 5α-Reductase isozymes (5α-R types 1 and 2) in prostate of castrated rats</i>	80
Figure 3.7.	<i>Plasma testosterone (T) levels (A) and plasma dihydrotestosterone (DHT) levels (B) in castrated rats (C), castrated rats supplemented with T (C+T), and castrated rats supplemented with T plus BPA at doses of 25 μg/kg/d (C+T+BPA25) and 300 μg/kg/d (C+T+BPA300) for 4 days</i>	81
Figure 3.8.	<i>mRNA levels of 5α-R1 (a) and 5α-R2 (b) in prostate of castrated rats (C), castrated rats supplemented with T (C+T), and castrated rats supplemented with T plus BPA at doses of 25 μg/Kg/d (C+T+BPA25) and 300 μg/Kg/d (C+T+BPA300) for 4 days</i>	82
Figure 3.9.	<i>Prostate weight of castrated rats (C), castrated rats supplemented with T (C+T), and castrated rats supplemented with T plus BPA at doses of 25 μg/kg/d (C+T+BPA25) and 300 μg/kg/d (C+T+BPA300) for 4 days</i>	83
Figure 3.10.	<i>Experimental design Study 3: Effects of adult exposure to BPA on genes involved in the physiopathology of rat prefrontal cortex</i>	88
Figure 3.11.	<i>Effects of BPA on mRNA levels of steroid 5α-reductase type 1 (5α-R1) (panel A), 5α-reductase type 2 (5α-R2) (panel B), and 5α-reductase type 3 (5α-R3) (panel C) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls</i>	89
Figure 3.12.	<i>Effects of BPA on protein levels of 5α-reductase type 1 (5α-R1) in prefrontal cortex of BPA-treated female rats and controls</i>	90
Figure 3.13.	<i>Effects of BPA on aromatase mRNA levels (panel A) and protein levels (panel B) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls</i>	90
Figure 3.14.	<i>Effects of BPA on mRNA levels of tryptophan hydroxylase type 1 (Tph1) (panel A) and tryptophan hydroxylase type 2 (Tph2) (panel B) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls</i>	91
Figure 3.15.	<i>Effects of BPA on protein levels of tryptophanhydroxylase type 2 (Tph2) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls</i>	92
Figure 3.16.	<i>Effects of BPA on relative expression of genes involved in neurotoxic responses in prefrontal cortex of male and female rats</i>	94
Figure 3.17.	<i>Experimental design Study 4: Effects of perinatal exposure to BPA on prefrontal cortical dopamine and serotonin systems in both juvenile and adult male rats</i>	102
Figure 3.18.	<i>Effects of BPA (10 μg/kg/day) on relative expression of genes involved in dopamine and serotonin systems in prefrontal cortex of juvenile (PND21) male rats</i>	104

Figure 3.19.	<i>Effects of BPA (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) on relative expression of genes involved in dopamine and serotonin systems in prefrontal cortex of adult (PND90) male rats</i>	106
Figure 3.20.	<i>Experimental design Study 5: Effects of perinatal exposure to Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S on precortical 5α-reductase and, dopamine-serotonin systems related genes in female rats</i>	112
Figure 3.21.	<i>mRNA levels of 5α-Reductase type 1 (5α-R1) in prefrontal cortex of Control, and BPA-, BPF- and BPS-treated female rats at postnatal day 21</i>	113
Figure 3.22.	<i>Panel A and B: mRNA levels of 5α-Reductase type 2 (5α-R2) and type 3 (5α-R3) in prefrontal cortex of Control, and BPA-, BPF- and BPS-treated female rats at postnatal day 21. Panel C and D: Effects of BPA on protein levels of 5α-R2 and 5α-R3 in prefrontal cortex of controls and BPA-treated female rats</i>	114
Figure 3.23.	<i>Dopamine (DA) and serotonin (5-HT) related genes up-regulated (A) and down-regulated (B) by BPA, BPF or BPS in prefrontal cortex of female rats at postnatal day 21</i>	117
Figure 3.24.	<i>Venn diagram showing the overlap in genes significantly altered by BPA, BPF or BPs treatments</i>	118
Figure 3.25.	<i>Metabolizing enzymes of dopamine (A) and serotonin (B) altered by BPA, BPF or BPS</i>	121

Índice de Tablas

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1.	Ingesta diaria estimada de BPA por poblaciones	9
Tabla 1.2.	Principales fuentes de exposición a BPA en la población general	11

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1.	Secuencia nucleotídica (5'-3') de los primers específicos utilizados en la qRT-PCR	49
Tabla 2.2.	Volúmenes de los diferentes reactivos utilizados en la extracción de proteínas según la cantidad de tejido de partida	57
Tabla 2.3.	Anticuerpos primarios utilizados en western blot	62

CAPÍTULO 3

Table 3.1.	<i>List of Neurotoxicity-PCR array genes changed by BPA treatment in prefrontal cortex of male and female adult rats</i>	93
Table 3.2.	<i>Clasificación of genes changed by BPA in male and female adult rats using PANTHER Pathway</i>	95
Table 3.3.	<i>Clasificación of genes changed by BPA in male and female adult rats using PANTHER GO Biological Process</i>	96
Table 3.4.	<i>List of PCR array genes changed by BPA treatment in prefrontal cortex of 21-days-old rats</i>	104
Table 3.5.	<i>List of PCR array genes changed by BPA treatment in prefrontal cortex of 90-days-old rats</i>	105
Table 3.6.	<i>List of PCR array genes significantly altered by BPA, BPF or BPS treatment in prefrontal cortex of 21-days-old female rats</i>	116

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1.	Resumen comparativo de los principales resultados obtenidos en la regulación de 5 α -R y aromatasa por BPA	129
Tabla 4.2.	Resumen comparativo de los principales resultados obtenidos en la regulación de genes relacionados con los sistemas dopaminérgico (DA) y serotoninérgico (5-HT) por BPA	132

Abreviaturas

ADNc	ADN complementario	IDT	Ingesta Diaria Tolerable
AloP	Alopregnanolona	IHQ	Inmunohistoquímica
BPA	Bisfenol A	LOAEL	Nivel mínimo de efecto adverso observable
BPF	Bisfenol F	min	Minutos
BPS	Bisfenol S	NE-3 α ,5 α	Neuroesteroides 3 α 5 α -reducidos
CaP	Cáncer de próstata	NHANES	Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (National Health and Nutrition Examination Survey)
CDCs	Centros de Control y Prevención de Enfermedades (<i>EE. UU</i>)	NIH	Institutos Nacionales de la Salud (de EE.UU)
CEF	Panel de materiales en contacto con alimentos, enzimas, saborizantes y coadyuvantes tecnológicos (<i>de la EFSA</i>)	NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
Cols.	Colaboradores	NTP	Programa de Toxicología Nacional (National Toxicology Program)
CPF	Corteza Prefrontal	qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
d	Día	p.e.	Por ejemplo
DA	Dopamina	PC	Policarbonato
ddH ₂ O	Agua apta para biología molecular	PND	Día postnatal
DES	Dietilestilbestrol	Prog	Progesterona
DHT	Dihidrotestosterona	PVC	Policloruro de vinilo
EC	Comisión Europea	RA	Receptor de andrógenos
EDCs	Disruptores endocrinos	RE	Receptor de estrógenos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria	R-GABA _A	Receptor del GABA tipo A
EPA	Agencia de Protección Ambiental (<i>EE. UU</i>)	RsD	Receptores de DA
et al.	“Y otros” (<i>et alii</i>)	s	Segundos
E2	Estradiol	s.c.	Subcutánea
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos	SCF	Comité Científico de la Comisión Europea sobre la Alimentación Humana
GABA	Ácido gamma-aminobutírico	SDS	Dodecil sulfato sódico
GD	Día gestacional	SNC	Sistema nervioso central
GPCR	Receptor acoplado a proteína G	T	Testosterona
h	Horas	TA	Temperatura ambiente
HPB	Hiperplasia prostática benigna	TDAH	Trastorno por déficit de atención con hiperactividad

T_m	Temperatura de anillamiento
T_{ph}	Triptófano hidroxilasa
UGT	Uridinadifosfato glucuroniltransferasa
V_f	Volumen final
5α-R	5α-Reductasa
5-HT	Serotonina

Abstract

Molecular Mechanisms of Bisphenol A action on Prostate and Prefrontal Cortex of Rat

by

Beatriz Castro Bohórquez

Thesis supervisors:
Prof. Ph.D. Esperanza Ortega
Pilar Sánchez, Ph.D.

Abstract

The widespread exposure of humans to Bisphenol A (BPA) and its potential clinical consequences have recently attracted considerable attention from scientists, government advisors, and the popular press. BPA is an ubiquitous xenoestrogen used in the production of plastic and metal containers for food and beverages that can leach into the contents during processing and storage. The tolerably daily intake (TDI) of BPA has been set to 50 µg/kg bw/day in Europe and the United States. This guidance value was derived from a lowest-observable-adverse-effect-level (LOAEL) for BPA of 50 mg/kg/day identified in the 1980s. Since then, data from numerous studies have reported significant adverse effects of exposure to doses of BPA below the calculated safe levels, leading scientists and other experts to question the adequacy of the TDI-value.

BPA has been shown to exert endocrine-disrupting effects on reproduction, development, metabolism, and cancer in humans and other species. However, the mechanisms underlying these effects remain unclear. This dissertation presents a set of experiments conducted to investigate the molecular mechanisms underlying BPA action on prostate and prefrontal cortex (PFC) of rats.

This thesis starts with the evaluation of short-term adult exposure to BPA on 5 α -Reductase (5 α -R) isozymes and aromatase expression in the prostate gland of rats, key enzymes in the biosynthesis of 5 α -dihydrotestosterone (DHT) and estradiol (E2) (important hormones for prostate physiopathology). Quantitative RT-PCR, western blot and immunohistochemical analyses showed lower mRNA and protein levels of 5 α -R1 and 5 α -R2 in BPA-treated groups versus controls but higher mRNA levels of 5 α -R3, recently proposed as a biomarker of malignancy. BPA-treated rats also evidenced an increase in aromatase expression as well as in plasma E2/testosterone (T) ratio, both associated with prostate diseases (*Study 1*). The decrease of 5 α -R1 and 5 α -R2 transcription in the prostate gland by BPA was demonstrated to be independent of circulating T levels (*Study 2*). This hypothesis was tested because: (i) within the prostate T exerts a positive regulatory action on 5 α -R expression, and (ii) BPA has shown to decrease circulating T through different mechanisms.

The thesis continues with the evaluation of the molecular mechanisms of the BPA action on the PFC of male and female rats exposed during adulthood or the perinatal period. We hypothesize that some of the brain and behavior abnormalities described in experimental animals and humans exposed to BPA might be mediated, at least in part, by alterations in the PFC, since it is an important brain area for cognitive control and complex behaviors, and appears to be altered in many psychopathologies. PFC functions are modulated by different neurotransmitters systems, such as γ -aminobutyric acid (GABA), serotonin (5-HT) and dopamine (DA) systems, therefore, alterations in the expression of genes related with these neurotransmitters might interfere with PFC physiopathology. These effects were investigated using qRT-PCR, western blot and PCR-array technologies.

Study 3 details the effects of short-term exposure of adult rats to BPA (50 μ g/kg/day, 4 days) on 5 α -R and aromatase, enzymes that synthesize GABA_A receptor modulators, and tryptophan hydroxylase (Tph), the rate-limiting enzyme in 5-HT biosynthesis. To gain better understanding of BPA action in the

adult PFC, 84 genes involved in different mechanisms of neurotoxicity were also analyzed. *Study 4* describes the effects of perinatal exposure (from gestational day 12, GD12, to postnatal day 21, PND21) to BPA (10 µg/kg/day) on DA and 5-HT systems-related genes in juvenile and adult male rats.

Finally, this thesis also extends and improves scientific knowledge about toxic effects of Bisphenol F (BPF) and Bisphenol S (BPS), current BPA alternatives in many consumer products. Thus, in our last study we aimed to determine whether BPA, BPF or BPS affect precortical 5 α -R expression, as well as DA and 5-HT systems-related genes in juvenile female rats perinatally (GD12-PND21) exposed to them (*Study 5*).

Our findings demonstrate that exposure to BPA results in precortical gene expression profile alterations in both juvenile and adult periods. Adult exposure to BPA modified the transcription of genes related to PFC functions, such as synaptic plasticity and memory processes, in addition to 5 α -R expression in female rats. Male rats exposed perinatally to BPA showed short- and long-term consequences in the transcription of genes linked with DA and 5-HT systems. Besides its effects on DA and 5-HT-related genes, perinatal exposure to BPA also altered 5 α -R expression in juvenile female rats. Both BPF and BPS decreased 5 α -R3 mRNA levels and showed different expression pattern in genes linked with DA and 5-HT systems, indicating that they have different mechanisms of action, and probably, different effects in the developing brain.

These results may offer new insights into the role of BPA in the development of prostate and mental diseases associated with developmental exposure to BPA, but also raise the question about the safety of short-term exposure to it in the adulthood. On the other hand, our last study provides *in vivo* evidence of the potential neurotoxicity of BPF and BPS and raises the question about their safety as BPA substitutes.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1. Marco teórico y antecedentes

1.1. Introducción a los disruptores endocrinos

"La osadía de creernos capaces de manipular impunemente la vida y la naturaleza nos ha llevado a activar una guerra silenciosa cuyas consecuencias no somos capaces de imaginar y mucho menos de prever"

Primavera Silenciosa; R. Carson, 1962

El extracto citado pertenece a una de las obras literarias de divulgación científica más influyentes de todos los tiempos (Discover Magazine, 2006). Tras su publicación en 1962, y no exenta de una gran polémica, *"Primavera Silenciosa"* supuso un aporte importante para la difusión de la concienciación ambiental entre la ciudadanía. En él su autora, la bióloga marina y zoóloga estadounidense Rachel Carson, denuncia los efectos nocivos del empleo masivo de productos químicos (especialmente pesticidas) en la naturaleza (Carson, 1962).

Tres décadas más tarde, en Julio de 1991, 21 científicos de diferentes disciplinas se reunieron en una conferencia organizada por la Dra. Theo Colborn, de la fundación *"World Wildlife"*, en Wingspread (Wisconsin, EE.UU). El objetivo fue abordar, en base a las evidencias científicas de la época, la preocupación anteriormente manifestada por Carson:

"Un gran número de sustancias químicas artificiales que se han liberado al medio ambiente, así como algunas naturales, tienen el potencial de alterar el sistema endocrino de los animales, incluyendo los seres humanos [...];"

muchas poblaciones de animales silvestres ya están afectadas por estos compuestos.”

A este tipo de sustancias químicas se les acuñó el término de disruptores endocrinos (EDCs, de su abreviatura en inglés, *Endocrine Disrupting Chemicals*). Las conclusiones alcanzadas en dicha conferencia fueron redactadas en el informe “*Alteraciones inducidas por químicos en el desarrollo sexual*”, conocido como la Declaración de Wingspread (Colborn y Clement, 1992). La idea de que algunos productos químicos estuviesen afectando la salud humana y animal, vía disrupción del sistema hormonal, fue extensamente difundida entre los medios de comunicación con la publicación del libro “*Nuestro futuro robado*”, escrito por Colborn y cols. (1996).

El término *disruptor endocrino* engloba en la actualidad a un grupo de sustancias exógenas al organismo, naturales o sintéticas, que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo (COM, 1999). En España, este nombre fue aceptado por consenso en 1996, en la primera “Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos” celebrada en Granada. Unas 550 sustancias constituyen la lista de sustancias objeto de evaluación de la estrategia comunitaria europea sobre EDCs (COM, 2001). De ellas, aproximadamente 60 sustancias ya han sido consideradas como EDCs, entre ellas: plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados (PCBs) y polibromados (PBBs, usados en textil y plásticos), perfluorados (por ejemplo, PFOS y PFOA, utilizados en el recubrimiento de sartenes y utensilios de cocina), alquilfenoles (presentes en detergentes y plásticos), ftalatos (ablandadores de plástico en chupetes y mordedores) y bisfenol A y sus derivados.

En humanos y animales silvestres, la exposición a EDCs ha sido asociada con una amplia variedad de condiciones patológicas. A título ilustrativo, indicar

que la exposición a EDCs durante momentos críticos del desarrollo ha sido sugerida como la causa subyacente a la creciente incidencia de infertilidad, anomalías del tracto genitourinario y de algunos tipos de cáncer, observada en Europa y EE.UU en los últimos 50 años (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Skakkebaek et al. 1998). Todo ello, aunado a la extensa utilización de estos compuestos químicos en la vida cotidiana, ha despertado una preocupación razonable entre la comunidad científica y una parte considerable del resto de la sociedad.

1.2. El origen del Bisfenol A y su polémica

El Bisfenol A (BPA) [4,4'-(propano-2,2-diil)difenol] fue descubierto por primera vez en 1891 por el químico ruso Aleksandr P. Dianin (Rubin and Soto, 2009). No obstante, la primera síntesis documentada de BPA data de 1905 y fue realizada por el alemán Thomas Zincke, de la Universidad de Marburg (Alemania) (Zincke, 1905). Zincke reveló además propiedades físicas clave de este compuesto químico.

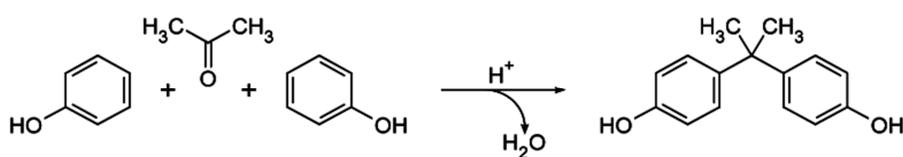


Figura 1.1: Reacción de síntesis del Bisfenol A (BPA). BPA ($C_{15}H_{16}O_2$) es un compuesto químico orgánico sintetizado por condensación de 2 moles de fenol con 1 mol de acetona (*de ahí el sufijo “A”*) en presencia de un catalizador ácido.

A mediados de los años 30, el investigador británico Edward Charles Dodds descubrió las propiedades estrogénicas del BPA (Dodds y Lawson, 1936), aunque su uso como estrógeno sintético no prosiguió. En los años siguientes,

Dodds y cols. (1938) sintetizaría el dietilestilbestrol (DES), con el que comparte homología estructural (Figura 1.2). Más de 30 años después de su utilización en clínica, el DES sería prohibido por su posibilidad de provocar cáncer vaginal y cervical (Hutt, 1982).

En 1936, el suizo Pierre Castan y el estadounidense S.O. Greenlee sintetizaron por primera vez resinas epoxi basadas en BPA, cuya comercialización comenzó en los años 50 (Bilyeu et al. 2005).

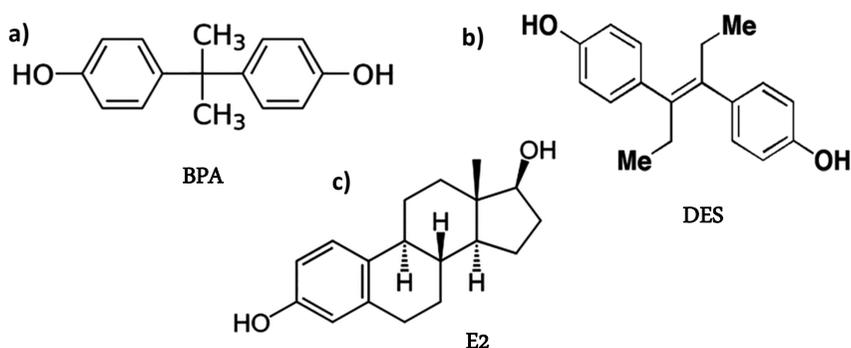


Figura 1.2: Estructuras moleculares de (a) Bisfenol A (BPA), (b) Dietilestilbestrol (DES), (c) Estradiol (E2).

En 1953, Hermann Schenell de Bayer (Alemania) y Dan Fox de General Eléctrica (EE.UU) desarrollaron, de forma independiente, pero utilizando BPA, un nuevo material plástico, el policarbonato (PC) (Clagett y Shafer, 1985). Debido a las propiedades que este nuevo plástico ofrecía (claridad óptica, resistencia a la rotura y al calor), su relación coste-efectividad y relativa facilidad de fabricación, su uso fue rápidamente extendido en todo el mundo. Así, mientras que en 1964 la producción mundial de BPA fue de 42 toneladas (Dermer, 1977), en 2005 ésta alcanzó los 3 200 000 toneladas (EPA, 2005). En la actualidad BPA es uno de los compuestos químicos de mayor producción mundial. En Europa, cuatro compañías producen un total de 700 000 toneladas

al año en seis factorías, una de ellas situada en España (Cartagena, Murcia) (EC, 2003).

Los policarbonatos se utilizaron inicialmente para aplicaciones eléctricas y electrónicas. El uso de este material para el envasado de alimentos recibió su aprobación inicial en la década de los 60 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (*Food and Drug Administration*, FDA), siendo ahora común hallarlos en botellas y otros envases de plástico (por ejemplo, fiambreras). Mientras que las resinas epoxi basadas en BPA encontraron su mercado en el revestimiento protector de latas de alimentos y bebidas con el fin de prevenir en ellas efectos de oxidación y corrosión, en tapones de botellas, dispositivos médicos, tintas de impresión y selladores de dientes, entre otras aplicaciones. BPA se encuentra además en el papel térmico y es usado como aditivo en otros plásticos (*véase para más detalle* EFSA, 2013).

En 1993, Krishnan y cols. de la Universidad de Stanford, constataron que los frascos de cultivo contruidos con PC cuando eran esterilizados en autoclave liberaban BPA, actuando éste como un estrógeno (Krishnan et al., 1993). Se plantea entonces el problema de la migración de BPA desde recipientes que lo contienen. Pocos años después se publicarían los primeros estudios sobre los efectos adversos de la exposición a BPA en animales de experimentación.

13. Exposición en humanos

El ser humano está expuesto de manera continua al BPA, exposición que se ha visto incrementada en los últimos años debido al aumento de los productos basados en resinas epoxi y PC. Los datos obtenidos por la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES, por sus siglas en inglés, *National Health and Nutrition Examination Survey*) que realiza periódicamente los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control*

and Prevention, CDCs) de los EE.UU, mostraron que el BPA estuvo presente en más del 90 % de las 2500 muestras de orina analizadas (Calafat et al. 2008). Los mayores niveles fueron hallados en los sujetos de menor edad incluidos en el estudio (6-11 años, 4,5 µg BPA total/L), seguido de los adolescentes (12-19 años, 3,0 µg/L) y por último la población adulta (2,5 µg/L). Igualmente, datos obtenidos en muestras de orina procedentes de diferentes países reflejan la gran magnitud de la exposición a este EDC (Becker et al., 2009; Bushnik et al., 2010; Kim et al., 2011; Pirard et al., 2012).

Resulta interesante que BPA haya sido detectado en tejido placentario, cordón umbilical, líquido amniótico y orina de recién nacidos (Calafat et al., 2009; Gerona et al., 2013; Schönfelder et al., 2002; Yamada et al., 2002), lo que indica que es capaz de cruzar la barrera placentaria. De hecho, diversos estudios han puesto en evidencia que las concentraciones *in útero* pueden alcanzar rangos incluso superiores a los descritos en adultos (Ikezuki et al., 2002; Schönfelder et al., 2002).

BPA ha sido también detectado en otros fluidos y tejidos humanos, no obstante, existen diferencias en los niveles reportados entre los diferentes estudios disponibles, siendo hoy en día uno de los puntos en debate en relación al BPA.

La exposición de los consumidores a través de los alimentos puede producirse por migración del BPA desde envases que están en contacto con ellos, proceso que se ve favorecido por el incremento de la temperatura (p.e. durante la esterilización), del uso y desgaste del recipiente, y de la utilización de detergentes fuertes (Cao and Corriveau, 2008; Kang et al., 2003; Kubwabo et al., 2009). Se ha observado además que las soluciones de cloruro sódico y el aceite vegetal utilizados en las latas de comida favorecen la liberación de BPA (López-Cervantes and Paseiro-Losada, 2003). En la Tabla 1.1 se muestra la ingesta diaria estimada de BPA por poblaciones según el informe del Panel de Expertos del

Programa de Toxicología Nacional (*National Toxicology Program*, NTP) de EE.UU (Shelby, 2008). En la Figura 1.3 se indican los tipos de plásticos que pueden liberar BPA.

Población	Ingesta diaria de BPA ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$)	
	0-6 meses	Alimentados con fórmulas
	Alimentados con pecho	0.2-1
6-12 meses		1.65-13
1.5-6 años		0.043-14.7
Adultos	Población general	0.008-1.5
	Ocupacional	0.043-100

Tabla 1.1: Ingesta diaria estimada de BPA por poblaciones.
(*NTP-CERHR Monograph, 2008*)



Figura 1.3: Tipos de plásticos que pueden liberar BPA. Los plásticos se clasifican empleando un sistema de codificación internacional, basado en la asignación de un número colocado dentro del símbolo internacional de reciclado. Algunos plásticos tipo 3 (*PVC*, policloruro de vinilo) y tipo 7 (*O*, “*otros*”, incluyéndose en este grupo el policarbonato, *PC*) pueden liberar BPA. Estos símbolos, números y/o letras pueden ser observados en el envase de plástico correspondiente.

Si bien es un hecho ya conocido que el BPA puede migrar desde envases alimentarios construidos con *PC* (p.e. botellas y biberones de plástico, recipientes reutilizables de alimentos para microondas, envases de fórmulas y alimentos infantiles) y los revestimientos internos de las latas de conserva, se sugiere también que los papeles en contacto con alimentos y envases de cartón fabricados con papel reciclado podrían constituir otra fuente potencial de exposición, al estar contaminados con BPA (López-Espinosa et al., 2007; Ozaki et al., 2004).

Esto es debido a que el BPA es utilizado en la producción de tintas de impresión y, por esta vía, podría formar parte del papel reciclado. Por otra parte, se ha observado una migración de BPA desde las tuberías de PVC al agua que conducen (Yamamoto and Yasuhara, 1999).

Pese a que la principal vía de exposición es la oral, existen sin embargo, otras rutas de exposición alternativas. Así, BPA puede entrar en el organismo por vía inhalatoria, a través de su liberación a la atmósfera en los procesos de fabricación. No obstante, la posibilidad de inhalar altos niveles de esta molécula desde el aire es muy baja, aunque este riesgo podría verse incrementado a nivel ocupacional. En esta línea, se han descrito niveles mayores de BPA en los individuos expuestos de manera ocupacional (Poole et al., 2004). Otra fuente de exposición que recientemente está cobrando un especial interés es por contacto con papel térmico (Hormann et al., 2014; Porras et al., 2014), ampliamente utilizado para emitir recibos de compra. A todas ellas hay que sumarle la exposición a través de productos dentales fabricados con resinas exposi que contienen BPA, tal y como describieron por primera vez Olea y cols. (1996). Además, otra vía potencial de exposición para el recién nacido sería la leche materna. De hecho, la presencia de BPA en la leche materna de mujeres sanas ha sido confirmada en diversos estudios (Mendonca et al., 2014; Ye et al., 2006).

A pesar de todo ello, pocos son los estudios que han evaluado la exposición simultánea a BPA desde diferentes fuentes. El más reciente ha sido llevado a cabo por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA). Los resultados se muestran en la Tabla 1.2.

	Polvo ingestión	Juguetes ingestión	Dieta ingestión	Aire inhalación	Papel térmico dérmica	Cosméticos dérmica
1-5 días (pecho)	0,0	0,1	98,8	1,1	0,0	0,0
6 d-3 meses (pecho)	1,8	0,2	94,3	1,7	0,0	2,0
4-6 meses (pecho)	2,1	0,3	93,5	1,9	0,0	2,3
0-6 meses (fórmulas)	6,9	0,9	78,5	6,3	0,0	7,5
6-12 meses	0,7	0,1	97,9	0,6	0,0	0,7
1-3 años	0,3	0,0	98,9	0,4	0,0	0,4
3-10 años	0,4	0,0	92,4	0,2	6,6	0,4
10-18 años	0,1	0,0	83,7	0,6	14,8	0,8
18-45 años (mujeres)	0,1	0,0	87,0	0,5	11,7	0,8
18-45 años (hombres)	0,1	0,0	86,5	0,5	12,1	0,8
45-65 años	0,1	0,0	86,4	0,5	12,2	0,8
≥ 65 años	0,1	0,0	85,5	0,5	13,0	0,9

Tabla 1.2: Principales fuentes de exposición a BPA en la población general. Los resultados se muestran como %. En negrita se señala la población más expuesta a una determinada vía de exposición. Se diferencian entre los recién nacidos alimentados con leche materna de la madre (pecho) de los alimentados con fórmulas (EFSA, 2013).

14. Toxicocinética

Tras la exposición oral, el metabolismo del BPA en mamíferos ocurre principalmente por dos vías: glucuronidación y sulfatación, ambas conducen a metabolitos conjugados con actividad estrogénica limitada o nula (Shimizu et al., 2002; Yokota et al., 1999). En el hígado de rata se ha visto que la glucuronidación es mediada por una isoforma de la uridinadifosfato glucuroniltransferasa (*UDP-glucuronosyltransferase*, UGT), UGT2B1 (Yokota et al., 1999). Mientras que la reacción de sulfatación es realizada por las sulfotransferasas, entre ellas SULT1A1 (Nishiyama et al., 2002; Suiko et al., 2000) y ST1A3 (Shimizu et al., 2002). Debe indicarse que algunos autores proponen

rutas de metabolización hepática alternativas. Tal es el caso de Yoshihara y cols. (2004), quienes describieron una vía a través de la cual se produce un metabolito con mayor actividad estrogénica, el 4-metil-2,4-bis (p-hidroxifenil) pent-1-eno (MBP). Por otra parte, se desconoce si los metabolitos podrían ser desconjugados localmente en tejidos, liberando BPA activo biológicamente. Al respecto, se ha sugerido que las bacterias intestinales podrían producir glucuronidasas capaces de llevar a cabo esta función (Inoue et al., 2003), de este modo, el BPA libre podría ser reabsorbido.

A continuación de estas reacciones de detoxificación, en roedores los metabolitos resultantes son excretados principalmente en la bilis (Kurebayashi et al., 2003). Sin embargo, también puede producirse su paso a la circulación sanguínea a través de la vena hepática. Cabe considerar, por otra parte, que el BPA se une a proteínas plasmáticas (Teegarden et al., 2005), hecho que podría repercutir en su toxicocinética. No obstante, presenta una limitada unión a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG, por sus siglas en inglés) (Dechaud et al., 1999) y no existen evidencias de que el BPA desplace de los sitios de unión a otras hormonas previamente unidas (Heringa et al., 2004).

Debe señalarse que en roedores la principal vía de excreción del BPA es la fecal, debido a la circulación enterohepática, mientras que en primates, incluido el hombre, no ocurre esta circulación, tomando relevancia en este caso la excreción renal. Por ello, durante años se ha considerado que el BPA no es un agente químico persistente, eliminándose rápidamente en orina tras su ingesta y metabolización hepática (Volkel et al., 2002, 2005). Ahora bien, los resultados obtenidos con sujetos reclutados en ayuno en el estudio NHANES, en los que el tiempo de ayuno se asociaba mínimamente con los niveles de BPA hallados, abrieron la posibilidad de que el BPA podría ser almacenado en ciertos compartimentos corporales. Considerándose que el BPA presenta ciertas características lipofílicas, esta acumulación podría tener lugar en tejidos con mayor contenido lipídico. En esta línea, Nunez y cols. (2001), investigando la

distribución de BPA en diferentes tejidos de animal tras la exposición a dosis repetidas, demostraron una acumulación mayor de este compuesto en el tejido adiposo marrón, implicado en la termogénesis inducida por la dieta y el balance energético.

15. Efectos generales

El sistema endocrino regula una gran variedad de procesos del desarrollo, metabólicos y reproductivos. Por tanto, la exposición a BPA podría afectar a múltiples funciones en el organismo. Es importante considerar que muchos de los efectos adversos hallados en animales de experimentación expuestos a BPA han sido obtenidos utilizando dosis menores que el LOAEL¹ establecido para este químico de 0,05 mg/kg/d (“*efectos a bajas dosis*”).

Se ha demostrado que el BPA interfiere con el funcionamiento y/o desarrollo normal del sistema nervioso central (SNC) (*véase apartado Justificación*) y del tracto reproductivo. Entre los desórdenes reproductivos asociados a la exposición a BPA, se encuentra una disminución de la calidad espermática (concentración, recuento, vitalidad y motilidad de los espermatozoides) (Li et al., 2011a; Toyama et al., 2004) e incremento del riesgo de disfunción sexual masculina en trabajadores expuestos a BPA (Li et al., 2010a,b). Mientras que en el género opuesto se han descrito anomalías meióticas en ovocitos fetales (Can et al., 2005), así como inicio temprano de la maduración sexual (Howdeshell et al., 1999). Además, en mujeres los niveles sanguíneos de BPA han sido asociados a una variedad de condiciones patológicas, incluyendo hiperplasia de endometrio (Hiroi et al., 2004), abortos involuntarios recurrentes

¹ **Nivel mínimo de efecto adverso observable (LOAEL, en inglés):** La menor concentración o cantidad de una sustancia que, según la observación o experimentación, causa cualquier modificación indeseable en un organismo distinguible de un organismo idéntico control. (*Glosario de términos usados en toxicología. Recomendaciones de la IUPAC-1993. AET-1995*)

(Sugiura-Ogassawara et al., 2005) y síndrome de ovario poliquístico (Takeuchi et al., 2004). Se han identificado asimismo alteraciones en la glándula prostática y mamaria de animales de experimentación expuestos a BPA que podrían predisponer a lesiones neoplásicas (Durando et al., 2007; Murray et al., 2007; Prins et al., 2008).

Recientemente los desórdenes metabólicos asociados a la exposición a BPA han cobrado un especial interés. A este respecto, la exposición a BPA ha sido relacionada positivamente con obesidad, vía aumento de la adipogénesis y diferenciación de adipocitos, entre otros mecanismos (Boucher et al., 2014; Ohlstein et al., 2014; Somm et al., 2009). Se ha relacionado también con Diabetes Mellitus de tipo 2, concentraciones anormales de las enzimas hepáticas gamma glutamil transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (indicadoras de toxicidad hepática), así como con enfermedad cardiovascular (Alonso-Magdalena et al., 2011; Lang et al., 2008). Además, diversos estudios han puesto de manifiesto que el BPA es capaz de afectar al metabolismo de la glucosa a través de diversos mecanismos, incluyendo disfunción de las células beta-pancreáticas y resistencia a insulina (Alonso-Magdalena et al., 2006).

Existe también evidencia de que el BPA puede afectar la función inmune, modulando la producción de citoquinas procedentes de los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) 1 y 2 y alterando la producción de anticuerpos, entre otros mecanismos (*para mayor información véase* Rogers et al., 2013). Además, se han descrito casos de dermatitis fotosensible ocupacional y alergias tras el contacto con diversos productos que contienen BPA (Kristiina et al., 2003; Riitta et al., 1995).

16. Mecanismos de acción propuestos

- *Disrupción Endocrina.* Los EDCs, entre ellos el BPA, comprenden mecanismos de toxicidad que pueden ir desde la alteración en la síntesis y secreción de hormonas, vía modificaciones en la expresión génica y/o actividad de enzimas metabolizadoras, hasta la propia interferencia con la unión a sus receptores celulares.

Actividad mediada por receptores hormonales

Durante años, el BPA ha sido considerado un estrógeno débil debido a que su afinidad por los receptores de estrógenos (RE) α y β nucleares es aproximadamente 10 000 a 100 000 veces más baja que la del estradiol (E2) (“*acciones genómicas*”) (Gould et al., 1998; Kuiper et al., 1998; Pennie et al., 1998). No obstante, se ha demostrado que el BPA se une con gran afinidad al receptor gamma asociado con estrógenos (ERR- γ) (Okada et al., 2008). Aunque el ligando endógeno no se conoce, ERR- γ se comporta como un activador constitutivo de la transcripción y se cree que podría jugar un papel en la diferenciación y maduración del cerebro fetal (Hermans-Borgmeyer et al., 2000).

El BPA desencadena además respuestas muy rápidas y que ocurren a dosis bajas de exposición, atribuidas a su unión a los RE de membrana y al receptor acoplado a proteína G 30 (GPR30) (“*acciones no genómicas*”) (Thomas and Dong, 2006). Cabe señalar que BPA es considerado un xenoestrógeno pero no un mimético de estrógenos (Gould et al., 1998), ya que puede actuar también como un antiestrógeno, bloqueando la respuesta estrogénica por competición con E2 endógeno (Bonfeld-Jorgensen et al., 2007).

Diferentes estudios han demostrado que el BPA puede actuar como un antagonista del receptor de andrógenos (RA) (Lee et al., 2003; Xu et al., 2005), esencial para la función reproductiva masculina. Sin embargo, se ha observado

que el BPA actúa como un agonista para una forma mutante del RA encontrado en algunas células de cáncer de próstata (Wetherill et al., 2002).

Por otro lado, Moriyama y cols. (2002) demostraron que BPA inhibe la transcripción mediada por el receptor de la hormona tiroidea, actuando como un antagonista. Resultados obtenidos por Zoeller y cols. (2005) en el cerebro de rata indicaron que BPA podría actuar como un antagonista de la hormona tiroidea en el receptor β , siendo menos efectivo antagonizando el receptor α .

Asimismo, se ha descrito que el BPA puede aumentar la expresión del receptor aril hidrocarbonado (Ahr) (Nishizawa et al., 2005). El Ahr es un factor de transcripción que, a través de la formación de un heterodímero con el translocador nuclear Ahr (Arnt), regula el citocromo P450, el metabolismo de xenobióticos y la supresión inmunológica. La expresión tanto del Arnt como del represor Ahr (Ahrr) también es incrementada por el BPA (Nishizawa et al., 2005).

Otros mecanismos de disrupción endocrina

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el BPA interfiere con la expresión y/o actividad de enzimas implicadas en la esteroidogénesis en diversos tejidos. Por ejemplo, BPA disminuye la actividad de la testosterona 6 β -hidroxilasa (T6BH) y de la testosterona 2 α -hidroxilasa (T2AH) (isoformas del citocromo P450), así como los niveles proteicos de CYP2C11/6 y CYP3A2/1 en el hígado de rata (Hanioka et al., 1998). Igualmente, BPA modula la actividad y/o expresión de aromatasa (Huang et al., 2009; Kim et al., 2010; Kwintkiewicz et al., 2010), enzima que cataliza la conversión irreversible de andrógenos a estrógenos.

- *Daños Genéticos*: Causados por la interacción directa con el material genético. Estudios *in vitro* han demostrado que el BPA puede producir aberraciones cromosómicas (aneuploidía) (Hunt et al., 2003; Tsutsui et al., 1998), así como

daño en el ADN, a través de la formación de aductos de ADN y mutagenicidad (Takahashi et al., 2001; Tsutsui et al., 1998). No obstante, aún no está claro si puede ser considerado como agente mutagénico.

- *Efectos Epigenéticos.* Se tratan de cambios heredables en la expresión genética sin alteraciones en la secuencia de ADN, vía a) metilación del ADN, b) modificaciones en histonas, c) expresión de ARNs no codificantes. Un cierto número de estudios han puesto de manifiesto que la exposición a BPA durante el desarrollo puede resultar en alteraciones de los patrones de metilación del ADN (Dolinoy et al., 2007; Doshi et al., 2012; Mileva et al., 2014), incluso llegando a afectar la impronta genética o “*imprinting*”, tal y como ha demostrado recientemente Susiarjo y cols (2013). También se han descrito modificaciones en histonas tras la exposición a BPA (Zhu et al., 2009), así como alteraciones en la expresión de microRNAs en ovario fetal de oveja (Nagel and Bromfield, 2013) y células placentarias humanas (Avisar-Whiting et al., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que BPA altera la expresión génica de factores reguladores epigenéticos, como ADN metiltransferasas y la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2), en células hipotalámicas embrionarias (Warita et al., 2013).
- *Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.* Algunos de los efectos adversos asociados a la exposición a BPA han sido relacionados con procesos de estrés oxidativo, vía afectación de la función mitocondrial (Moon et al., 2012; Ooe et al., 2005), modulando enzimas antioxidantes e incrementando sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Kabuto et al., 2004).
- *Efectos sobre la expresión génica.* La lista de genes cuya expresión génica es modificada por el BPA ha ido creciendo enormemente en los últimos años. Muchos de estos efectos pueden ser derivados de los mecanismos descritos anteriormente. A título ilustrativo, el número de genes modificados por el BPA que consta en la base de datos *Comparative Toxicogenomics Database* es más de 6800 (<http://ctdbase.org/>; consultado el 2 de Octubre de 2014).

17. Marco legal

El BPA ha sido objeto de extensas evaluaciones por las agencias sanitarias de diferentes países. La controversia engendrada años anteriores sobre el uso del BPA como componente del material en contacto con los alimentos continúa vigente e, incluso, se ha visto enormemente incrementada en los últimos años. La problemática surge a consecuencia de la naturaleza de esta sustancia, un xenobiótico ampliamente utilizado capaz de interactuar con los sistemas hormonales del cuerpo humano.

En Europa, el BPA fue por primera vez evaluado para su utilización en materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios en 1986 por el Comité Científico de la Comisión Europea sobre la Alimentación Humana (*Scientific Committee for Food, SCF*) (SCF, 1986). Dicho comité estableció una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 0,05 mg/kg de peso corporal, basado en la aplicación de un factor de incertidumbre de 500 al nivel sin efecto adverso observable (*no observed adverse effect level, NOAEL*)² de 25 mg/kg/d, identificado en estudios con roedores para el efecto sobre el peso corporal. No obstante, la IDT establecida sufriría modificaciones en años posteriores en base a la literatura científica existente. Así, la IDT fue fijada en 0,01 mg/kg/d en 2002 (SCF, 2002), debido a un NOAEL de 5 mg/kg/d hallado en un estudio de reproducción de tres generaciones en rata y aplicando un factor de incertidumbre de 500 (10 por diferencias interespecies x 10 por diferencias interindividuales x 5 por incertidumbres en la base de datos sobre la toxicidad reproductiva y del desarrollo). En dicho estudio la dosis más baja a la que se observaron efectos adversos en el peso corporal y de órganos fue de 50 mg/kg/d.

² **Nivel sin efecto adverso observable (NOAEL, en inglés):** La máxima concentración o nivel de una sustancia, hallada experimentalmente o por observación, que no causa alteraciones adversas detectables en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los organismos diana, bajo condiciones definidas de exposición. (*Glosario de términos usados en toxicología. Recomendaciones de la IUPAC-1993. AET-1995*)

En 2006, el factor de seguridad aplicado pasó a ser de 100, considerando que no era necesario el factor de incertidumbre adicional de 5, derivando así en la IDT inicial de 0.05 mg/kg/d (AFC, 2006).

En 2006, más de 30 expertos en el campo del BPA, tras revisar cientos de estudios científicos publicados sobre los efectos del mismo, emitieron el informe de consenso “*Chapel Hill*” (vom Saal et al., 2007). En él manifestaron, entre otras cosas, que:

- a) El BPA, a las concentraciones encontradas en el cuerpo humano, se asocia a alteraciones en la próstata, testículo, glándula mamaria, peso corporal, estructura y química del cerebro, así como en la conducta de animales de experimentación.
- b) Aunque el BPA no es persistente en el ambiente o en humanos, su exposición es continua. Los estudios utilizados para estimar la exposición diaria humana a BPA están basados en estudios de exposiciones agudas en animales de experimentación y no en modelos animales expuestos de forma continua a bajos niveles.
- c) Medidas de los niveles del BPA en el suero y otros fluidos corporales sugiere la posibilidad de que la ingesta de BPA sea mucho mayor que la estimada y/o que el BPA pueda acumularse en el organismo en algunas condiciones (p.e. durante el embarazo).

En 2008, el Centro de Evaluación de Riesgos para la Reproducción Humana (CERHR, sus siglas en inglés), dentro del NTP de EE.UU (que forma parte de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU, NIH), elaboró una escala de 5 niveles de preocupación sobre la probabilidad de que aparezca un determinado efecto adverso derivado de la exposición humana a BPA. Dicha escala se ilustra en la Figura 1.4.

En el año 2010, un grupo de expertos auspiciados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) concluyeron que no había datos para lograr con claridad el establecimiento de un nivel “seguro” de exposición al BPA.

A medida que la información científica sobre los efectos adversos del BPA en la salud iba aumentando considerablemente, la EFSA ha ido actualizando su asesoramiento científico en materia de BPA. En todas estas ocasiones, los expertos de la EFSA concluyeron que no podían identificar ninguna evidencia nueva para modificar la actual IDT anteriormente fijada.

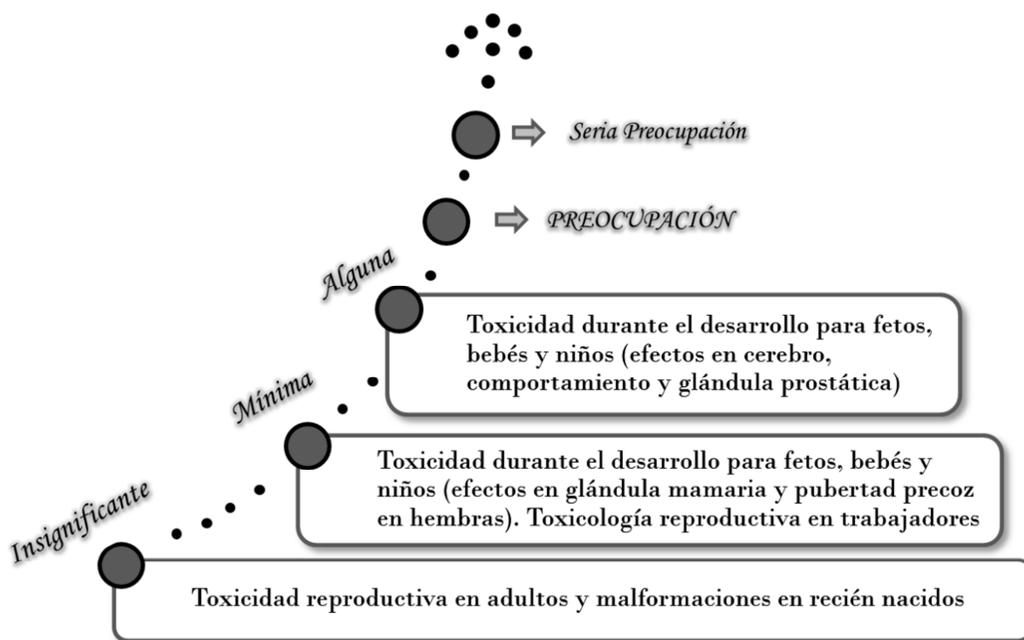


Figura 1.4: Niveles de preocupación del NTP respecto a la posibilidad de que el desarrollo o la reproducción humana puedan ser afectados negativamente por la exposición a BPA. El NTP usa una escala de cinco niveles de preocupación.

En el 2011, con el objetivo de reducir la exposición de los lactantes al BPA y, aplicando el principio de precaución (reglamento 178/2002, art.7), la Comisión Europea aprobó la Directiva 2011/8/UE que estableció la prohibición de la fabricación, comercialización e importación de biberones de PC. España adoptó esta medida en la Orden PRE/628/2011. En octubre de ese año, la Comisión Europea pidió a la EFSA que revisase los dos informes que había hecho públicos la Agencia francesa para la Seguridad Alimentaria (ANSES, por sus siglas en francés) sobre la evaluación de los riesgos del BPA. Poco menos de dos meses después la EFSA expuso que no modificaba su opinión manifestada en 2010.

Por su parte, Francia aprobó definitivamente, a finales de 2012, una Ley por la cual *se prohíbe la producción, importación, exportación y comercialización de materiales que contengan BPA y estén en contacto con alimentos*. Los plazos establecidos fueron: a partir de enero de 2013 para cualquier producto alimentario destinado a niños de 0 a 3 años y, a partir de enero de 2015, para todos los demás productos destinados a cualquier sector de población.

Mientras tanto, el Panel de materiales en contacto con alimentos, enzimas, saborizantes y coadyuvantes tecnológicos (CEF) de la EFSA, decidió llevar a cabo una reevaluación extensa de los riesgos de la exposición humana a BPA en dos etapas. En julio de 2013 se presentó la primera parte del informe del CEF, relativa a la evaluación de la exposición a BPA de la población europea a través de diferentes fuentes y por distintas vías de exposición. En él se confirmó que la dieta constituía la principal fuente de exposición, siendo las estimaciones de exposición halladas más bajas que las reportadas previamente por la EFSA en 2006. La segunda parte del proyecto, centrada en evaluar los riesgos potenciales para la salud humana del BPA, ha sido publicada en el año 2014. La EFSA identificó que la exposición a BPA podría estar ligada con efectos adversos en hígado, riñón y glándula mamaria. En base a ellos, la EFSA ha reconsiderado la IDT establecida, reduciéndola de forma provisional a 0,005 mg/kg/d a la espera de los resultados del estudio que está realizando actualmente el NTP de EE.UU.

(Para más información consúltese la página web de la EFSA: www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.htm, último acceso 4 de noviembre de 2014).

Entre las actuaciones llevadas a cabo en otros países destaca las del Gobierno de Canadá, siendo el primer país que prohibió el uso del BPA en las botellas de los biberones infantiles. Además, incluyó el BPA en la lista de sustancias consideradas potencialmente perjudiciales para la salud o el medio ambiente (SOR/2010-194 23/09/10). Por su parte, la Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency*, EPA) de EE.UU ha venido considerando como segura desde finales de los 80 una exposición de 50 µg/kg/d [*Integrated Risk Information System (IRIS)*, 1988]. No obstante, en la actualidad varios estados integrantes han adoptado medidas de prohibición del BPA en recipientes que puedan contener alimento infantil.

RESUMEN CRONOLÓGICO

1891	<ul style="list-style-type: none"> • Dianin sintetiza por primera vez BPA
1905	<ul style="list-style-type: none"> • Primera mención al BPA en una publicación científica por Zincke
1930s	<ul style="list-style-type: none"> • Dodds identifica al BPA como un estrógeno artificial • Castan y Greenlee sintetizan resinas epoxi basadas en BPA
1953	<ul style="list-style-type: none"> • Shenell (Bayer) y Fox (General eléctrica) desarrollan PC usando BPA
1960s	<ul style="list-style-type: none"> • La FDA aprueba el uso de BPA en envases alimentarios
1986	<ul style="list-style-type: none"> • Europa aprueba el uso de BPA en envases alimentarios
1988	<ul style="list-style-type: none"> • La EPA establece como dosis de referencia oral 0.05 mg BPA/kg/día
1993	<ul style="list-style-type: none"> • Krishman y cols. descubren que BPA migra desde los frascos de cultivo de PC y actúa como un estrógeno
1997	<ul style="list-style-type: none"> • Primera publicación sobre efectos adversos a bajas dosis de BPA en animales de experimentación
1998	<ul style="list-style-type: none"> • Las industrias japonesas deciden reducir voluntariamente el uso de BPA
2006	<ul style="list-style-type: none"> • Consenso de Chapel Hill. Científicos manifiestan preocupación sobre diferentes efectos adversos de BPA a bajas dosis
2008	<ul style="list-style-type: none"> • Un informe emitido por el NTP de EEUU expresa su preocupación por los efectos sobre cerebro y próstata de fetos, bebés y niños
2010	<ul style="list-style-type: none"> • FAO/OMS declaran que no hay datos para lograr con claridad el establecimiento de un nivel "seguro" de exposición a BPA • Canadá se convierte en el primer país en prohibir el uso de BPA en biberones. Lo declara sustancia tóxica.

2011

- La UE prohíbe la fabricación y venta de biberones de PC para lactantes

2012

- Francia aprueba una ley que prohíbe el uso del BPA en productos destinados a niños menores de 3 años de edad (2013) y a toda la población (2015)

2013

- Primera parte del informe CEF. Estimaciones de exposición halladas más bajas que las anteriormente reportadas.

2014

- Segunda parte del informe CEF. Asociación BPA con efectos adversos en hígado, riñón y glándula mamaria. IDT provisional de 0.005 mg/kg/d

2. Justificación de la Tesis doctoral y de su unidad temática

Entidades como la FDA o el NTP de EE.UU han expresado su preocupación por los efectos que el BPA pudiera tener sobre el desarrollo del SNC y del tracto reproductivo. Si bien es cierto que, como medida cautelar, se ha procedido a la prohibición de la comercialización e importación de biberones de PC para lactantes que contenga BPA, quedan desprotegidas otras poblaciones susceptibles, tales como mujeres embarazadas y niños. Asimismo, cabría preguntarse si la exposición adulta a BPA a los actuales niveles legalmente admitidos está exenta de riesgo. Francia ha tomado la iniciativa anunciando una eliminación del uso de BPA en todos los envases de alimentos para el 2015. Mientras tanto, otros países consideran que no hay suficientes datos para adoptar estas medidas, o incluso cambiar la IDT.

2.1. Estudios en Próstata

Los efectos del BPA sobre la glándula prostática han sido objeto de un gran debate entre diferentes grupos científicos a lo largo de los años. Mientras que algunos autores han declarado no observar efectos adversos tras la exposición a este químico, un cierto número de estudios indican que, además de interferir con el desarrollo embrionario de la glándula prostática, produce alteraciones que podrían predisponer a lesiones cancerosas. No obstante, aún no se conocen en su totalidad los mecanismos moleculares implicados. En la Figura 1.6 se ilustran los principales estudios llevados a cabo en este órgano desde 1997 (primeros efectos documentados) a 2010 (fecha de inicio de la presente Tesis doctoral).

La mayoría de los estudios publicados acerca de los efectos del BPA sobre la glándula prostática se han centrado en la exposición durante el desarrollo. Sin embargo, existen pocos datos publicados sobre las consecuencias de la exposición adulta a BPA en este órgano. Al respecto, Ogura y cols. (2007) indicaron que el

BPA puede inducir la expresión de citoqueratina 10 en epitelio prostático de ratón, una proteína relacionada con metaplasia escamosa.

El desarrollo, maduración y función de la glándula prostática depende de andrógenos, fundamentalmente de dihidrotestosterona (DHT) (Marker et al., 2003). Dicha hormona es sintetizada a partir de testosterona (T) circulante por la enzima 5 alfa-Reductasa (5 α -R). Existen 5 tipos diferentes, siendo 5 α -R1, 5 α -R2 y más recientemente, 5 α -R3, las más relacionadas con el metabolismo androgénico y la patología prostática (incluyendo hiperplasia prostática benigna, HPB, y cáncer de próstata, CaP) (Steers, 2001; Uemura et al., 2008). De hecho, tanto finasteride, un inhibidor específico de 5 α -R2, como Dutasteride, un inhibidor dual de 5 α -R1 y 5 α -R2, han sido ampliamente utilizados durante años en la prevención y/o tratamiento de HPB y CaP (Kaplan, 2012; Rittmaster et al., 2008). Aunque se tiene menos conocimiento de la isoenzima 5 α -R3, su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer ha hecho que sea propuesta como un biomarcador de malignidad (Godoy et al., 2011).

Junto con los andrógenos otras hormonas, entre ellas los estrógenos, podrían jugar también un papel importante en la patología prostática (Ellem et al., 2004; Ho and Habib, 2011). Esta hipótesis es sustentada por evidencias previas que indican unos niveles plasmáticos de T reducidos y de E2 elevados en pacientes con HBP (Ortega et al., 1979; Tan et al., 2003), así como un mayor ratio E2/T en hombres mayores que, curiosamente, son los que tienen un mayor riesgo de enfermedad prostática (Ho and Habib, 2011). Sin embargo, las variaciones de las concentraciones circulantes de E2 podrían no reflejar con precisión los niveles intraprostáticos, ya que E2 es producido en este órgano a partir de la T circulante por la enzima aromatasa. Interesantemente, un incremento de aromatasa ha sido observado en próstata humana maligna (Ellem et al., 2004).

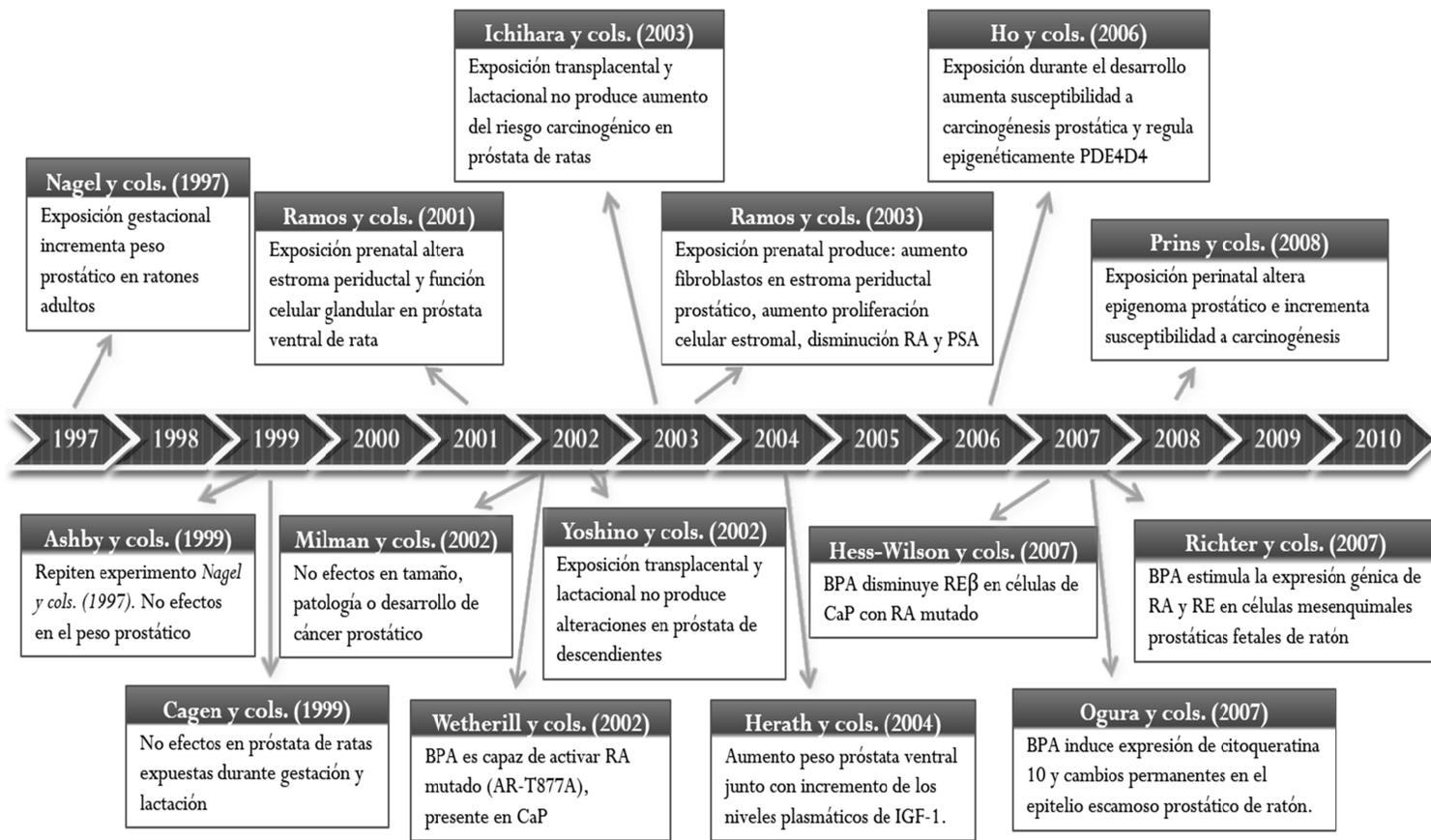


Figura 1.6: Principales hitos en el estudio de los efectos del BPA en la glándula prostática. Se muestran los principales resultados de los estudios realizados en próstata entre 1997-2010. Los estudios han sido llevados a cabo en roedores y/o cultivos celulares. *CaP*: Cáncer de próstata, *PSA*: Antígeno prostático específico, *RA*: Receptor de andrógenos, *RE*: Receptor de estrógenos.

Si bien es cierto que el BPA modifica la expresión de la enzima aromatasa en varios tejidos, este efecto no había sido explorado en la glándula prostática. Cabe señalar que hasta la presente investigación no se disponía de ninguna publicación científica que abordara los efectos del BPA sobre las isoenzimas 5α -R en ningún tejido. Atendiendo a estas consideraciones, como primera hipótesis nos planteamos que el BPA podría afectar a la fisiopatología prostática vía modificaciones en las isoenzimas 5α -R y/o aromatasa.

Llama la atención que los EDCs presentan acciones y efectos diferentes dependiendo del tejido y la dosis utilizada. Tradicionalmente, para trazar el perfil toxicológico de una sustancia se han utilizados curvas dosis-respuesta monotónicas, es decir, a mayor dosis administrada mayor efecto. No obstante, tanto para las hormonas como para las sustancias que actúan como ellas, se ha evidenciado que a dosis muy bajas el efecto observado puede ser mucho mayor que el presentado a dosis altas (“*dosis-respuesta no monofásica*”, o “*en forma de U*”) o incluso producirse diferentes efectos (Vandenberg et al., 2006; Welshons et al., 2003).

En base a las reflexiones anteriores, en nuestro **primer estudio** examinamos los efectos de la exposición adulta a BPA a diferentes dosis (25, 50, 300 y 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) sobre los isoenzimas 5α -R (5α -R1, 5α -R2 y 5α -R3) y la enzima aromatasa en próstata ventral de rata.

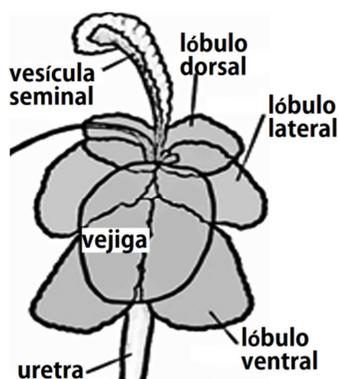


Figura 1.7: Lóbulos de la próstata de rata.
Adaptado de Kelleher y cols. (2011).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación y de otros autores han demostrado que los niveles intraprostáticos de 5α -R1 y 5α -R2 son regulados positivamente por T (Li et al., 2011b; Torres et al., 2003a). En consecuencia, BPA podría afectar la expresión de dichas isoenzimas vía modulación de los niveles plasmáticos de T. Tratando de profundizar, en nuestro **segundo estudio** utilizamos *ratas castradas* a las que se les administraron dosis constantes y conocidas de T. Las dosis de BPA elegidas fueron una mayor mayor y otra menor a la IDT establecida por la EPA (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$).

2.2. Estudios en Corteza Prefrontal

Las consecuencias neurobiológicas y conductuales de la exposición a BPA han tomado recientemente un especial interés. Estudios llevados a cabo en niños han indicado que la exposición a BPA podría estar ligada con hiperactividad, aumento de la agresividad y alteraciones en las funciones ejecutivas en estos sujetos (Braun et al., 2011; Perera et al., 2012). Otras de las anormalidades conductuales atribuidas al BPA incluyen: incremento de la ansiedad (Matsuda et al., 2012) y de la susceptibilidad a drogas adictivas (Welshons et al., 2006), disminución del comportamiento maternal (Della Seta et al., 2005; Palanza et al., 2002) y alteración de comportamientos socio-sexuales (Dessi-Fulgheri et al., 2002; Farabollini et al., 2002; Monje et al., 2009). Asimismo, se ha visto que afecta a procesos de memoria y aprendizaje (Carr et al., 2003; Xu et al., 2013). Diversos estudios en animales de experimentación, incluyendo primates no humanos, han mostrado que el BPA administrado a dosis bajas puede afectar no sólo a la conducta, sino también producir efectos persistentes en la estructura y función del cerebro. En esta línea, se ha demostrado que el BPA interfiere con la sinaptogénesis en hipocampo y corteza prefrontal (CPF) (Leranth et al., 2008a,b), así como con el desarrollo neocortical normal (Nakamura et al., 2006, 2007). BPA, además de ejercer efectos sexo-específicos, produce una pérdida de dimorfismo sexual en términos de estructura cerebral y comportamiento (Patisaul

et al., 2007; Rubin et al., 2006). Por otra parte, algunos trabajos apuntan a que la exposición a BPA podría contribuir al desarrollo de psicopatologías como la esquizofrenia (Brown et al., 2009) y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (Ishido et al., 2007).

En la rata, el período crítico para la diferenciación sexual comienza 18 días antes de la concepción y continúa hasta el día postnatal (*postnatal day*, PND) 7 (MacLusky and Naftolin, 1981). Durante este proceso las hormonas sexuales juegan un papel crucial. Se ha demostrado que los estrógenos son esenciales para la masculinización y desfeminización del cerebro (Fitch and Denenberg, 1998; Levine, 1971). En mamíferos, el sexo por defecto es la hembra y el feto solo diferenciará a macho bajo la influencia de las hormonas gonadales; en concreto, cuando la T producida en los testículos alcanza el cerebro y es convertida *in situ* a estrógenos. En la hembra, los estrógenos son secuestrados por la α -fetoproteína, protegiendo al cerebro de sus efectos masculinizantes (Bakker et al., 2006). Por otra parte, se ha visto que la DHT (andrógeno que no es aromatizado) interviene también en la configuración de las características masculinas del cerebro de mono Rhesus (Thornton et al., 2009). Además, DHT puede ser metabolizada a 5α -androstano- 3α , 17β -diol (3α -diol) o 5α -androstano- 3β , 17β -diol (3β -diol), metabolitos que parece ser que se unen preferentemente al RE- β (Handa et al., 2009).

Durante el período neonatal los niveles hormonales se elevan y actúan “organizando” el cerebro, ya sea actuando como neuroprotectores o induciendo apoptosis en ciertas regiones cerebrales (McEwen et al., 1977). Mientras que en el cerebro adulto los esteroides neuroactivos o neuroesteroides (entendiéndose estos últimos como los esteroides sintetizados *in situ*, en el cerebro) han sido implicados en fenómenos de neuroprotección y regeneración (Brinton, 2013; Charalampopoulos et al., 2008). De hecho, alteraciones en sus niveles han sido asociados con un gran número de desórdenes mentales, tales como depresión,

ansiedad y estrés, psicosis, adicciones (alcohol y drogas de abuso), Alzheimer y epilepsia (*para más información véase* Reddy et al., 2010; Strous et al., 2006).

Al igual que en la glándula prostática, el enzima 5α -R desempeña un papel fundamental en el normal desarrollo y función del SNC, ya que produce, por una parte DHT, que podría estar implicada en la diferenciación sexual de ciertas regiones cerebrales (Thornton et al., 2009; Torres and Ortega, 2003b; 2006) y, de otra, neuroesteroides $3\alpha,5\alpha$ -reducidos (NE- $3\alpha,5\alpha$). La transmisión central GABAérgica juega un papel clave en controlar el estado emocional y participa en la regulación de varios fenómenos psicofisiológicos (Paul and Purdy, 1992). Alopregnanolona (AloP), el $3\alpha,5\alpha$ -NE reducido de la progesterona (Prog), es uno de los ligandos más potentes conocidos del receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) tipo A (R-GABA_A) en el SNC y presenta efectos anestésicos, ansiolíticos, sedativos y anticonvulsivantes, similares a la acción de benzodiazepinas y barbitúricos (Paul and Purdy, 1992). 5α -R1 es la isoenzima principal implicada en la biosíntesis de NE- $3\alpha,5\alpha$ (Paul and Purdy, 1992) y tiene también un papel catabólico, protegiendo a las neuronas contra la apoptosis inducida por el exceso de glucocorticoides (Mahendroo et al., 1997). Como se ha indicado anteriormente, en el cerebro T es convertida también a E2 por la enzima aromatasa. Curiosamente, se ha descrito que los estrógenos son capaces de afectar tanto a los niveles de AloP como de R-GABA_A (Calza et al., 2010). Por tanto, BPA podría ejercer sus efectos neurotóxicos, al menos en parte, vía alteraciones en 5α -R y/o aromatasa.

Se disponen de muy pocos estudios abarcando los efectos del BPA en la CPF. La importancia de esta área cerebral radica en que está implicada en una gran variedad de procesos cognitivos, así como en diversas psicopatologías, incluyendo esquizofrenia, TDAH, abuso drogas, ansiedad y depresión (*para una mayor revisión véase* Arnsten and Li, 2005; Fuster, 2001).

En primates, la CPF ha sido subdividida en 3 regiones:

- a) CPF dorsolateral, relacionada con la memoria de trabajo. Lesiones en esta zona pueden provocar el *Síndrome dorsolateral frontal o síndrome disejecutivo*, caracterizado por la incapacidad para generar estrategias.
- b) Corteza orbitofrontal, forma parte del sistema límbico y regula las respuestas emocionales. Lesiones en esta área conllevan a una desinhibición del individuo e impulsividad, afectando de forma prominente a la personalidad del individuo (*Síndrome orbitofrontal o de cambio de personalidad*).
- c) CPF medial, muy relacionada con la anterior, involucrada tanto con procesos cognitivos y emocionales (afecto) como viceromotores.

En la siguiente figura (Fig. 1.8) se ilustran las subdivisiones de la CPF de rata (lateral, orbital y medial):

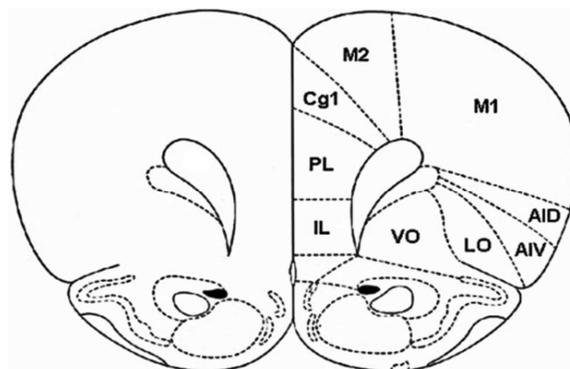


Figura 1.8: Vista coronal de la corteza prefrontal de rata (+3,2 mm anterior a bregma, atlas de Paxinos y Watson, 1998). Área lateral: corteza agranular insular dorsal (AID) y ventral (AIV); área ventral: corteza orbital ventral (VO) y lateral (LO); área medial: corteza cingulada (Cg1), corteza prelímbica (PL), corteza infralímbica (IL). También se muestran las áreas motoras 1 (M1) y 2 (M2).

Se cree que la zona PL participaría más en las funciones límbico-cognitivas (homólogas a la CPF dorsolateral de primates) y la IL controlaría actividades viscerales-autónomas (homólogas a la CPF orbitomedial de primates) (Vertes, 2004). Por lo tanto, es factible pensar que alteraciones en la CPF podrían mediar, al menos en parte, las anormalidades conductuales observadas en animales experimentales y humanos expuestos a BPA.

Ha sido sugerido que el sistema GABAérgico podría estar modulado por el sistema serotoninérgico en la CPF (Waider et al., 2013). Por otro lado, alteraciones en la señalización serotoninérgica han sido también implicadas en la patogénesis de un amplio rango de desórdenes neuropsiquiátricos, incluyendo esquizofrenia (Geyer and Vollenweider, 2008), depresión (Snyder et al., 2011), agresión y comportamiento suicida (Pjevac and Pregelj, 2012). La enzima triptófano hidroxilasa (Tph) cataliza el paso limitante en la síntesis de serotonina (5-HT) y por tanto, es considerada una de las dianas moleculares clave en el desarrollo de desórdenes psiquiátricos y conductuales (Chen and Miller, 2012). Se conocen dos isoformas de Tph, Tph1 y Tph2. Mientras Tph2 es expresada específicamente en el cerebro, Tph1 es responsable de la síntesis de 5-HT en tejidos periféricos (Walther and Bader, 2003).

Sobre esta base, en nuestro **tercer estudio** examinamos los *efectos de la exposición adulta a BPA (50 µg/kg/d, IDT) sobre las isoenzimas 5α-R, aromataza, e isoenzimas Tph*. Además, con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares de acción del BPA en la CPF adulta, *84 genes implicados en diferentes respuestas neurotóxicas* fueron también analizados por la tecnología de PCR-array.

El SNC del feto y del recién nacido es particularmente vulnerable a la acción del BPA y, al mismo tiempo, se encuentran expuestos a niveles más altos de BPA no conjugado, la forma bioactiva (Welshons et al., 2006). Además, ha sido postulado que la exposición a ECDs durante el desarrollo de los órganos

podría ocasionar alteraciones permanentes, incluso en la ausencia de exposiciones subsecuentes (Richter et al., 2007b).

Diversos autores han indicado que el BPA interfiere con el desarrollo de los sistemas de neurotransmisión, entre ellos el sistema dopaminérgico (Masuo and Ishido, 2011). La dopamina (DA) es un neurotransmisor involucrado en una gran variedad de procesos cerebrales, incluyendo procesos cognitivos, actividad motora, atención, y sistemas de recompensa (*para una mayor revisión véase Jones and Miller, 2008*). Por lo tanto, alteraciones en este sistema podría desencadenar diversos trastornos psicopatológicos. DA modula funciones prefrontales críticas (Robbins and Roberts, 2007). De hecho, ha sido descrito en primate y rata que la depleción de DA prefrontal por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) disminuye el correcto desempeño de tareas que implican memoria operativa y cognición (Robbins and Roberts, 2007).

Componentes de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico aparecen pronto durante la embriogénesis, sugiriendo que juegan un papel importante en diferentes procesos del desarrollo (Frederick and Stanwood, 2009). Así, algunos transcritos de receptores de DA (RsD) pueden ser detectados en la CPF de rata sobre el día gestacional (*gestational day, GD*) 14 (Schambra et al., 1994), mientras que neuronas serotoninérgicas son evidentes en el cerebro de roedor en GD12 (Lauder, 1990).

En nuestro **cuarto estudio** nos preguntamos *si la exposición a BPA durante el periodo perinatal (GD12-PND21), a una dosis menor del actual límite diario considerado como seguro, podría influenciar el desarrollo de los sistemas precorticales DA y 5-HT en ratas*. Dado que los efectos neurotóxicos de la exposición pre- y/o postnatal temprana podrían manifestarse en la etapa joven y/o adulta, en nuestro estudio abarcamos ambos períodos de la vida. Para este propósito, utilizando la tecnología de PCR-array, evaluamos simultáneamente la expresión de 84 genes asociados con los sistemas DA y 5-HT.

A medida que se han ido implantando restricciones en el uso de BPA en ciertos productos de consumo por algunas agencias reguladoras, el uso de análogos de BPA, tales como Bisfenol F (BPF) y Bisfenol S (BPS) ha ido aumentando (Liao et al., 2012a, 2013). A este respecto, se ha descrito la presencia de BPF y BPS en materiales de envases alimentarios y productos de papel (Liao et al., 2013, 2012b), lo cual podría resultar en una exposición baja pero crónica. Además, comparado con el BPA, el BPS parece ser más resistente a la degradación medioambiental y, por tanto, más probable para acumularse en el ambiente (Danzl et al., 2009; Ike et al., 2006). El BPS ha sido propuesto como una alternativa segura de BPA en la fabricación de botellas de plástico de alimento para bebés (Simoneau et al., 2011). Lamentablemente, los datos disponibles sobre los efectos tóxicos de BPF y BPS son muy limitados y principalmente proceden de estudios *in vitro*. En esta línea, Viñas y Watson (2013) sugirieron que bajas dosis de BPS pueden alterar vías de señalización no genómicas en células de cultivo pituitarias. Asimismo, ha sido descrito que BPS altera la transcripción de genes pertenecientes al eje hipotalámico-pituitario-gonadal en peces zebra (Ji et al., 2013). Sin embargo, a nuestro conocimiento, hasta la fecha ningún estudio ha reportado los potenciales efectos neurotóxicos de este químico *in vivo* en mamíferos. Dada la similitud de sus estructuras moleculares con la del BPA (Fig. 1.9), cabría preguntarse si podrían tener efectos similares.

En base a las ideas expuestas anteriormente, podríamos hipotetizar que la exposición perinatal a agentes medioambientales que interfieren con la expresión y/o actividad de las isoenzimas 5α -R o con el desarrollo de los sistemas DA y 5-HT en la CPF, podría tener consecuencias perjudiciales para las funciones desempeñadas por ésta área cerebral. Consecuentemente, podría verse incrementado el riesgo para el desarrollo de trastornos del comportamiento y/o psicopatologías en animales y humanos expuestos.

Por tanto, en nuestro **quinto estudio** (y último de la presente Tesis doctoral), nos centramos en la *CPF de ratas hembra jóvenes expuestas perinatalmente* a estos bisfenoles, para analizar por primera vez: (a) los efectos de BPA, BPF y BPS sobre las isoenzimas 5 α -R (5 α -R1, 5 α -R2 and 5 α -R3), (b) el potencial de BPF y BPS de afectar los sistemas DA y 5-HT y, (c) si estos tres componentes comparten mecanismos moleculares de acción similares.

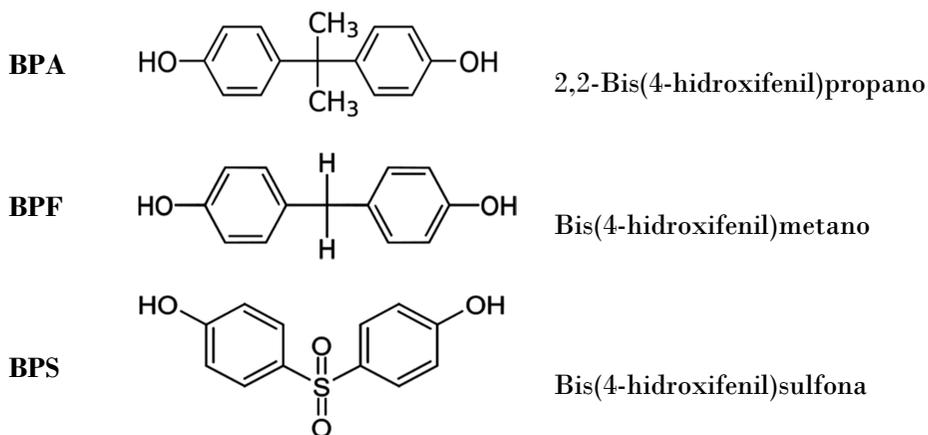


Figura 1.9: Estructuras moleculares de Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF) y Bisfenol S (BPS)

Research Objectives

The aim of the work presented in this thesis is to investigate the molecular mechanisms of the BPA effects in the prostate and PFC of rats, focusing on its interference with 5α -R isozymes and DA and 5-HT systems.

Specific Aims

1. To examine in rat ventral prostate the effects of adult exposure to BPA on 5α -R and aromatase, key enzymes in the biosynthesis of DHT and E2, respectively (*Study 1*).
2. To investigate the effects of short-term exposure to BPA on mRNA levels of 5α -R1 and 5α -R2 in prostate of adult rats with constant circulating T levels (*Study 2*).
3. To elucidate molecular mechanisms underlying BPA neurotoxicity in the PFC of adult rats (*Study 3*).
4. To characterize the short- and long-term consequences of BPA exposure during the critical developmental period of DA and 5-HT systems on genes associated with these neurotransmitters (*Study 4*).
5. To analyze in the PFC of juvenile rats perinatally exposed to bisphenols: (i) the effects of BPA, BPF and BPS on 5α -R isozymes expression, (ii) the potential of BPF and BPS to affect DA and 5-HT systems, (iii) whether these three compounds share similar molecular mechanisms of action (*Study 5*).

Capítulo 2

MATERIAL Y MÉTODOS

Capítulo 2

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Todos los experimentos se realizaron con ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar suministradas por *Charles River Laboratories*. En concreto, para los diferentes estudios integrantes de esta Tesis se utilizaron: a) ratas macho adultas (260-300 g)¹ y ratas hembra adultas (180-210 g), b) ratas gestantes, c) ratas macho y hembra de 21 días de edad, d) ratas macho de 90 días de edad.

Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) y humedad (50 ± 10 %), en ciclos de luz/oscuridad de 12 h y con libre acceso al pienso (dieta estándar Panlab, A04 para roedores, Barcelona, España) y al agua. La exposición a disruptores endocrinos fue minimizada alojando las ratas en jaulas de acero inoxidable y usando botellas de vidrio con tapones de goma para abastecer el agua.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del NIH de EE.UU, ajustándose a lo dispuesto por la normativa legal del Real Decreto 1201/2005 sobre “*Protección de los Animales Utilizados para Experimentación y Otros Fines Científicos*”. Los aspectos éticos y legales fueron revisados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada (España) (Ref. 412-2012-CEEA).

¹ De acuerdo con Marco Cossio-Bolaños y cols. este peso equivaldría en ratas macho Wistar a una edad comprendida entre aprox. 55-65 días. (*Nutr Hosp.* 20013;28(6):2151-2156)

2. Equipos, material y reactivos utilizados

A

Agua para biología molecular (*MO BIO Laboratories*)

Agarosa (*Master Diagnostica*)

Agitador vortex Zx3 (*VELP Scientifica*)

Agitador de placas *Grant-bio PS-3D*

Anticuerpos secundarios: *donkey anti-goat IgG-HRP*, *goat anti-mouse IgG-HRP*, *goat anti-rabbit IgG-HRP* (*Santa cruz biotechnology*)

Autoclave *P-Selecta*

B

Balanza de precisión (*Boeco*)

Buffer II (10x) (*Applied Biosystems*)

Buffer 5x *Phire Hot Start II DNA polymerase* (*Thermo Scientific*)

C

Cebadores (*Integrated DNA Technologies*)

Cloroformo (*Scharlau*)

Campana de flujo laminar (*Cruma SA*)

Centrífuga (*Sigma*)

Cl₂Mg (25mM) (*Fermentas*)

Congeladores -20°C y -80°C

Cubeta de electroforesis *Mini-Protean 3* (*BioRad*)

D

DCTM *Protein Assay Reagent A, B y S* (*Bio-Rad*)

DHT ELISA kit (*Diagnostics Biochem*)

3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (*Master Diagnostica*)

dNTPs (100mM) (*Dominion*)

Dodecil sulfato sódico (SDS, *Acros*)

E

Espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000*

Espectrofotómetro *BioTex Eon*

Esponjas (western blot) (*Bio-Rad*)

Estradiol Assay kit (*Diasorin*)

Etanol absoluto (*Merck*)

F

Fenol (*Sigma*)

Frigorífico 4°C

Fuente de alimentación *BioRad 3000*

G

Glicina (*Scharlau*)

GoTaq® qPCR Master Mix, 2x (*Promega*)

Guillotina para roedores

H

Halt™ Protease inhibitor cocktail (100x) (*Thermo scientific*)

Heparina

Homogenizador *Polytron® PT 1200* (*Kinematica*)

I

Isopropanol (*Sigma*)

Inhibidor de RNasa (*Applied Biosystems*)

Immun-Star™ Western™ kit (*Bio-Rad*)

Inmunoteñidor *Autostainer 480* (*Thermo Fisher*)

L

Laemmli sample buffer (*Bio-Rad*)

Leche en polvo no grasa (*Blotting-Grade Blocker*, *Bio-Rad*)

Loading Dye blue/orange 6x (*Promega*)

M

Máquina de hielo *Difri*

MEGAscript® T7 High Yield transcription kit (Ambion)
 Membrana para proteínas (*Immuno-Blot® PVDF 0.2 µm, Bio-Rad*)
 Metanol (*Acros*)
 2-Mercaptoetanol (*Merck*)
 Microcentrífuga (*Eppendorf*)
 Microondas
Mini-PROTEAN TGX Precast Gels al 12 % (Bio-Rad)
 Módulo PT (*Thermo Fisher*)
Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad)

N

NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific)
 Nitrógeno líquido

P

Papel de filtro para western blot (*Whatman papers, filtros Anolia SA*)
 Patrón de peso molecular (proteínas): *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad)*
PBS 10x (Phosphate buffered saline, Bio-Rad)
 Película adhesiva por calor para placas PCR (*Eppendorf*)
Phire Hot Start II DNA polymerase (Thermo Scientific)
 Pipetas automáticas *Gilson* de 2-20, 20-100, 50-200 µl
 Pipetas automáticas *Boeco* de 0.8-10, 200-1000 µl
 Pipeta automática *Eppendorf* de 0.1-2.5 µl
 Placas de PCR de 96 pocillos, 0.2 mL (*Thermo Scientific*)
 Placas tipo ELISA (*Deltalab*)
 Primer Oligo(dT)15 (500 µg/mL) (*Promega*)

Protein Assay Standard II (Bovine serum albumin, Bio-Rad)
 Puntas con filtro (*Axygen*)

R

RT² First Strand kit (SABiosciences)
RT² SYBR Green Master mix (SABiosciences)

S

Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogen™)
 Sistema de electroforesis horizontal, (*BioRad Mini Su Cell GT*)

T

Testosterone Assay kit (DiaSorin)
Trizol (Ambion, Life technologies)
 Termociclador *Techne Quantica®*
 Tubos eppendorfs 0.5, 1.5 y 2 ml
 Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50x (*Fisher Scientific*)
 Tris-base [*Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane*] (*Scharlau*)
 Transiluminador UV (*Bio-Rad*)
Turbo DNA-free™ (Ambion)
 Transcriptasa inversa MulV (*Applied Biosystems*)
 Termociclador *TC-412 (Techne)*
 Tubos de ensayo
 Tween-20 (*Bio-Rad*)
Tris/Glycine/SDS Buffer 10x (Bio-Rad)

3. Metodología general

3.1. Recogida y procesamiento de las muestras

A los 30 min después de la última inyección, los animales fueron eutanizados por decapitación con guillotina. Los órganos objeto de estudio (cerebro y próstata) fueron inmediatamente extraídos tras el sacrificio del animal, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su análisis. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos heparinizados y centrifugadas a 2000 rpm durante 15 min. El plasma se guardó a -20 °C hasta que se realizaron las medidas hormonales.

3.2. Análisis hormonal

Las concentraciones de T plasmática fueron determinadas mediante radioinmunoensayo (*Radioimmunoassay, RIA*) usando el kit comercial *Testosterone Assay* (DiaSorin, Vercelli, Italia) sin modificaciones. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 7,6 % y 12,0 %, respectivamente. La sensibilidad fue de 0,05 ng/ml.

El E2 se cuantificó en plasma por RIA usando el kit comercial *Estradiol Assay* (Diasorin, Vercelli, Italia) sin modificaciones. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 4,8 % y 9,5 %, respectivamente. La sensibilidad fue de 12 pg/ml.

Los niveles plasmáticos de DHT fueron medidos por Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA*) directo, usando un kit comercial (Diagnostics Biochem Canada, Inc., Ontario, Canada). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 5,9 % y 7,5 %, respectivamente. La sensibilidad fue 6,0 pg/ml.

3.3. Análisis de ácidos nucleicos

3.3.1. Extracción de ARN y cuantificación

Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total de tejido se empleó el reactivo Trizol (tiocianato de guanidinio y fenol), basado en el método de extracción del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski and Sacchi, 1987). Se siguió el protocolo proporcionado por *The Sanger Institute*[®], consistiendo en 5 pasos:

1. HOMOGENEIZACIÓN

En un eppendorf de 2 ml se introduce la muestra de tejido (25-100 mg) y se le añade 1 ml de trizol. A continuación se homogeniza en hielo con ayuda de un polytron a velocidad media, en tandas de 10-12 s para evitar que la muestra se caliente.

2. SEPARACIÓN DE FASES

Las muestras homogeneizadas se incuban a temperatura ambiente (TA) durante 5 min. Por cada mililitro de trizol empleado se añaden 200 µl de cloroformo, reactivo que extraerá el ARN de la solución. Para ello, se agita en vórtex durante 15 s y se incuba a TA durante 2 ó 3 min. A continuación centrifugamos las muestras a 12 000 g, 15 min a 4 °C. En este paso se forman dos fases por diferencia de densidad: una superior acuosa, que contiene el ARN en cloroformo y otra inferior fenólica orgánica, que contiene el ADN y otros restos celulares; ambas fases aparecen separadas por una interfase de proteínas. El sobrenadante es transferido a un nuevo tubo de 1,5 ml.

3. PRECIPITACIÓN DEL ARN

El ARN precipita añadiendo 500 μ l de isopropanol por cada mililitro de trizol. Se mezcla por inversión y se incuba a TA 10 min. A continuación se centrifuga a 12 000 g durante 15 min a 4 °C. Si todo ha sido correcto, se formará un precipitado de ARN en forma de sedimento al fondo del tubo.

4. LAVADO DEL ARN

El sobrenadante se elimina y se lava el pellet de ARN con 1 ml de etanol al 75 %. Tras agitar por inversión se centrifuga a 7500 g durante 5 min a 4 °C. Se elimina el sobrenadante y procedemos a repetir la operación.

5. DISOLUCIÓN DEL ARN

El pellet de ARN se deja secar durante 5-10 min a TA y a continuación lo disolvemos en agua libre de RNAsas (el volumen a añadir dependerá del tamaño del pellet y tejido de partida). Las muestras de ARN se guardan a -80 °C hasta un uso posterior.

Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN

La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000[®]. Para estimar la pureza de la muestra (exceso de sales, contaminación con proteínas o solventes orgánicos) son útiles las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorbancia (A) en 260. Una muestra de ARN pura tiene una relación A_{260}/A_{280} de aproximadamente 2. Los contaminantes orgánicos como el fenol, el trizol y algunos reactivos usados en la extracción de ARN, absorben luz a una longitud de onda de 230 nm. Las muestras que presentan un bajo cociente A_{260}/A_{230} (menos de 1,8), tienen una presencia significativa de estos contaminantes, lo que podría conllevar a una menor eficiencia en las técnicas posteriores. Ambas relaciones las efectúa de forma automática el NanoDrop[®].

Para determinar la integridad del ARN total extraído, se sometió una alícuota a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR safe[®]. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 30 min, utilizando TAE 1X como tampón. El ARN se observó en un transiluminador de ultravioleta.

Tratamiento con DNAsa

El ADN genómico, potencialmente presente en la muestra de ARN, fue eliminado por tratamiento con Turbo DNA-free[™] (Ambion[®]).

PROCEDIMIENTO

- En un eppendorf de 0,5 ml se añade 10 µg de ARN, 1 µl de Turbo DNAsa y 5 µl de tampón, completando con ddH₂O hasta un volumen total de 50 µl.
- Se resuspende suavemente con una micropipeta y se incuba a 37 °C durante 30 min.
- Se agrega 1 µl de Turbo DNAsa y se vuelve a incubar en las mismas condiciones.
- Pasados los 30 min, se añade 10 µl de reactivo de inactivación proporcionado por el kit y se deja 3-5 min a TA. Mezclar ocasionalmente.
- A continuación se centrifuga a 10 000 g durante 2 min a 4 °C.
- El sobrenadante (conteniendo el ARN) se transfiere a un nuevo tubo y se guarda a -80 °C hasta su uso.

3.3.2. Retrotranscripción de ARN

La retrotranscripción (o transcripción inversa) consiste en la generación de ADN a partir de ARN. El ADN obtenido recibe el nombre de “ADN complementario” (ADNc). El proceso comprende la desnaturalización de la

hebra molde y la unión de un oligo desoxitimidina (T20, oligo dT) a la cola poliadenilada del ARNm. Seguidamente se sintetizaría el ADNc mediante la actividad retrotranscriptasa inversa (Fig. 2.1.)

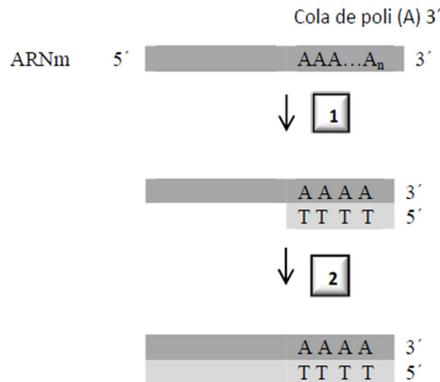


Figura 2.1: Proceso de transcripción inversa. El *primer* de oligo-dT hibrida con la cola de poli-A presente en el ARNm (1) y a partir de él, la enzima transcriptasa inversa transcribe el ARN a ADNc.

PROCEDIMIENTO

La muestra de ARN (1 μg) se incubó con 1 μl de transcriptasa inversa MuLV durante 10 min a 55 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 20 min a 70 $^{\circ}\text{C}$ en un volumen total de reacción de 20 μl , conteniendo: 2 μl buffer 10x, 4 μl Cl_2Mg (25 mM), 8 μl dNTPs (25 mM), 1 μl inhibidor de RNAsa, 1 μl primer oligo dT (50 μM) y el resto ddH₂O.

3.3.3. Diseño de oligonucleótidos usados para la amplificación

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar más de un millón de veces una determinada

secuencia de ADN. Para ello se usan dos oligonucleótidos sintéticos (cebadores o *primers*) de unas 20 bases complementarias a la zona que se quiere amplificar.

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los genes a amplificar en los estudios integrantes de esta Tesis doctoral se obtuvieron de la base de datos GenBank. Estas secuencias fueron utilizadas para diseñar los pares de cebadores. Para tal fin, se utilizó el programa Primer 3 y la herramienta proporcionada por IDT Technologies (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). Las secuencias de los oligos seleccionados se sometieron a una búsqueda de homología mediante el algoritmo BLAST, para evitar amplificaciones inespecífica.

Para la construcción de la curva estándar utilizada en la amplificación del material genético se utilizaron *primers* modificados. La modificación consistió en la incorporación de una secuencia promotora T7 en el extremo 5' del *primer forward* y un oligo-dT en el extremo 5' del *primer reverse*.

Las secuencias de los oligos empleados en esta Tesis, así como las temperaturas de anillamiento, se muestran en la Tabla 2.1.

Genes	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>T_m</i>
5 α -R1	GAGATATTCAGCTGAGACCC	TTAGTATGTGGGCAGCTTGG	55
5 α -R2	ATTTGTGTGGCAGAGAGAGG	TTGATTGACTGCCTGGATGG	55
5 α -R3	TGCCCATCAGTATAAGTGCC	TCACCATAAAGCTCGAACCAG	50
Aromatasa	TGAGAAGAACGTTCCCTACAG	TCCTCATCTAGATGCAAGGAC	60
Tph1	CCAGCTAGTTCAGTCTGC	CTGATTCTCCAGCATCACCAG	63
Tph2	CTCCAAGCTTCGCATCACAG	AGCACTTCAGGAAGCGTACC	57

Tabla 2.1: Secuencia nucleotídica (5'-3') de los *primers* específicos utilizados en la qRT-PCR. *T_m*: Temperatura de anillamiento.

3.3.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La cuantificación absoluta del ARNm de 5 α -R1, 5 α -R2, 5 α -R3, aromatasa, Tph1 y Tph2 en el tejido prostático y/o cerebral fue realizada por PCR a tiempo real mediante la amplificación de las muestras junto con una curva estándar. En comparación con la cuantificación relativa, este método ofrece la ventaja de dar un número absoluto de copias para una determinada diana. La cantidad de ARNm fue expresada como número de copias de ARNm por microgramo de ARN total.

Construcción de la curva estándar

Para la construcción de la curva de calibración se siguió el método descrito por Fronhoffs y cols. (2002) basado en la utilización de estándares externos de ARN complementario (ARNc) con idéntica secuencia génica que el gen diana de interés.

PROCEDIMIENTO

1. Retrotranscripción de las muestras que se van a utilizar para elaborar la curva estándar (siguiendo el mismo protocolo descrito).
2. Preparación de los *primers* modificados. Los *primers* se diluyen hasta la concentración apropiada (en nuestro caso fue de 25 μ M) y se determina la temperatura óptima de anillamiento (T_m) mediante un gradiente de temperatura en el termociclador.
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con *primers* modificados. Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Vol. (μl)
Buffer 5x Phire	4
dNTP (2.5 mM)	2
Primer Reverse modificado (25 μM)	0.4
Primer Forward modificado (25 μM)	0.4
Phire Hot Start II ADN polimerasa	0.4
ADNc	4
H ₂ O	8.8
<i>Total</i>	<i>20</i>

Seguidamente, se incuba en el termociclador, perfil: 94 °C durante 30 s para la desnaturalización, temperatura de anillamiento durante 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. Número de ciclos: 35. Después, se procede a realizar una electroforesis en gel de agarosa para descartar la presencia de dímeros de *primers* o productos inespecíficos.

4. Extracción con fenol y precipitación. A 100 μl de producto de PCR se le añade 100 μl ddH₂O (Vf= 200 μl). A continuación añadimos igual volumen de fenol (200 μl). La mezcla se agita 15 s en vórtex y se centrifuga a 8000 rpm durante 5 min. Se transfiere la fase acuosa (aprox. 180 μl) a un nuevo tubo y se le añade ddH₂O (20 μl), NaCl 5 M (10 μl) y etanol 100 % (600 μl). Se mezcla con ayuda de una micropipeta y se guarda a -20 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se procede a lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70 %, seguido de centrifugación a 14 000 rpm durante 5 min a 4 °C (repetir dos veces). Se deja secar el pellet y se resuspende en ddH₂O.
5. Transcripción *in vitro*. Se realizó mediante el kit *MEGAscript T7 High Yield transcription* (Ambion®). Para ello, a 1 μg de ADN se le añade 8 μl de una mezcla de los cuatro dNTPs adicionados en la misma proporción, 2 μl de buffer 10x, 2 μl de mezcla enzimática y el resto de ddH₂O (Vf= 20 μl).
6. Tratamiento con Turbo DNAsa. Se añade 1 μl de enzima (procedente del mismo kit) y se deja incubar a 37 °C durante 15 min.

7. Extracción con fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol. A 20 µl de muestra, se le añade 115 µl ddH₂O y 15 µl de acetato de amonio (presente también en el kit) (Vf= 150 µl). A continuación se agrega fenol (75 µl) y cloroformo (75 µl) y se centrifuga a 12 000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se añade igual volumen de cloroformo que de sobrenadante. Se vuelve a centrifugar utilizando las mismas condiciones. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se agrega igual volumen de isopropanol. Tras resuspender, se deja enfriar 15 min a -20 °C y se centrifuga a 12 000 g durante 15 min a 4 °C. Después se procede a lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75 % y se centrifuga a 8000 g durante 5 min (2 veces). Se deja secar el pellet durante 5-10 min y se disuelve en ddH₂O.
8. Cuantificación y dilución del estándar ARNc. La cuantificación de las muestras de ARNc se realizó espectrofotométricamente a 260 nm. Las medidas de la concentración se realizaron por duplicado y después se convirtieron a número de moléculas mediante la fórmula:

$$N \text{ (molecules per } \mu\text{l)} = \frac{C \text{ (cRNA) } \mu\text{g}/\mu\text{l}}{K \text{ (fragment size /bp)}} 182.5 \times 10^{13}$$

Figura 2.2: Fórmula utilizada para el cálculo de moléculas en la elaboración de la curva estándar para qRT-PCR. La fórmula nos da el número de moléculas por µl (N), a través de la concentración conocida de ARNc (C), en relación con el tamaño del fragmento (K) y multiplicado por un factor derivado de la masa molecular y la constante de Avogadro. (*Fronhoffs et al., 2002*)

A continuación se hicieron una serie de diluciones de ARNc (10^4 - 10^{11} moléculas).

qRT-PCR

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en el equipo Techne Quantica[®] utilizando como método de detección el fluorocromo *SYBR Green*. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μ l conteniendo:

GoTaq [®] qPCR Master Mix	12.5 μ l
Primer <i>Forward</i> (25 μ M)	0.8 μ l
Primer <i>Reverse</i> (25 μ M)	0.8 μ l
ADNc	3 μ l
ddH ₂ O	7.9 μ l

Las muestras se amplificaron por triplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas y al mismo tiempo que la curva estándar (al menos se utilizaron 6 diluciones). Las condiciones térmicas de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C por 30 s, T_m específica de cada primer por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. El número de ciclos fue de 40. Dado que *SYBR Green* es un fluorocromo de unión inespecífica a la doble hebra de ADN, al final de la fase de amplificación se realizó un análisis de la curva de disociación con objeto de asegurar la amplificación de un único producto de PCR específico.

El resultado de una RT-PCR se visualiza en un gráfico de amplificación donde se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral (*línea Threshold* o umbral) que señala el inicio de la zona de aumento exponencial. El punto de intersección de la curva de amplificación con el umbral establecido se denomina Ct (*Threshold Cycle*). Estos datos son proporcionados por el software del termociclador (en nuestro caso Quansoft[®]) y, junto con la curva estándar, son utilizados para el cálculo del número de moléculas presente en cada muestra.

3.3.5. PCR-Array

Se eligió la tecnología PCR-Array para analizar simultáneamente la expresión de varios genes, ya que se trata de una técnica de detección más sensible que la de los microarrays (Gaj et al., 2008), no necesitando una confirmación posterior de los genes alterados por PCR. El *RT² Profiler PCR-Array* se basa en realizar una RT-PCR cuantitativa en una placa de 96 pocillos, donde cada pocillo contiene a su vez los cebadores de 84 genes de interés que vienen predeterminados por la casa comercial o bien pueden ser elegidos por el usuario, el resto de pocillos hasta 96 son controles de contaminación por DNA genómico y controles endógenos de la expresión (Fig. 2.3). En concreto, los PCR-Arrays utilizados en esta Tesis fueron:

- ***Rat Neurotoxicity RT² Profiler™ PCR Array*** (PARN-096Z; SABiosciences): analiza la expresión de 84 genes clave implicados en diferentes respuestas neurotóxicas inducidas por agentes químicos (*véase Anexo A para más información*).
- ***Rat Dopamine & Serotonin Pathway RT² Profiler™ PCR Array*** (PARN-158Z; SABiosciences): analiza la expresión de 84 genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico (*véase Anexo A*).

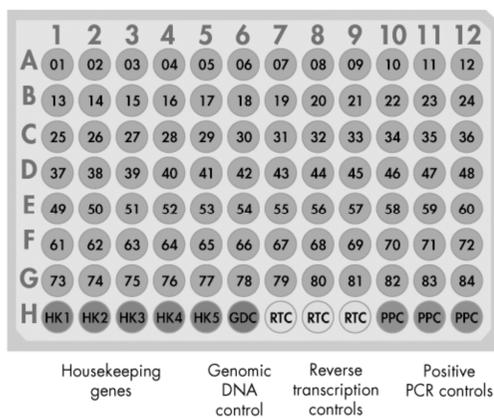


Figura 2.3: Formato *RT² Profiler PCR-array* utilizado. Los pocillos A1-G12 cada uno de ellos contiene cebadores para los genes de interés. Los pocillos H1-H5 contienen genes *housekeeping* para normalizar los datos (HK1-5). El pocillo H6 contiene un control de ADN genómico (GDC). Los pocillos H7-H9 contienen réplicas de controles de la retrotranscripción (RTC). Los pocillos H10-H12 contienen réplicas de controles positivos de PCR (PPC).

PROCEDIMIENTO

Se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial, utilizando el kit *RT² First Strand* (SABiosciences). Brevemente, las muestras de ARN son tratadas con buffer conteniendo DNAsa para eliminar el ADN genómico contaminante, mediante incubación durante 5 min a 42 °C e inmediatamente se colocan en hielo al menos durante 1 min. Después, se lleva a cabo la retrotranscripción, preparando una mezcla que contiene 5x Buffer BC3 (4 µl), Control P2 (1 µl), RE3 Reverse Transcriptase Mix (2 µl) y ddH₂O (3 µl), hasta un Vf por reacción de 10 µl. Se añade 10 µl de la muestra anteriormente tratada y se incuba 42 °C durante 15 min, seguido de 5 min a 95 °C. Por último, añadimos 91 µl de ddH₂O a cada reacción.

Una vez realizada la retrotranscripción, a las muestras resultantes se les añade *RT² SYBR Green Master mix* (SABiosciences), de acuerdo con las instrucciones facilitadas por el fabricante. La mezcla es alicuotada en cada pocillo de la placa de arrays (25 µl), que contiene sets de *primers* específicos para un gen determinado.

El perfil de RT-PCR para todos los casos fue: desnaturalización a 95 °C durante 15 s, anilleamiento de *primers* y extensión a 60 °C durante 60 s. El número de ciclos fue de 40 en todos los casos. Al final de la fase de amplificación, se realizó un análisis de la curva de disociación para confirmar que un único producto de PCR fue detectado por el fluorocromo *SYBR Green*.

3.4. Análisis de proteínas

3.4.1. Extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares

Extracción

Se realizó con el kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial.

***NE-PER Nuclear and Cytoplasmic
Extraction Reagents:
Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I)
Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II)
Nuclear Extraction Reagent (NER)***

- En un tubo eppendorf (2 ml) se introduce 20-100 mg de tejido, añadiendo a continuación el reactivo CER I e inhibidor de proteasas, en las proporciones adecuadas (véase Tabla 2.2).
- Después de incubar la mezcla en hielo durante 10 min se añade el reactivo CER II.
- Se agita en vórtex 5 s a la máxima velocidad y se deja en hielo durante 1 min (repetir paso).
- La muestra se centrifuga a 1600 g durante 5 min a 15 °C.
- Se transfiere inmediatamente el sobrenadante (extracto citoplasmático) a un nuevo tubo.
- El pellet es resuspendido añadiendo reactivo NER e inhibidor de proteasas.
- Se agita en vórtex a la mayor velocidad por 15 s, se coloca la muestra en hielo y se vuelve a agitar otros 15 s cada 10 min, hasta un total de 40 min.
- Se centrifuga a 16 000 g, 10 min a 15 °C.

- Inmediatamente se transfiere el sobrenadante (fracción nuclear) a un nuevo tubo y se guarda a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Peso del tejido (mg)	CER I (μl)	CER II (μl)	NER (μl)
20	200	11	100
40	400	22	200
80	800	44	400
100	1000	55	500

Tabla 2.2: Volúmenes de los diferentes reactivos utilizados en la extracción de proteínas según la cantidad de tejido de partida. *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit* (Thermo Scientific)

Cuantificación

Se realizó mediante el ensayo *Bio-Rad DC Protein Assay*.

Reactivos:

Bio-Rad DCTM Protein Assay Reagent A

Bio-Rad DCTM Protein Assay Reagent B

Bio-Rad DCTM Protein Assay Reagent S

- Se hace una mezcla añadiendo $20\text{ }\mu\text{l}$ de reactivo S por cada mililitro de reactivo A.
- Se preparan de 3-5 diluciones de una proteína estándar en una concentración de $0,2\text{ mg/ml}$ - $1,5\text{ mg/ml}$ (en nuestro caso, la proteína utilizada fue albúmina).
- De cada muestra a cuantificar se preparan una serie de diluciones por triplicado.
- En una placa se añaden $5\text{ }\mu\text{l}$ de muestra en cada pocillo a utilizar y a continuación se adicionan $25\text{ }\mu\text{l}$ de reactivo A+S.

- Se añade 200 μ l de reactivo B y se somete la placa a agitación suave.
- Transcurridos 15 min, se determina la absorbancia mediante espectrofotómetro usando una longitud de onda de 750 nm.

3.4.2. Western blot

Los experimentos de Western blot se utilizaron para la detección de la expresión proteica de 5 α -R1, 5 α -R2, 5 α -R3, aromatasas, Tph1 y Tph2 en tejido prostático y/o cerebral.

Preparación de las muestras

Una vez cuantificadas las muestras, se calcula la concentración de proteína que se cargará en cada pocillo del gel (35-50 μ g de proteína).

2X Laemmli Sample Buffer: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6,8 25 % glicerol 2 % SDS 0,01 % Azul de bromofenol

A continuación se prepara el tampón de carga, para ello adicionamos 50 μ l de 2-mercaptoetanol por 950 μ l de *2X Laemmli Sample Buffer*. El mercaptoetanol es un agente reductor que rompe los puentes disulfuro de las proteínas, mientras que el SDS desnatura la proteína en su estructura primaria y la recubre de cargas negativas.

Se diluye la muestra con tampón de carga (1:1). El volumen total a cargar será de 30 μ l. A continuación, la muestra es agitada en vórtex, pulso en microcentrífuga y se calienta a 95 $^{\circ}$ C durante 5 min. Esto garantiza dos cosas: la desnaturación de las proteínas y la unión del SDS a las proteínas desnaturadas. Inmediatamente se colocan las muestras en hielo.

Electroforesis

El método de electroforesis más usado para proteínas se conoce como SDS-PAGE, “electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS” (*SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*), descrito por Laemmli (1970). El gel de poliacrilamida se coloca en un compartimento que contiene el tampón de migración. Los lisados proteicos y el patrón de peso molecular se cargan en las calles del gel y se aplica un campo eléctrico que provoca el movimiento de las proteínas hacia el polo positivo. Al haberse tratado las proteínas con SDS (que las dota de cargas negativas), las cargas endógenas de las mismas son despreciables. Las proteínas de menor tamaño quedan menos retenidas en la matriz del gel y por tanto migran más rápidamente, obteniendo al final una separación por peso molecular.

La electroforesis se llevó a cabo con un equipo Mini-Protean 3 de BioRad. Los geles utilizados fueron Mini-PROTEAN TGX Precast Gels al 12 %.

PROCEDIMIENTO

Tras preparar el montaje que contenía el gel, éste fue introducido en una cubeta de electroforesis con tampón de migración (*running buffer*) 1x. La solución de muestra, junto con el tampón de carga, fue centrifugada en una microcentrífuga durante

Tampón de migración:
10X Tris/Glycine /SDS
Buffer:
25 mM Tris
192 mM glicina
0.1% SDS, pH 8.3

1 min y cargada en cada pocillo (30 μ l). Se utilizó un patrón de peso molecular como marcador. Una vez cargadas todas las muestras, se puso en funcionamiento el sistema de electroforesis, primero a 80 V hasta que las muestras salieron de sus pocillos y luego se aumentó el voltaje a 120 V durante aproximadamente 1 h (hasta que alcanzaron el final del gel).

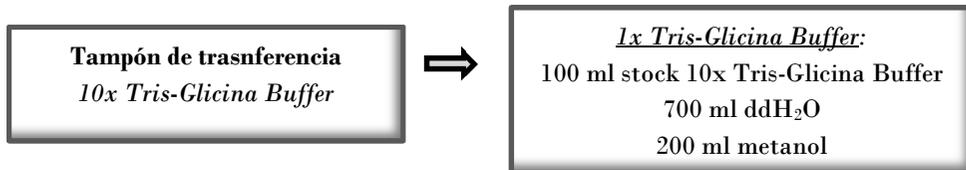
Electrotransferencia

Los geles son muy frágiles y difíciles de manipular, por lo tanto se procede a traspasar las proteínas desde el gel a una superficie más sólida, una membrana. Para ello, se pone el gel junto a la membrana y se aplica un campo eléctrico, basándose en la carga negativa de las proteínas proporcionada por el SDS unido a ellas, de forma que éstas salen del gel conforme migran al polo positivo y quedan retenidas en la membrana.

El método de transferencia elegido fue en medio húmedo. En él, el gel y la membrana se intercalan y fijan firmemente entre finas esponjas y papel absorbente. Este montaje “sándwich” se sumerge en un compartimento que contiene el tampón de transferencia donde se aplica, a continuación, la corriente eléctrica.

PROCEDIMIENTO

Se prepara el buffer de transferencia y se guarda a 4 °C.



A continuación, procedemos a sumergir las dos esponjas y seis trozos de papel de filtro (*Whatman papers*), de igual tamaño que el gel, en tampón de transferencia. Se corta la membrana de PVDF en el tamaño adecuado y se sumerge durante 1 min en metanol para activarla (con agitación suave) e inmediatamente en tampón de transferencia. Una vez terminada la electroforesis se coloca el gel en tampón de transferencia frío durante 3-5 min y se procede a realizar el montaje de la transferencia tal y como se muestra en la Figura 2.4.

Por último, el casete se fija en el soporte que lleva los electrodos y éste en la cubeta de transferencia. A continuación se coloca un bloque de hielo y se llena la cubeta por completo con tampón de transferencia frío. La transferencia se realiza durante 1,15 h a 4 °C, a un voltaje constante de 100 V.

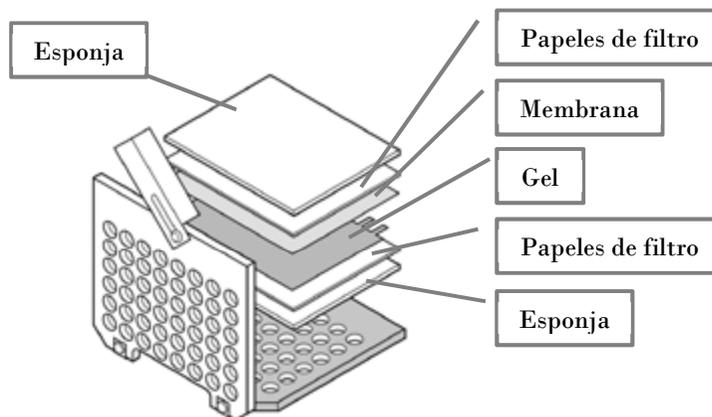


Figura 2.4: Montaje de la transferencia (western blot). Sobre la cara oscura del recipiente (“casete”) se coloca primero una de las esponjas, a continuación 3 trozos de papel de filtro, el gel, la membrana, otros 3 trozos de papel de filtro y por último otra esponja. *Imagen traducida de “Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Instruction manual” (BioRad)*

Incubación con anticuerpos

Después de la transferencia es importante identificar el lado de la membrana que estuvo en contacto con el gel. En cada uno de los pasos siguientes, este lado debe estar hacia arriba. Antes de la incubación con los anticuerpos correspondientes, es esencial bloquear los espacios de la membrana que no están ocupados por proteínas para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos.

a) Bloqueo de la membrana

Se introduce la membrana en un recipiente que contenga tampón bloqueante (preparado en el momento) durante 1 h a TA, con agitación constante. Después hay que realizar 3 lavados con tampón de lavado, cada uno de 10 min, en agitación constante.

Tampón de lavado
0.1% Tween-20 en PBS

Tampón Bloqueante (5%)
2.5 g leche seca en 50 ml PBS
0.1% tween-20

b) Incubación con el Anticuerpo Primario

La membrana fue incubada con anticuerpo primario toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, para eliminar el exceso de anticuerpo que podría ocasionar un alto ruido de fondo, se lavó la membrana con tampón de lavado tres veces en un agitador (10 min cada vez). Las diluciones empleadas para cada anticuerpo se muestran en la Tabla 2.3.

c) Incubación con el anticuerpo secundario

La incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa se realizó en agitador durante 1 h a TA. El exceso de anticuerpo fue eliminado mediante lavado de la membrana durante 10 min, tres veces, en agitación.

Tabla 2.3. Anticuerpos Primarios

5 α -R1	cabra anti-5 α -R1 (Abcam ab110123)	1:500
5 α -R2	conejo anti-5 α -R2 (Santa Cruz sc-20659)	1:100
5 α -R3	conejo anti-5 α -R3 (Novus Biologicals NBP1-69612)	1:1000
Aromatasa	ratón anti-aromatase (ABD serotec MCA2077S)	1:200
Tph2	conejo anti-TPH-2 (Thermo Scientific PA1-778)	1:400
B-Actina	ratón anti b-actina (Thermo Scientific BA3R)	1:1000

Revelado

Para el proceso de revelado se utilizó *ImmunoStarTM Western CTM kit* (Bio-Rad), basado en una reacción de quimioluminiscencia. En presencia de peróxido de hidrógeno, la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), que está conjugado al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación de luminol. Cuando el luminol oxidado vuelve a su estado original emite una señal luminosa que es registrada por el sistema.

El proceso de revelado fue realizado en la “Unidad de Apoyo a la Investigación” del Hospital Clínico (Granada, España), con el aparato *Molecular Imager ChemiDoc XRS System* (BioRad), utilizando el software Quantity One®. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante análisis densitométrico de las bandas, utilizando para ello el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/links.html>).

3.4.3. Inmunohistoquímica

Los ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) fueron realizados por personal perteneciente al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina (Universidad de Granada) y al Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER) (Granada).

Las expresiones de 5 α -R1, 5 α -R2 y aromatasa fueron determinadas por IHQ en secciones de lóbulo ventral de próstata de rata fijadas en formalina y embebidas en parafina. Las secciones de tejido fueron tratadas durante 20 min a 98 °C en buffer EDTA (1 mM, pH 8) en un módulo PT (Thermo Fisher), para el desparafinado, hidratación y desenmascaramiento antigénico simultáneo. Las inmuntinciones fueron realizadas automáticamente en un inmunoteñidor modelo Autostainer 480 (Thermo Fisher) con anticuerpos comerciales contra 5 α -R1 (policlonal de cabra, sc-20658) y 5 α -R2 (conejo policlonal sc-20659) (Santa

Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz Ca, USA) a una dilución 1:25 y contra aromatasa (*mouse monoclonal clone* H4, MCA2077S) (AbD Serotec, Oxford, UK), a una dilución 1:50.

La inmunotinción se estableció al añadir el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) que es sustrato de la peroxidasa (HRP) presente en los anticuerpos secundarios. Una tinción citoplasmática negra-marrón y/o nuclear fue considerada positiva. El criterio para la valoración de la intensidad fue: 0 para ausencia de tinción; 1+: tinción débil; 2+: tinción moderada y 3+: tinción fuerte.

3.5. Análisis estadísticos

Para establecer comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba t-Student y entre tres grupos el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Las comparaciones estadísticas entre género y tratamiento (*Estudio 3*) fueron realizadas mediante ANOVA de dos vías. Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene fueron usados para evaluar los datos en términos de normalidad y homogeneidad, respectivamente. Para los datos que no cumplieron el criterio de homogeneidad de la varianza se realizó el análisis de Brown-Forsythe. Cuando se detectaron diferencias significativas entre grupos, se realizaron los análisis a posteriori apropiados (Tukey, Bonferroni; o Games-Howell cuando la varianza no fue homogénea).

En todos los casos la significancia estadística se evaluó con los programas SPSS versión 20 y STATA versión 10. Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar. El nivel de significación estadística se estableció en $P \leq 0,05$.

El análisis estadístico de los datos de PCR arrays fue realizado a través de una herramienta online proporcionada por la casa comercial

(<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>), donde se introducen los valores de Ct obtenidos para cada gen y tratamiento. El programa utiliza el test t-Student y el método $\Delta\Delta\text{Ct}$, en el que se comparan directamente los Cts del gen testado y gen de referencia (*housekeeping*) (ΔCt) en cada muestra y, posteriormente, se comparan los ΔCt de la muestra experimental con respecto a la muestra control ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Al final nos proporciona el número de veces de inducción de la expresión de un gen (*fold-change*), definido como $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$. La corrección para comparaciones múltiples fue llevada a cabo usando el método FDR (*tasa de descubrimientos falsos*) de Benjamini y Hochberg (1995). Las modificaciones de los niveles de transcritos fueron consideradas significativas si cumplían dos criterios: (a) un valor de P corregido ≤ 0.05 y (b) un *fold-change* ≥ 2 . Valores de Ct mayores que 33 fueron excluidos de los análisis.

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo III

I. *Efectos de la exposición adulta a BPA sobre 5 α -R y aromatasa en próstata de ratas intactas*

En los últimos años varios EDCs, entre ellos el BPA, han sido relacionados con una variedad de alteraciones en órganos sexuales y reproductivos, incluyendo la glándula prostática. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos efectos permanecen poco claros. Dado que los andrógenos y los estrógenos son factores importantes en la fisiopatología prostática, nuestro objetivo fue examinar, en la próstata ventral de rata, los efectos de la exposición adulta a BPA sobre la expresión de 5 α -R (tipo 1, 2 y 3) y aromatasa, enzimas clave en la biosíntesis de DHT y E2, respectivamente.

Diseño experimental

Las ratas macho adultas (260-300 g) fueron inyectadas vía subcutánea (s.c.) durante 4 días con 0,2 ml de aceite de sésamo conteniendo BPA (>90 % pureza) a dosis de 25, 50, 300 o 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, o con aceite de sésamo solo (grupo control). Todos los grupos comprendieron 8 animales.

A los 30 min de la última inyección, las ratas fueron eutanizadas por decapitación y las próstatas fueron extraídas y congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos heparinizados y centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min con objeto de separar el plasma. Éste fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización para el análisis hormonal correspondiente (T y E2).

Las determinaciones llevadas a cabo en el tejido prostático fueron: a) cuantificación absoluta de los niveles de ARNm de los isoenzimas 5α -R (5α -R1, 5α -R2, 5α -R3) y de la enzima aromatasa, mediante qRT-PCR; b) análisis inmunohistoquímico (5α -R1, 5α -R2 y aromatasa); c) análisis de la expresión proteica mediante western blot para la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (equivalente a la IDT establecida). El diseño experimental se ilustra en la Figura 3.1.

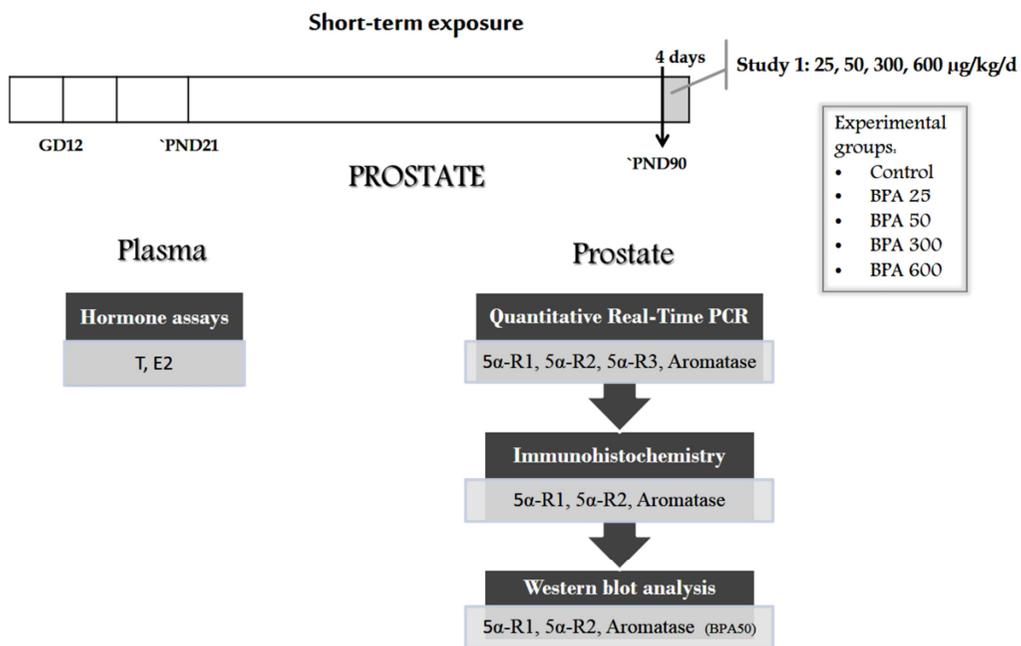


Figure 3.1: Experimental design Study I: Effects of adult exposure to BPA on 5α -Reductase (5α -R) isozymes and aromatase in prostate of rats. Adult rats were subcutaneously injected for four days with BPA (25, 50, 300, or 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) dissolved in vehicle. Quantitative RT-PCR, western blot and immunohistochemical analyses were performed to examine in rat ventral prostate the effects of adult exposure to BPA on 5α -R isozymes (types 1, 2, and 3) and aromatase, key enzymes in the biosynthesis of dihydrotestosterone and estradiol (E2), respectively. Plasma levels of testosterone (T) and E2 were also measured.

Resultados

- **Evaluación del análisis hormonal de sangre (niveles de T y E2)**

La Figura 3.2 representa los niveles plasmáticos de T y E2, así como el ratio E2/T, obtenidos en ratas tratadas con BPA a diferentes dosis. Como se puede observar, los niveles plasmáticos de T disminuyeron significativamente tras la administración de BPA, en comparación con las ratas control (Fig. 3.2, panel A), siendo este descenso más pronunciado en el grupo que recibió la dosis mayor de BPA (600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$). Por su parte, los niveles de E2 incrementaron significativamente en todos los grupos tratados con BPA (Fig. 3.2, panel B); no se observó en cambio diferencias entre las dosis administradas. Como consecuencia, un incremento en el ratio plasmático de E2/T fue obtenido tras la exposición a BPA (Fig. 3.2, panel C).

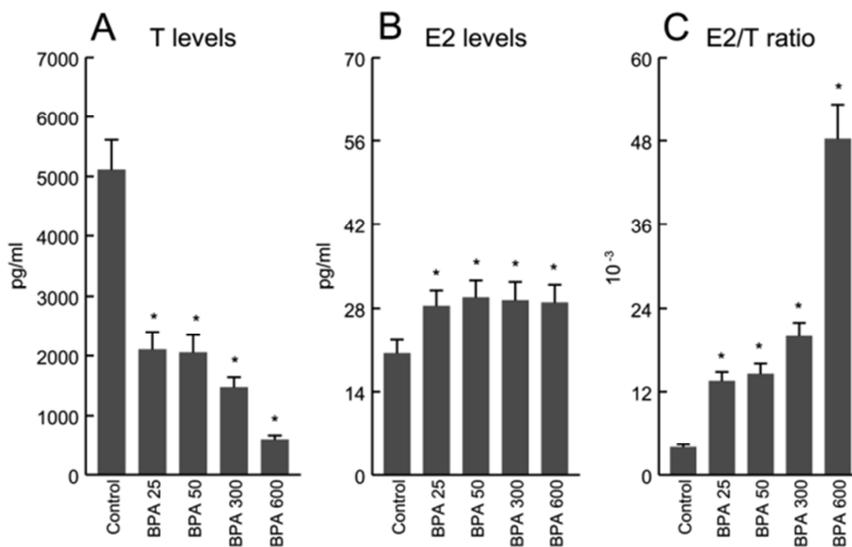


Figure 3.2: Plasma testosterone (T) concentration (panel A), estradiol (E2) concentration (panel B), and estradiol/testosterone (E2/T) ratio (panel C) in control and BPA-treated rats at doses of 25, 50, 300, or 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ for 4 days. * $P < 0.01$ vs. Control animals.

- **Regulación transcripcional de las isoenzimas 5α -R y aromatasa**

En comparación con los controles, los niveles de ARNm de 5α -R1 fueron disminuidos significativamente en todos los grupos tratados con BPA (Fig. 3.3, panel A), sin diferencias significativas entre ellos. BPA también disminuyó la transcripción de 5α -R2 en todos los grupos expuestos, en comparación con los controles, obteniendo un mayor descenso (sobre 12-veces *vs* controles) en los grupos que recibieron BPA a dosis de 300 y 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (Fig. 3.3, panel B). Por el contrario, la administración de BPA resultó en un incremento de los niveles de ARNm de 5α -R3, sin diferencias significativas entre las dosis administradas (Fig. 3.3, panel C). Asimismo, los niveles de ARNm de la enzima aromatasa incrementó significativamente en todos los grupos tratados con BPA, sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 3.3, panel D).

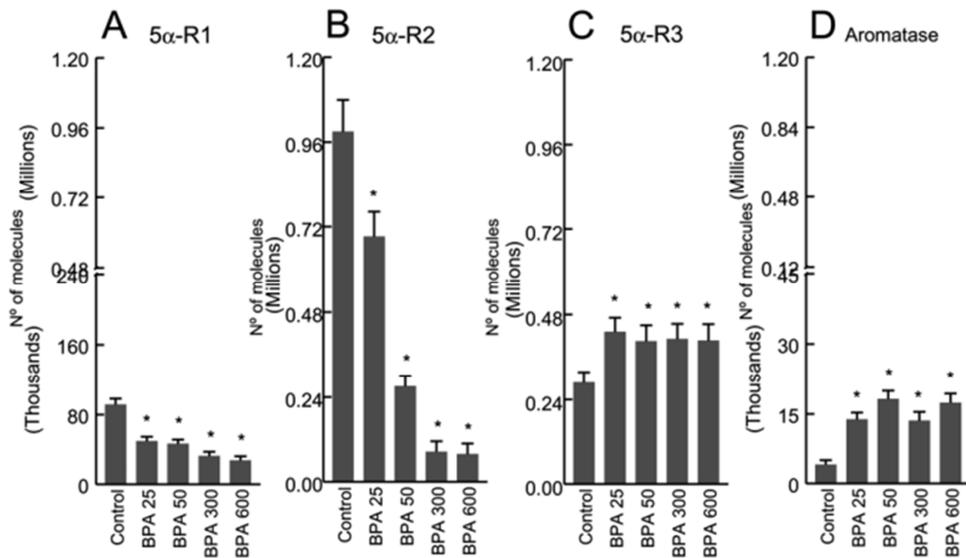


Figure 3.3: mRNA levels of 5α -Reductase type 1 (5α -R1) (panel A), 5α -Reductase type 2 (5α -R2) (panel B), 5α -Reductase type 3 (5α -R3) (panel C) and aromatase (panel D) in prostate of control and BPA-treated rats at doses of 25, 50, 300, or 600 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{d}$ for 4 days. $P < 0.01$ vs. Control animals.

- **Análisis del perfil de expresión proteica**

Análisis Inmunohistoquímico

La examinación microscópica del tejido prostático ventral puso de manifiesto la presencia de 5α -R1 en células epiteliales, principalmente en el núcleo, mientras que 5α -R2 fue detectada en el citoplasma de ambas células, epiteliales y estromales. No obstante, una tinción adicional nuclear de 5α -R2 (es decir, indicativa de la presencia de esta isoenzima en el núcleo) fue observada en las ratas tratadas con BPA. La expresión tanto de 5α -R1 como de 5α -R2 fue más baja en los grupos tratados con BPA en comparación a las ratas control. Desafortunadamente, en esa fecha no se disponía de un anticuerpo comercial para 5α -R3, con lo cual no se pudo confirmar su expresión proteica, ni su modificación por los tratamientos con BPA. Por otro lado, aromatasa fue detectada principalmente en el citoplasma de las células epiteliales, siendo más alta en las ratas tratadas con BPA, con excepción de la dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, que no mostró diferencias significativas respecto a los controles (véase Figura 3.4).

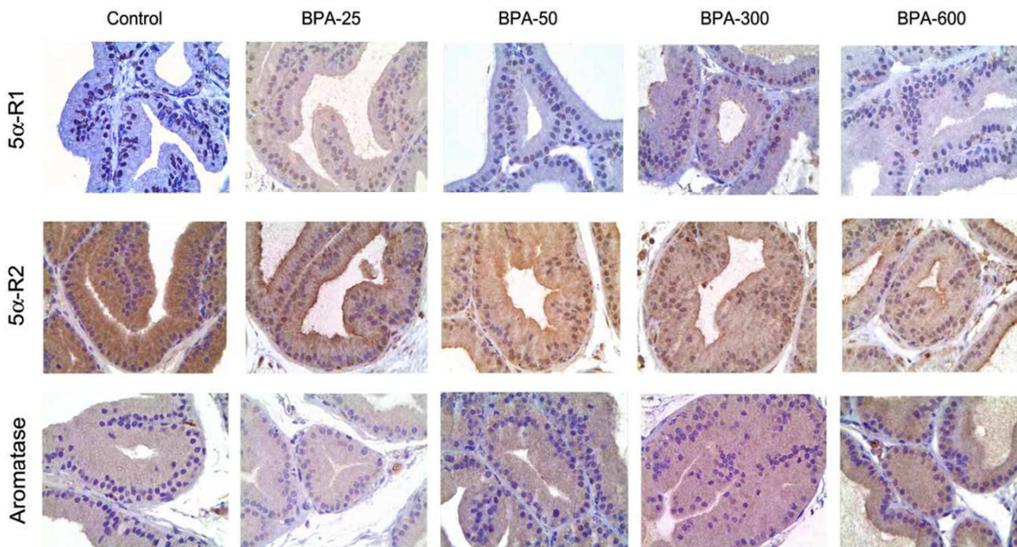


Figure 3.4: Immunohistochemical staining of 5α -Reductase type 1 (5α -R1), 5α -Reductase type 2 (5α -R2) and Aromatase in prostate of control and BPA-treated rats at doses of 25, 50, 300, or 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ for 4 days. Magnification $\times 400$.

Western Blot

Las modificaciones de los niveles proteicos de 5α -R1, 5α -R2 y aromatasa por BPA fueron confirmadas mediante la técnica de western blot para la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (equivalente a la IDT). Los resultados se muestran en la Figura. 3.5.

Como se puede observar, respecto a los controles la expresión de 5α -R1 y 5α -R2 fue más baja después del tratamiento con BPA (panel A y panel B, respectivamente). Mientras que aromatasa aumentó su expresión proteica tras la exposición a BPA, en comparación con los controles (panel C).

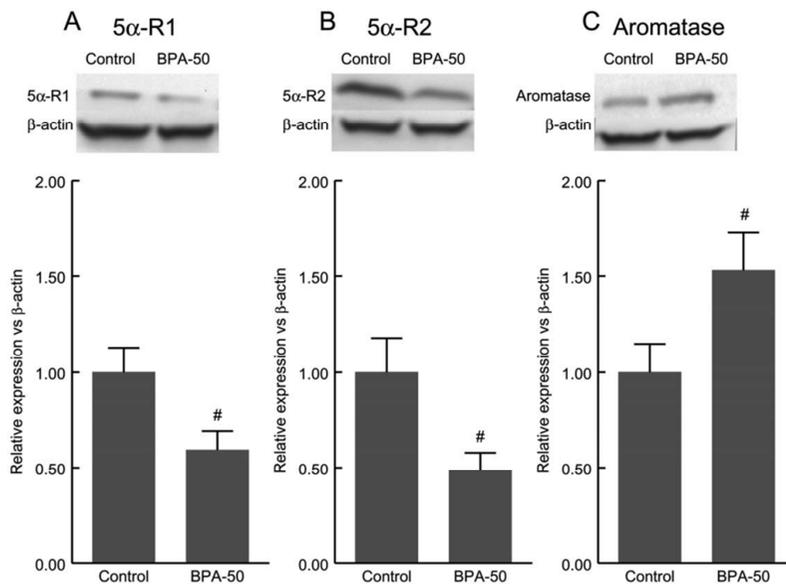


Figure 3.5: Western blots for the detection of 5α -Reductase type 1 (5α -R1) (panel A), 5α -Reductase type 2 (5α -R2) (panel B) and aromatase (panel C) in prostate of control and BPA-treated rats at tolerable daily intake (TDI) dose of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ for 4 days. Equal loading of protein was determined using an anti β -actin antibody. A representative image of three independent experiments is shown for each blot. Normalization for loading differences was achieved by dividing the densitometry values for individual bands by the densitometry values for β -actin in the same lane. Data represent the mean of three independent experiments. [#] $P < 0.05$ vs. Control animals.

Discusión

El presente estudio constituye la primera evidencia de que la exposición adulta a BPA modifica la expresión de las isoenzimas 5α -R y aromatasa en la próstata de rata, enzimas clave en la fisiopatología prostática. Estos efectos fueron observados tras la exposición aguda a BPA y a niveles comparables, e incluso más bajos, que la IDT para este compuesto.

Los resultados obtenidos demostraron que la administración aguda de BPA a ratas adultas produce una disminución de los niveles de ARNm y proteicos de las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2. En la próstata, 5α -R1 y 5α -R2 son reguladas positivamente por T, tal y como trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación (Torres et al., 2003a) y de otros autores (Li et al., 2011b) han puesto de manifiesto. Consistente con los resultados del estudio, BPA podría disminuir estas isoenzimas a través de la reducción de los niveles circulantes de T, ya sea: a) disminuyendo la secreción de la hormona luteinizante (LH), b) interfiriendo con el receptor de LH y/o c) inhibiendo enzimas biosintéticas de T (Akingbemi et al., 2004; Ye et al., 2011). BPA también podría ejercer estos efectos a través del RA (Lee et al., 2003; Ramos et al., 2001; Teng et al., 2013).

La localización de 5α -R2 fue principalmente citoplasmática, de acuerdo con Span y cols. (1996), aunque una tinción adicional nuclear en ratas tratadas con BPA fue observada. A este respecto, Thomas y cols. (2005) observaron que en CaP recurrente 5α -R2 era predominantemente citoplasmática, pero también observaron una tinción adicional en el núcleo. No obstante, el significado funcional de la localización nuclear de 5α -R2 aún se desconoce.

Las ratas tratadas con BPA mostraron también un incremento en la transcripción de 5α -R3 (sugerido como biomarcador de malignidad) en asociación con una disminución de los niveles plasmáticos de T. Interesantemente, Li y cols. (2011b) encontraron una transición desde

regulación positiva a negativa de 5α -R3 por andrógenos en el desarrollo y progresión de CaP. Aunque nuestros resultados apuntan en esta línea, se hacen necesarios más estudios para poder asociar los datos obtenidos a nivel molecular con alteraciones en la fisiología prostática relacionadas con enfermedad (p.e. estudios de exposición crónica).

Si bien no hay duda de que los andrógenos están implicados en la enfermedad prostática, otros factores también podrían estar involucrados, dado que la prevalencia de patologías prostáticas incrementa con la edad, cuando los niveles plasmáticos de T declinan. A este respecto y tal y como se mencionó anteriormente, los estrógenos podrían jugar también un papel importante en predisponer y/o causar enfermedades prostáticas. Numerosos estudios epidemiológicos han puesto en evidencia una relación entre niveles circulantes de estrógenos elevados, o un incremento en el ratio E2/T, y enfermedad prostática, incluyendo CaP (Ho and Habib, 2011). Interesantemente, en este estudio la administración de BPA resultó en un incremento de los niveles plasmáticos de E2 y una disminución de T y, por consiguiente, un ratio E2/T mayor.

Sí los niveles intraprostáticos de E2 están implicados en CaP (Ricke et al., 2008), la enzima implicada en su síntesis (aromatasa) podría jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Los resultados presentes demostraron que la exposición a BPA incrementa la expresión de aromatasa en la próstata de ratas adultas. No obstante, no hubo diferencias significativas en la expresión proteica de esta enzima a la dosis menor administrada. Este hecho podría ser debido a algún mecanismo de defensa post-transcripcional para evitar una sobreexpresión del gen que codifica para aromatasa (CYP19A2) a dosis bajas de BPA.

A nuestro conocimiento, se trata del primer estudio en demostrar los efectos de BPA sobre la enzima aromatasa en próstata de rata adulta. Arase y cols. (2011) indicaron que la exposición fetal a una dosis baja de BPA

incrementa E2 *in situ*, así como los niveles de ARNm y actividad enzimática de aromatasa en el seno urogenital de ratón (desde el cual la próstata se forma). Sin embargo, estudios *in vitro*, llevados a cabo en otros tipos celulares, obtuvieron una disminución de los niveles de aromatasa tras la administración de BPA (Kamat et al., 2002; Kwintkiewicz et al., 2010). Diferencias entre el periodo de exposición, animal, tejido, sistema endocrino y/o estudios *in vitro* frente a *in vivo* deberían ser tenidos en cuenta.

Los resultados aquí presentados podrían ofrecer nuevos indicios sobre el papel del BPA en el desarrollo de enfermedades prostáticas y podrían ser de un gran valor en el estudio del riesgo de patología prostática asociada con la exposición adulta a BPA.

II. Efectos de la exposición adulta a BPA sobre 5α -R1 y 5α -R2 en próstata de ratas castradas

Nuestros resultados anteriores indican que el BPA disminuye la expresión de 5α -R1 y 5α -R2 en la próstata ventral de rata, pero también los niveles plasmáticos de T. Por lo tanto, no está claro si BPA ejerce este efecto a través de la disminución de los niveles circulantes de T o por otros mecanismos. En el presente estudio examinamos los efectos de la administración aguda a BPA sobre los niveles de ARNm de 5α -R1 y 5α -R2 en la próstata de ratas adultas castradas suplementadas con T, manteniendo, de este modo, niveles circulantes de T constantes.

Diseño experimental

Para este estudio se utilizó una dosis de BPA más baja (25 μ g/kg/d) y otra más alta (300 μ g/kg/d) que la IDT, dado que las acciones ejercidas por los EDCs pueden ser diferentes, e incluso opuestas, dependiendo de la dosis utilizada (Vandenberg et al., 2006; Welshons et al., 2003). Los grupos experimentales estudiados fueron: ratas castradas (C), ratas castradas tratadas con T (C+T), ratas castradas tratadas con T y 25 μ g BPA/kg/d (C+T+BPA25), y ratas castradas tratadas con T y 300 μ g BPA/kg/d (C+T+BPA300).

Las ratas fueron sometidas a orquidectomía bilateral bajo anestesia con equitensina. Una semana más tarde, con excepción del grupo C, todas las ratas fueron s.c. administradas con 500 μ g/d de propionato de T durante cuatro días. A los 30 min antes de la administración de T, las ratas agrupadas en C+T+BPA25 y C+T+BPA300 recibieron vía s.c. BPA a dosis de 25 μ g/kg/d y

300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, respectivamente, durante cuatro días. Por su parte, el grupo C fue administrado sólo con aceite de sésamo (vehículo). A los 30 min después de la última inyección de T, las ratas fueron eutanizadas por decapitación. El protocolo seguido fue el descrito por Leranth y cols. (2008), añadiendo la dosis de BPA de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$.

Los niveles de ARNm de los isoenzimas $5\alpha\text{-R1}$ y $5\alpha\text{-R2}$ fueron cuantificados por PCR a tiempo real. También se determinaron los niveles plasmáticos de T y DHT. El diseño experimental se muestra en la Figura 3.6.

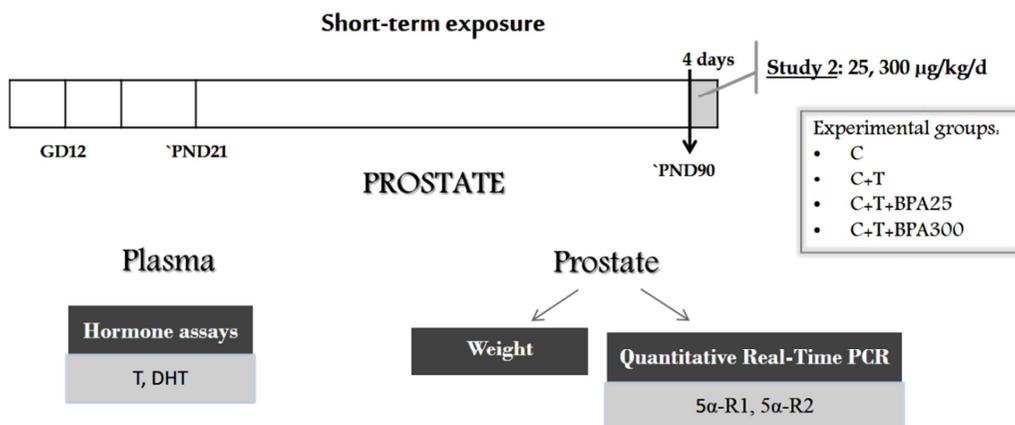


Figure 3.6: Experimental design Study 2: Effects of adult exposure to BPA on 5α -Reductase isozymes (5α -R types 1 and 2) in prostate of castrated rats. The experimental groups studied were castrated rats (C), castrated rats plus T (C+T), castrated rats plus T plus BPA (25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) (C+T+BPA25), and castrated rats plus T plus BPA (300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) (C+T+BPA300). With the exception of group C, all rats were subcutaneously (s.c.) daily injected with 500 μg of testosterone (T) propionate for four days. 30 min before the administration of T, the rats grouped in C+T+BPA25 and C+T+BPA300 were s.c. daily injected with BPA at doses of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, respectively, for four days. Group C was s.c. daily injected with oil vehicle alone. mRNA levels were measured by absolute quantitative RT-PCR. Plasma T and dihydrotestosterone (DHT) levels were also quantified as well as prostate weights.

Resultados

- **Evaluación del análisis hormonal de sangre (niveles de T y DHT)**

La Figura 3.7 representa los niveles plasmáticos de T y DHT obtenidos en ratas castradas tratadas con vehículo o BPA a diferentes dosis. Como se puede observar y, de acuerdo con lo esperado, la castración disminuyó drásticamente los niveles de dichas hormonas en sangre, mientras que la administración de T supuso la restauración de dichos niveles (véase Fig. 3.2, niveles plasmáticos de T en ratas control intactas). Los grupos tratados con BPA a dosis de 25 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ presentaron niveles plasmáticos de T similares y sin diferencias significativas en comparación con las ratas castradas tratadas con T (Fig. 4.2, panel A). Por otro lado, ambos grupos tratados con BPA tuvieron niveles plasmáticos de DHT más bajos, en comparación con ratas castradas tratadas con T, sin diferencias significativas entre ambas dosis de BPA (Fig. 3.7, panel B).

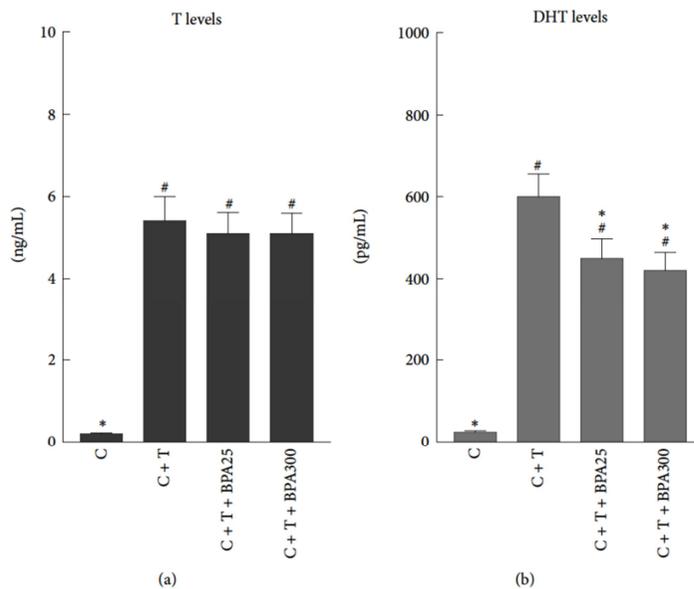


Figure 3.7: Plasma testosterone (T) levels (a) and plasma dihydrotestosterone (DHT) levels (b) in castrated rats (C), castrated rats supplemented with T (C+T), and castrated rats supplemented with T plus BPA at doses of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (C+T+BPA25) and 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (C+T+BPA300) for 4 days.

$P < 0.05$ or less versus C group. * $p < 0.05$ or less versus C + T group.

- **Regulación transcripcional de 5α -R1 y 5α -R2**

Como se puede observar en la Figura 3.8. (a), los niveles de ARNm de 5α -R1 fueron significativamente mayores en todos los grupos tratados con T, en comparación con las ratas orquidectomizadas no tratadas. Ambos grupos tratados con BPA a dosis de 25 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ tuvieron una disminución significativa de los niveles de ARNm de 5α -R1 en comparación con las ratas castradas tratadas con T. Hubo diferencias significativas entre las dosis administradas.

Como se puede muestra en la Figura 3.8. (b), después del tratamiento con T se produjo un aumento significativo en la expresión de ARNm de 5α -R2, en comparación con las ratas castradas sin tratamiento. No obstante, los grupos tratados previamente con BPA tuvieron un descenso significativo de los niveles de transcritos de 5α -R2, en comparación con las ratas castradas tratadas con T. Hubo diferencias significativas entre las dosis administradas, obteniéndose el mayor descenso en las ratas tratadas con 300 μg BPA/kg/d.

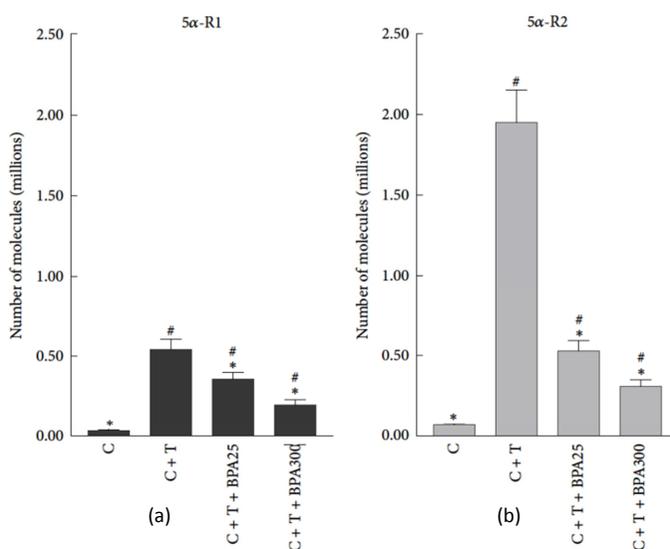


Figure 3.8: mRNA levels of 5α -R1 (a) and 5α -R2 (b) in prostate of castrated rats (C), castrated rats supplemented with T (C+T), and castrated rats supplemented with T plus BPA at doses of 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{d}$ (C+T+BPA25) and 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{d}$ (C+T+BPA300) for 4 days. # $P < 0.05$ or less vs C. * $P < 0.05$ or less vs C+T.

Por otro lado, BPA produjo una mayor reducción de los niveles de ARNm de 5α -R2 ($P < 0.01$) que la observada para 5α -R1 ($P < 0.05$).

- **Implicaciones sobre el peso prostático**

Tal y como puede observarse en la Figura 3.9, todos los grupos tratados con T tuvieron un incremento significativo en el peso de la próstata ventral, en comparación con ratas castradas sin tratamiento con T. Ambos grupos tratados con BPA mostraron un peso prostático similar, sin diferencias significativas comparado con las ratas castradas tratadas con T.

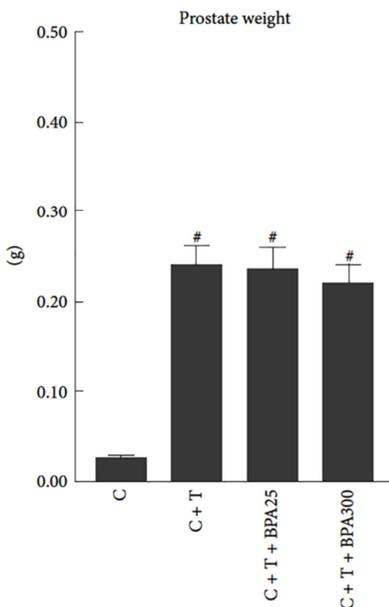


Figure 3.9: Prostate weight of castrated rats (C), castrated rats supplemented with T (C+T), and castrated rats supplemented with T plus BPA at doses of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (C+T+BPA25) and 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (C+T+BPA300) for 4 days. # $P < 0.05$ or less versus C group.

Discusión

La DHT, sintetizada en la glándula prostática a partir de la T circulante por la enzima 5α -R, es el principal andrógeno responsable del desarrollo y función normal de este órgano. Para llevar a cabo estas funciones, DHT actúa vía RA, un miembro de la superfamilia de receptores nucleares para hormonas

esteroides, que actúa como un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando (Evans et al., 1988). Por lo tanto, factores ambientales que alteren la expresión y/o actividad de 5α -R o interaccionen con el RA, podrían alterar la fisiopatología prostática.

De los cinco tipos de isoenzimas caracterizados hasta la fecha, solo 5α -R1, 5α -R2 y, más recientemente 5α -R3, han sido implicadas en la esteroidogénesis (Bortolato et al., 2013). Dada la importancia de las isoenzimas 5α -R en la glándula prostática, no es de extrañar que su expresión génica se encuentre regulada en este órgano por diversos factores. A este respecto, los resultados de este estudio muestran que la administración de T durante cuatro días ejerce un incremento de la transcripción de 5α -R1 y 5α -R2, siendo este efecto mayor sobre 5α -R2. Estos resultados están en línea con los publicados anteriormente por nuestro grupo de investigación, demostrando que tanto 5α -R1 como 5α -R2 son reguladas positivamente por T (Torres et al., 2003a).

En el estudio anterior observamos que la exposición adulta a BPA disminuye la expresión de 5α -R1 y 5α -R2 en la glándula prostática de ratas intactas, así como los niveles de T circulantes. Como se comentó anteriormente, este hecho podría ser explicado por la disminución de la secreción de LH (Akingbemi et al., 2004) y/o por la inhibición de enzimas biosintéticas de T en los testículos (Ye et al., 2011) por BPA. Dado que 5α -R1 y 5α -R2 son reguladas positivamente por T en la próstata, BPA podría disminuir ambas isoenzimas a través del descenso de los niveles plasmáticos de T. Sin embargo, en este estudio la administración aguda de BPA a ratas castradas suplementadas con T disminuyó la transcripción de 5α -R1 y 5α -R2, sin ser influenciada, de este modo, la expresión de estas isoenzimas vía modificaciones en la síntesis endógena de T por BPA (recordamos que se tratan de ratas castradas con niveles de T circulante constantes).

Curiosamente, los niveles plasmáticos de DHT fueron disminuidos en los grupos tratados con BPA. Este descenso podría ser debido a la fuerte reducción

de los niveles intraprostáticos de 5α -R2 observados en estas ratas y, en menor medida, al descenso de 5α -R1, dado que 5α -R2 es la isoenzima predominante y principal responsable de la síntesis de DHT en este órgano (Zhu and Imperato-McGinley, 2009). En línea con nuestros resultados, se ha demostrado que la administración de finasteride (un inhibidor específico de 5α -R2) o dutasteride (inhibidor de ambas isoformas), disminuyen los niveles circulantes e intraprostáticos de DHT (Gormley et al., 1992; Nickel et al., 2004). No obstante, los efectos de BPA en otros tejidos donde la 5α -reducción ocurre, tales como hígado y piel, deberían ser tenidos en cuenta.

Otra posibilidad sería a través de la afectación directa de la función del RA por BPA, circunstancia que puede ocurrir por diferentes mecanismos: (1) antagonizando la señalización del RA, (2) evitando la translocación del RA al núcleo, (3) evitando la interacción del RA con su coactivador y subsecuente transactivación y, (4) disminuyendo el número de RA en las células estromales de la próstata ventral de rata (Lee et al., 2003; Ramos et al., 2001; Teng et al., 2013).

En este estudio, el tratamiento con BPA no alteró el peso de la próstata ventral, a pesar de la disminución de ambas isoenzimas y, presumiblemente, de unos niveles de DHT intraprostáticos más bajos (en vista de los niveles de DHT circulantes). A este respecto, dos podrían ser las explicaciones posibles: (i) otros factores adicionales están contribuyendo al crecimiento de la próstata y/o (ii) el régimen de administración de BPA seguido en este estudio no es apropiado para inducir cambios observables en el peso prostático. Existen, sin embargo, estudios que muestran que la exposición prenatal a bajas dosis de BPA incrementa el tamaño prostático (Prins et al., 2008; Timms et al., 2005) y que estos cambios persisten durante la adultez. Como se puede inferir al comparar estas evidencias, los efectos de BPA en el peso prostático podrían ser dosis-dependientes, tal y como Timms y cols. (2005) indicaron, pero también podrían depender del periodo de la vida cuando la exposición ocurre y del régimen de administración.

En síntesis, nuestros resultados mostraron que el BPA disminuye el efecto regulador positivo que la T ejerce sobre las isoenzimas 5α -R1 y 5α -R2 en la próstata de rata al menos, en parte, independientemente de los niveles de T circulante.

III. Efectos de la exposición adulta a BPA sobre genes implicados en neurotoxicidad en CPF de rata

Diversas alteraciones neurológicas y conductuales han sido descritas en animales y humanos expuestos a BPA durante etapas tempranas de la vida. Sin embargo, poco es sabido sobre el impacto de la exposición adulta a BPA en la fisiopatología cerebral. Sobre la base de las ideas y reflexiones expresadas en la *Justificación* de la presente Tesis doctoral (véase *Capítulo I, apartado 2.2*), en este estudio nuestro objetivo fue evaluar los efectos de la exposición adulta a BPA, a una dosis considerada segura por la EPA (50 µg/kg/d), sobre la expresión de 5α-R y aromatasa, enzimas que sintetizan moduladores del R-GABA_A y, Tph, la enzima limitante en la biosíntesis de 5-HT. Además, con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares de acción del BPA en la CPF adulta, 84 genes implicados en diferentes respuestas neurotóxicas fueron también analizados mediante la tecnología de PCR-array.

Diseño experimental

Las ratas macho y hembra adultas fueron s.c. inyectadas con 0.2 mL de aceite de sésamo conteniendo BPA a dosis de 50 µg/kg/d (IDT) o con aceite de sésamo solo (controles), durante 4 días consecutivos. Cada grupo experimental comprendió 12 animales. A los 30 min después de la última inyección, las ratas fueron eutanizadas por decapitación.

El tratamiento con BPA en las hembras fue distribuido aleatoriamente a través de las fases del ciclo estral, ya que nuestra intención fue diseñar los experimentos en una forma que refleje la exposición a este EDC en la vida real,

donde la fase del ciclo menstrual en las mujeres no se tiene en cuenta cuando la exposición ocurre.

Los análisis llevados a cabo fueron: a) cuantificación absoluta de los niveles de ARNm de los isoenzimas 5α -R (5α -R1, 5α -R2, 5α -R3), Tph (Tph1, Tph2) y de la enzimas aromatasa, mediante PCR a tiempo real; b) análisis de la expresión proteica mediante western blot; c) PCR-array de Neurotoxicidad. El diseño experimental se ilustra en la Figura 3.10.

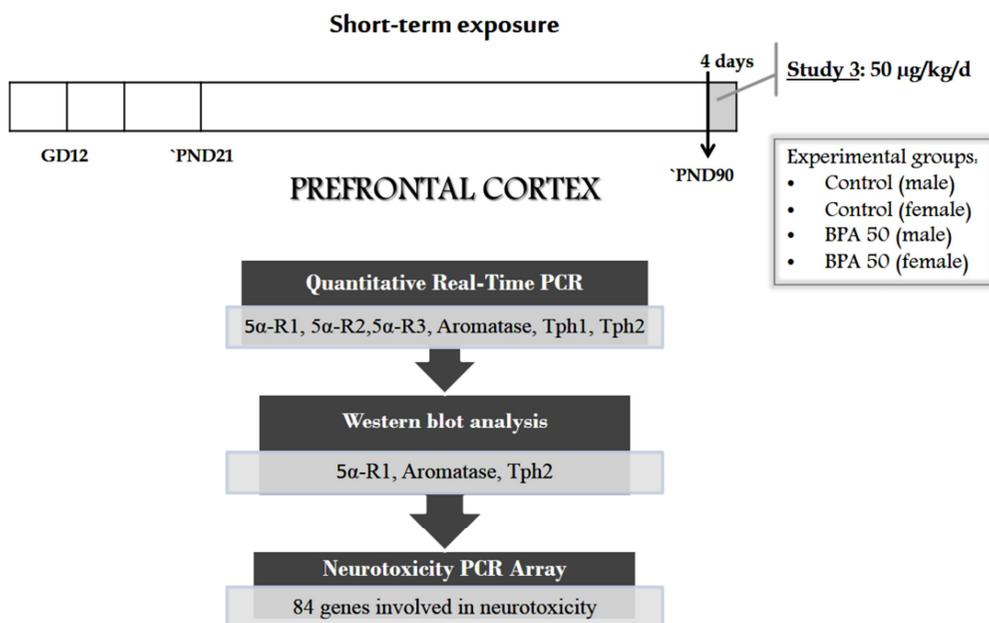


Figure 3.10: Experimental design Study 3: Effects of adult exposure to BPA on genes involved in the physiopathology of rat prefrontal cortex. Adult male and female rats were subcutaneously injected for 4 days with 50 μ g/kg/day. mRNA and protein levels of 5α -Reductase (5α -R types 1, 2, 3), aromatase and tryptophan hydroxylase (Tph 1 and 2) were quantified by real-time RT-PCR and Western blot. Genes linked to neurotoxicity were analyzed by PCR-array technology.

Resultados

- **Análisis del perfil de expresión de los isoenzimas 5α -R**

La Figura 3.11 muestra los niveles de ARNm de 5α -R1 (panel A), 5α -R2 (panel B) y 5α -R3 (panel C) en la CPF de ratas tratadas con BPA y sus controles.

Los niveles de ARNm de 5α -R1 fueron disminuidos significativamente después del tratamiento con BPA en las ratas hembra, no así en machos, en comparación con sus respectivos controles. No se observaron diferencias significativas tanto en los niveles de ARNm de 5α -R2 como de 5α -R3 en machos y hembras después de la administración de BPA.

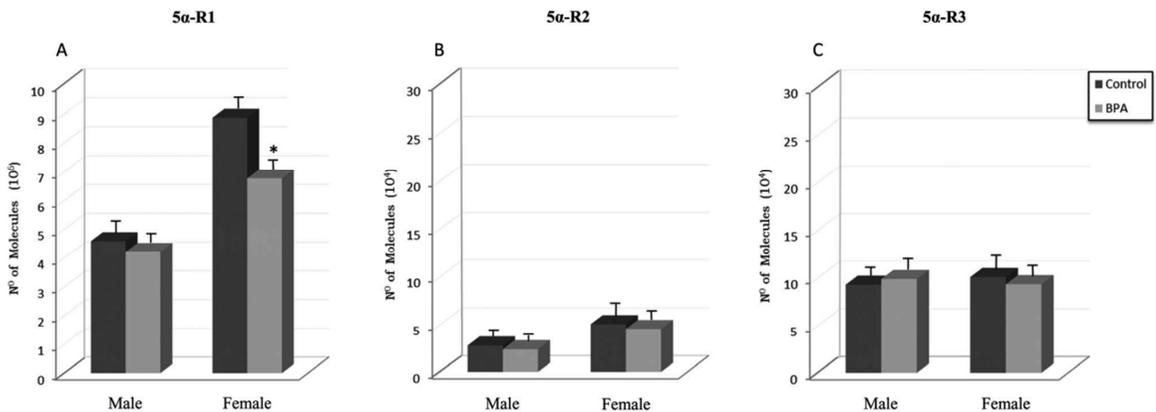


Figure 3.11: Effects of BPA on mRNA levels of steroid 5α -reductase type 1 (5α -R1) (panel A), 5α -reductase type 2 (5α -R2) (panel B), and 5α -reductase type 3 (5α -R3) (panel C) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls. *At least $p < 0.05$ vs. their controls.

Los niveles proteicos de 5α -R1 fueron disminuidos significativamente en las hembras tratadas con BPA, en comparación a sus controles (Fig. 3.12)

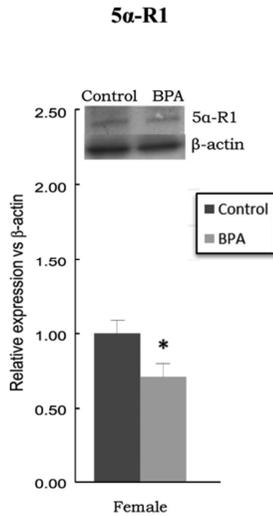


Figure 3.12: Effects of BPA on protein levels of 5 α -reductase type I (5 α -R1) in prefrontal cortex of BPA-treated female rats and controls. *At least $p < 0.05$ vs. their controls.

- **Evaluación de los niveles de expresión de aromatasa**

La Figura 3.13 muestra los niveles de ARNm (panel A) y proteicos (panel B) de aromatasa en la CPF de ratas tratadas con BPA y sus controles. Ambos niveles fueron incrementados significativamente en ratas macho expuestas a BPA; en cambio, sólo el incremento en los niveles de ARNm fue significativo en ratas hembra.

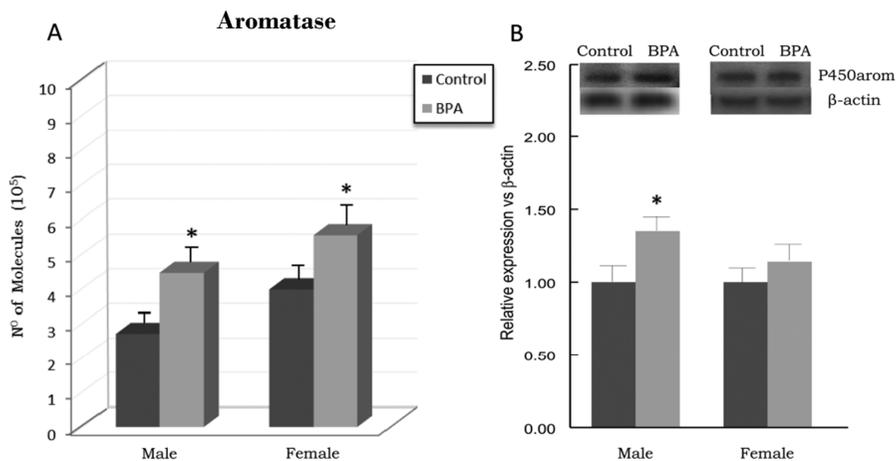


Figure 3.13: Effects of BPA on aromatase mRNA levels (panel A) and protein levels (panel B) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls. *At least $p < 0.05$ vs. their controls.

- **Análisis del perfil de expresión de los isoenzimas Tph**

La Figura 3.14 muestra los niveles de ARNm de Tph1 (panel A) y Tph2 (panel B) en la CPF de ratas tratadas con BPA y sus controles.

La administración de BPA no modificó significativamente los niveles de ARNm de Tph1 en machos y hembras, en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, BPA incrementó significativamente los niveles de ARNm de Tph2 en ratas macho y hembra, comparados con sus respectivos controles.

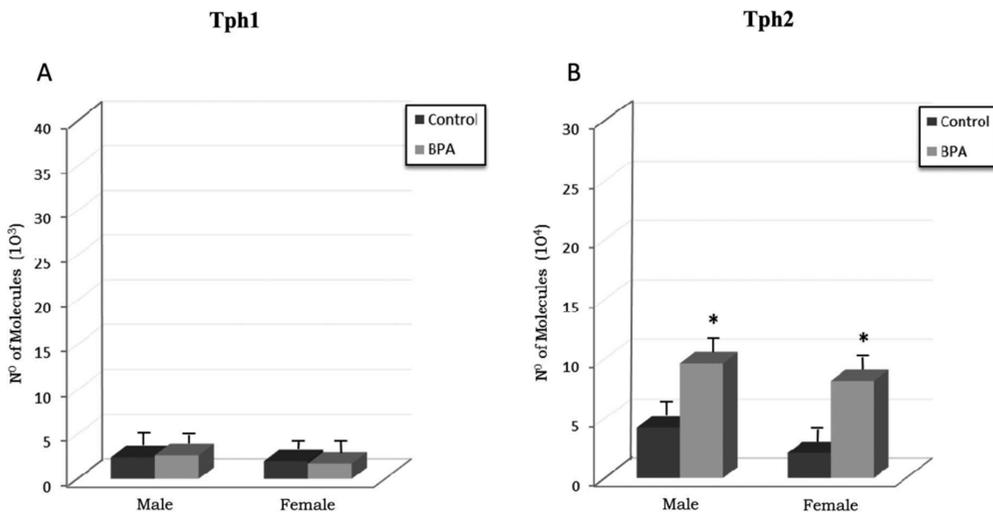


Figure 3.14: Effects of BPA on mRNA levels of tryptophan hydroxylase type 1 (Tph1) (panel A) and tryptophan hydroxylase type 2 (Tph2) (panel B) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls. * At least $p < 0.05$ vs. Their controls.

Los resultados obtenidos en los niveles proteícos de Tph2 mostraron efectos similares tras la exposición a BPA (Fig. 3.15).

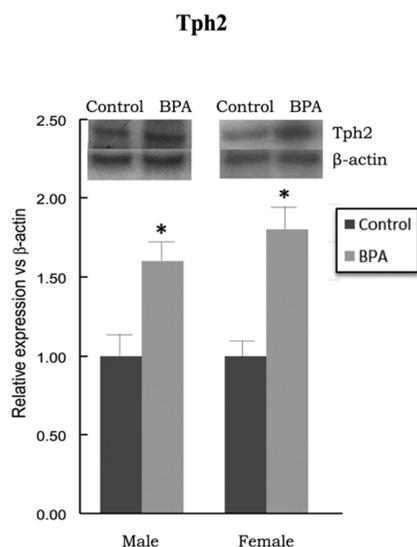


Figure 3.15: Effects of BPA on protein levels of tryptophan hydroxylase type 2 (Tph2) in prefrontal cortex of BPA-treated male and female rats and their respective controls. * At least $p < 0.05$ vs. their controls.

- **Regulación transcripcional de genes implicados en respuestas neurotóxicas (PCR-arrays)**

La Tabla 3.1 muestra información sobre los 17 genes que fueron modificados significativamente por el tratamiento con BPA a dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ en la CPF de rata macho y hembra adulta, utilizando *Rat Neurotoxicity RT² ProfilerTM PCR Array* (PARN-096Z; SABiosciences). Tal y como se ilustra en la Figura 3.16, BPA afectó negativamente la expresión de 9 y 10 genes en ratas macho y hembra, respectivamente, de un total de 84 genes analizados. En hembras, además, 2 genes fueron sobre-expresados tras la administración de BPA.

Para comprender la relevancia biológica de manera global de los cambios de expresión génica identificados en el estudio empleamos la aplicación PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationship*, <http://www.pantherdb.org/>). En concreto, se clasificaron en función de la vía de señalización (Tabla 3.2) y del proceso biológico en el que intervienen (Tabla 3.3).

GENE ID	GENE	FULL NAME
25387	<i>Arrb1</i>	Arrestin, beta 1
361167	<i>Bag4</i>	BCL2-associated athanogene 4
114496	<i>Bik</i>	BCL2-interacting killer
25400	<i>Camk2a</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
24246	<i>Camk2d</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta
306722	<i>Dapk1</i>	Death associated protein kinase 1
24318	<i>Drd2</i>	Dopamine receptor D2
58945	<i>Dynll1</i>	Dynein light chain LC8-type 1
59325	<i>Ereg</i>	Epiregulin
64030	<i>Kit</i>	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
81736	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
192363	<i>Nos1ap</i>	Nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein
313262	<i>Pappa</i>	Pregnancy-associated plasma protein A
5558	<i>Prim2a</i>	Primase, DNA, polypeptide 2 (58 kDa)
363142	<i>Sema3b</i>	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B
25341	<i>Tnfrsf11b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
311786	<i>Traf2</i>	Tnf receptor-associated factor 2

Table 3.1: List of Neurotoxicity-PCR array genes changed by BPA treatment in prefrontal cortex of male and female adult rats.

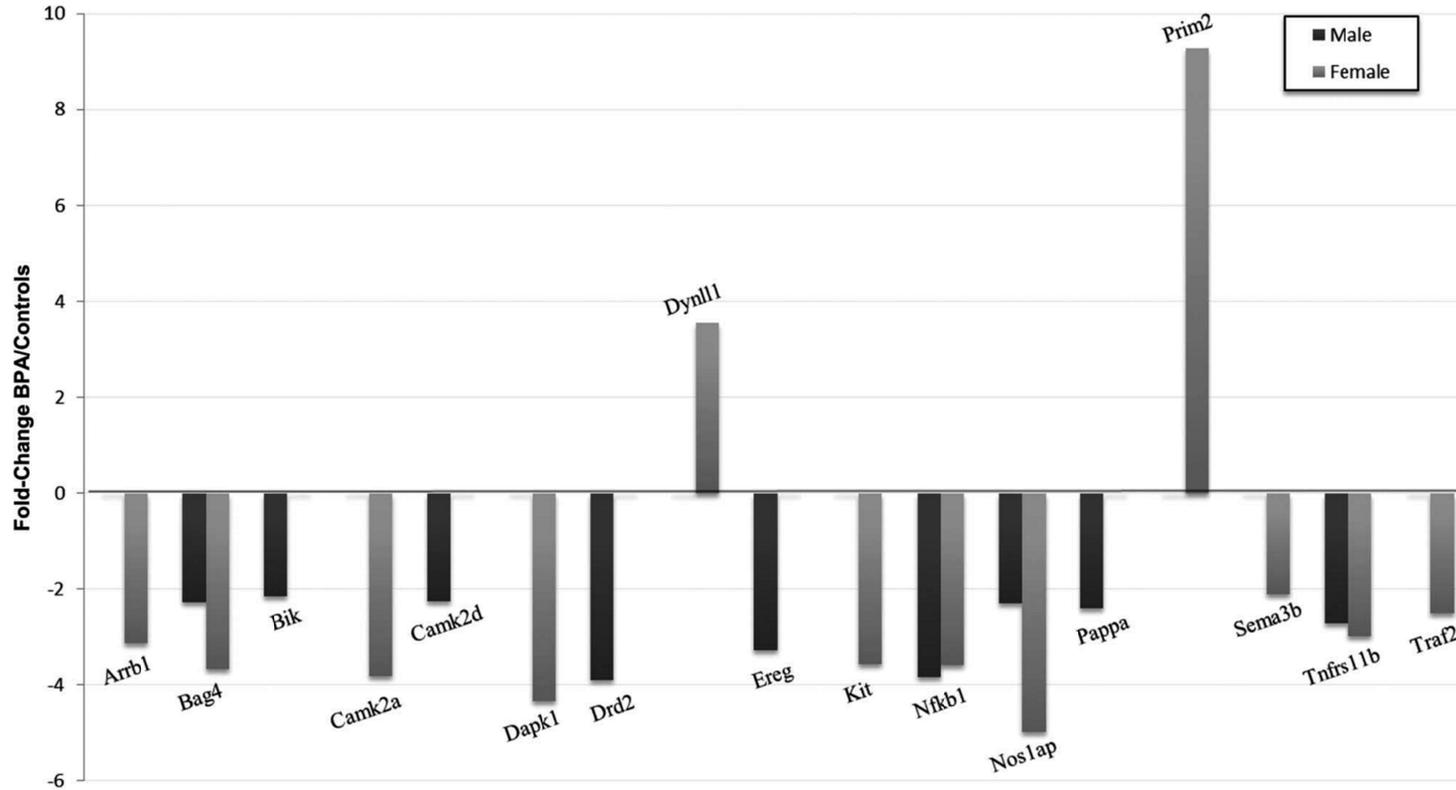
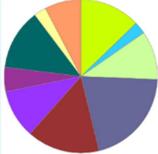
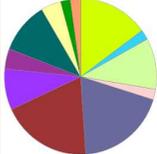


Figure 3.16: Effects of BPA on relative expression of genes involved in neurotoxic responses in prefrontal cortex of male and female rats. At least $p < 0.05$ vs. their controls.

Table 3.2	PANTHER PATHWAY	MALE	FEMALE
			
	Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin		Arrb1
	Apoptosis signaling pathway	Bag4, Bik, Nfkb1	Bag4, Nfkb1, Traf2
	B cell activation	Nfkb1	Nfkb1
	Dopamine receptor mediated signaling pathway	Drd2	
	EGF receptor signaling pathway	Ereg	
	Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	Drd2	
	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	Drd2	Arrb1
	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway	Drd2	
	Huntington disease		Dynl1
	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	Camk2d, Nfkb1	Arrb1, Camk2a, Nfkb1
	Ionotropic glutamate receptor pathway	Camk2d	Camk2a
	Nicotine pharmacodynamics pathway	Drd2	
	T cell activation	Nfkb1	Nfkb1
	Toll receptor signaling pathway	Nfkb1	Nfkb1
	Wnt signaling pathway		Arrb1
	p53 pathway		Traf2

Table 3.3		GO BIOLOGICAL PROCESS PANTHER	
MALE		FEMALE	
			
■	Apoptotic process		
Bag4, Drd2, Nfkb1, Nos1ap, Tnfrsf11b		Bag4, Dapk1, Kit, Nfkb1, Traf2, Tnfrsf11b	
■	Biological adhesion: Cell adhesion		
Pappa		Dapk1	
■	Biological regulation		
<i>Negative regulation of apoptotic process</i>			
Bag4, Nfkb1, Tnfrsf11b		Kit, Bag4, Nfkb1, Tnfrsf11b	
<i>Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>			
Nfkb1		Nfkb1	
<i>Regulation of molecular function: Regulation of catalytic activity</i>			
		Dynll1	
■	Cellular component organization or biogenesis		
		Dynll1	
■	Cellular process		
<i>Cell communication: Synaptic transmission</i>			
Camk2d, Drd2			
<i>Cell cycle</i>			
Ereg, Nfkb1		Nfkb1, Dynll1	
<i>Cellular component movement</i>			
Drd2			
■	Developmental process		
Bag4, Camk2d, Drd2, Nfkb1, Nos1ap, Tnfrsf11b		Bag4, Dapk1, Dynll1, Kit, Nfkb1, Nos1ap, Sema3b, Traf2, Tnfrsf11b	
■	Immune system process		
Nos1ap, Pappa, Drd2, Tnfrsf11b		Nos1ap, Traf2, Sema3b, Tnfrsf11b	
■	Localization		
<i>RNA localization</i>			
		Dynll1	
<i>Transport (lipid/protein/vesicle)</i>			
Drd2, Pappa		Arrb1, Dynll1	
■	Metabolic process		
Bag4, Drd2, Camk2d, Nfkb1, Pappa		Bag4, Camk2a, Dapk1, Dynll1, Nfkb1	
■	Multicellular organismal process		
Drd2		Arrb1, Sema3b	
■	Reproduction		
		Dynll1	
■	Response to stimulus		
Drd2, Pappa, Tnfrsf11b		Tnfrsf11b	

Discusión

Los resultados de este estudio indican que la exposición adulta a BPA, incluso durante un período corto y a una dosis considerada segura, produce alteraciones de manera sexo-específica en la expresión de genes clave para la función de la CPF.

En el presente trabajo, la administración de BPA a ratas adultas resultó en un descenso de la expresión de 5α -R1 en CPF de hembras, no así en machos. Estos datos son muy interesantes ya que 5α -R1 es la principal isoenzima implicada en la biosíntesis de NE- $3\alpha,5\alpha$ reducidos, tales como AloP (Paul and Purdy, 1992), presentando además, niveles más elevados en hembras que en machos (Torres et al., 2001). Dado que alteraciones en los niveles de AloP han sido implicadas en la vulnerabilidad para diversas patologías mentales y emocionales vía R-GABA_A (Turkmen et al., 2011), niveles cerebrales reducidos de 5α -R1 y, consecuentemente de AloP, podrían contribuir a un incremento de la susceptibilidad a estos desórdenes en las hembras. A este respecto, los cambios de humor durante el ciclo menstrual, la depresión postparto y mayor, así como la epilepsia, son patologías asociadas con bajos niveles de AloP (Birzniece et al., 2006).

Fue también relevante el incremento de la expresión de aromatasa en ratas tratadas con BPA, en línea con trabajos previos realizados en otras áreas cerebrales de animales expuestos en etapas más tempranas de la vida (Chung et al., 2011). Considerándose que los estrógenos son capaces de reducir la síntesis del neurotransmisor GABA (Murphy et al., 1998) así como subunidades del R-GABA_A (Calza et al., 2010), la exposición adulta a BPA podría interferir con la neurotransmisión GABAérgica en la CPF de ambos sexos.

Además del sistema GABA, la neurotransmisión cerebral serotoninérgica también regula la función de la CPF (Puig and Gullledge, 2011). De hecho, sus alteraciones podrían desencadenar desórdenes neuropsiquiátricos importantes (Puig and Gullledge, 2011). En este estudio, las ratas tratadas con BPA mostraron un incremento de la expresión de la enzima implicada en la síntesis cerebral de 5-HT, Tph2. De acuerdo a nuestros resultados, ha sido descrito un aumento de los niveles de 5-HT (Matsuda et al., 2010; Nakamura et al., 2010) y Tph2 (Xu et al., 2013) en el cerebro de roedor después de la exposición a BPA. Dado que los estrógenos pueden regular los niveles de 5-HT a través del incremento de la expresión de Tph2 (Hiroi et al., 2006), BPA podría afectar Tph2 vía aromatasa. En vista de los resultados obtenidos, donde BPA aumentó más los niveles de Tph2 en hembras que en machos, mientras que la expresión de aromatasa fue incrementada principalmente en machos, hipotetizamos que otros mecanismos moleculares subyacentes podrían mediar este efecto.

Los resultados obtenidos mediante la tecnología de PCR-arrays revelaron además dianas génicas adicionales de BPA en la CPF de ratas adultas. Así, en ratas hembra BPA disminuyó los niveles de ARNm de *Arrb1*, gen que codifica para una proteína adaptadora acoplada al receptor de proteína G (GPCR), implicada en la señalización protectora a través de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (mGlu1a) (Emery et al., 2010). Interesantemente, niveles bajos de *Arrb1* han sido ligados con trastornos del humor (p.e. depresión mayor) (Avisar et al., 2004). Por lo tanto, BPA podría contribuir a incrementar la susceptibilidad a estas enfermedades en la hembra vía descenso de *Arrb1* y/o 5α -R1.

Cabe considerar, por otra parte, que BPA afectó a varios genes relacionados con plasticidad sináptica y memoria. Tal es el caso del descenso de la transcripción por BPA de *Camk2d* en machos y *Camk2a* en ratas hembra. Los productos de estos genes son las cadenas *a* y *d*, respectivamente, de la proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII). CaMKII es esencial para

la consolidación de la memoria y ciertas formas de plasticidad sináptica tales como la potenciación a largo plazo (LTP) (Lisman et al., 2012). Ya que CaMKIIa es una de las principales formas de CaMKII en el cerebro (Liu and Murray, 2012), nuestros resultados sugieren que la exposición adulta a BPA podría afectar la función de CaMKII, principalmente en la hembra. En esta línea, Viberg y cols. (2012) han encontrado que la exposición neonatal a BPA disminuye los niveles de CaMKII en la corteza cerebral de ratones hembra adultas pero no en machos.

CaMKII es también requerida para la activación mediada por calcio del factor nuclear kappa-B (NF-kB), el cual es crítico para la defensa del huésped y ha sido implicado en cambios a largo plazo y plasticidad sináptica (Meffert et al., 2003). En este estudio, BPA disminuyó en la CPF de ambos sexos los niveles de ARNm de *Nfkb1*, un precursor de la subunidad p50 de NF-kB. Consecuentemente, las funciones de NF-kB podrían verse comprometidas. De acuerdo a nuestros resultados, otros autores han descrito que BPA inhibe la activación de NF-kB en macrófagos (Igarashi et al., 2006).

Por otra parte, BPA disminuyó, principalmente en ratas hembra, los niveles de ARNm de *Nos1ap*, una proteína adaptadora que une la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) a dianas específicas (Fang et al., 2000). nNOS ha sido implicada en la modulación de procesos tales como aprendizaje, memoria y neurogenesis (Zhou and Zhu, 2009). De forma opuesta, BPA incrementó los niveles de ARNm de *Dyn111*, una proteína inhibidora de nNOS (Jaffrey and Snyder, 1996), solo en las hembras. Por tanto, la exposición adulta a BPA podría tener efectos sexo-específicos en el sistema óxido nítrico, de acuerdo con los resultados obtenidos por Martini y cols. (2010).

Resulta asimismo interesante que BPA disminuyera en ratas hembra la transcripción de *Kit*, dado que una baja actividad de Kit ha sido asociada con alteraciones del aprendizaje espacial y la memoria en ratas adultas (Katafuchi et al., 2000).

Otro hallazgo importante fue el descenso de *Drd2* tras la administración de BPA en ratas macho, un receptor crucial para la función cognitiva de la CPF (St Onge et al., 2011; Zhang et al., 2007). Curiosamente, ha sido descrito que BPA produce un desarrollo anormal de la plasticidad sináptica en el cuerpo estriado de ratas, debido, en parte, a la disminución de la función de *Drd2* (Zhou et al., 2009). En ratas macho tratadas con BPA también se observó una disminución de la transcripción de *Ereg*, un ligando de la familia ErbB del receptor tirosina kinasas. Estos receptores están implicados tanto en la regulación de la transmisión GABAérgica en la CPF adulta (Woo et al., 2007), como en la plasticidad sináptica (Chen et al., 2008).

Además, en machos tratados con BPA se encontró una disminución de los transcritos de *Pappa*, una metaloproteinasa que escinde la proteína 4 de unión a factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP4), regulando así la biodisponibilidad local de IGF (Conover et al., 2004). Interesantemente, en el cerebro IGF regula procesos de aprendizaje y memoria (Lupien et al., 2003), teniendo además un papel neuroprotectivo importante tras daño cerebral (O’Kusky et al., 2012). Si bien algunos estudios han reportado que BPA altera la señalización de IGF (Klotz et al., 2000), se presenta aquí un nuevo mecanismo molecular por el que BPA podría afectar este sistema en el cerebro adulto.

Por otra parte, en las ratas hembra tratadas con BPA se obtuvo un descenso en los niveles de ARNm de *Sema3b*, gen que codifica para una proteína importante en la guía axonal (Derijck et al., 2010).

En resumen, nuestros resultados muestran claramente que la exposición adulta a BPA altera genes implicados en mecanismos de plasticidad sináptica y memoria en la CPF de la rata. No obstante, BPA produjo asimismo cambios en la transcripción de otros genes relacionados con funciones tan importantes como la supervivencia (*Prim2a*) y muerte celular (*Bik*, *Tnfrsf11b*, *Dapk1*, *Bag4* and *Traf2*), lo cual podría contribuir a alterar la función fisiológica de la CPF.

IV. Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en la CPF de ratas macho jóvenes y adultas

Existe una cierta preocupación acerca de las implicaciones que la exposición a BPA en épocas tempranas de la vida pudiera tener sobre el desarrollo de desórdenes neurológicos y conductuales. En base al papel fundamental de la CPF en el control de comportamientos complejos, anormalidades en esta área cerebral podrían mediar, al menos en parte, los efectos observados en animales y humanos expuestos a este EDC. Ciertas funciones críticas de la CPF están moduladas por los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, cuyas alteraciones han sido asociadas con psicopatologías que podrían aparecer en la juventud y/o adultez. En el presente estudio se pretende evaluar los efectos del BPA sobre los sistemas DA y 5-HT en la CPF de ratas macho jóvenes y adultas expuestas durante el período crítico de desarrollo de estos sistemas.

Diseño experimental

Los animales fueron aclimatados durante dos semanas antes del apareamiento. Las hembras fueron inspeccionadas diariamente con objeto de observar la presencia de tapón vaginal. El periodo de gestación de la rata dura 22 días, considerando el día en que se visualizó el tapón vaginal como día gestacional (*gestational day*, GD) 0 y el parto, como día postnatal (*postnatal day*, PND) 0.

Las hembras gestantes fueron s.c. inyectadas con BPA a dosis de 10 µg/kg/d ($n = 6$) o con aceite de oliva sólo (control, $n = 6$) desde GD12 hasta el

parto. Cada una de las hembras gestantes dio luz a una camada. En este estudio, dos camadas fueron consideradas como un grupo, de este modo se obtuvieron tres grupos expuestos a BPA y tres grupos expuestos a vehículo (controles). Las crías macho recibieron la misma dosis de BPA o vehículo desde PND1 a PND21. A los 30 min de la última inyección, cinco machos por grupo fueron seleccionados al azar y eutanizados por decapitación. Los animales restantes fueron mantenidos hasta alcanzar la adultez a PND90, momento en el que fueron eutanizados ($n = 5$ / grupo).

Se utilizó la tecnología de PCR-arrays (*Rat Dopamine & Serotonin Pathway RT² Profiler™ PCR Arrays*, PARN-158Z; SABiosciences) para analizar simultáneamente los niveles de transcritos de 84 genes asociados estrechamente con los sistemas DA y 5-HT. El diseño experimental se ilustra en la Figura 3.17.

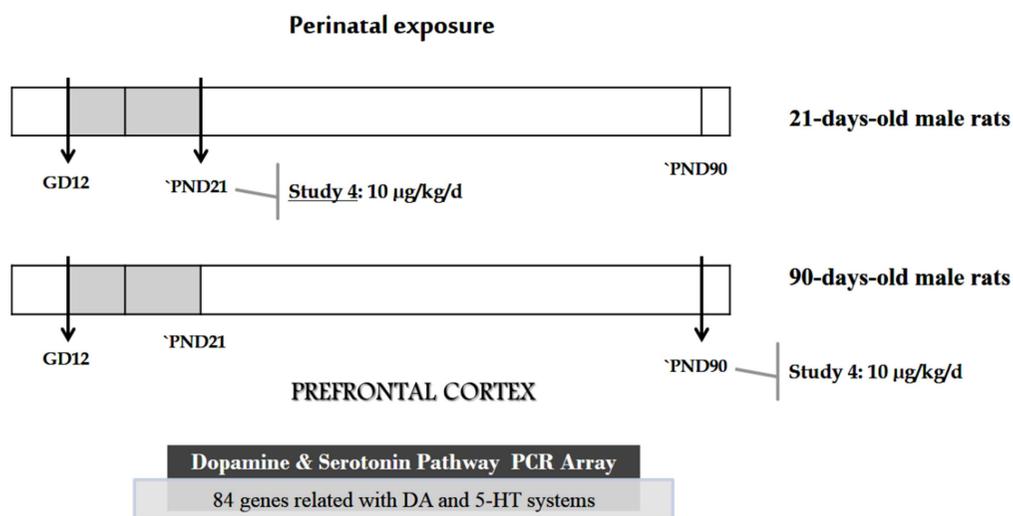


Figure 3.17: Experimental design Study 4: *Effects of perinatal exposure to BPA on prefrontal cortical dopamine and serotonin systems in both juvenile and adult male rats.* Pregnant rats were exposed to daily BPA injections (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or vehicle from gestational day 12 (GD12) to parturition. Then, male pups were injected from postnatal day 1 (PND1) to PND21. Genes linked to dopamine (DA) and serotonin (5-HT) systems were analyzed by PCR-Array technology in the prefrontal cortex of 21- and 90-days-old rats.

Resultados

- **Análisis de la transcripción a PND21**

En la Tabla 3.4 se listan los 12 genes del PCR-array utilizado que fueron modificados significativamente por la exposición perinatal a BPA en la CPF de ratas macho a PND21. En ratas tratadas con BPA, 6 genes fueron sobre-expresados y 6 genes fueron regulados negativamente en comparación con los controles (Fig. 3.18).

No se observaron efectos en genes implicados en la síntesis de DA y 5-HT o en su degradación (*Comt*, *Dbh*, *Ddc*, *Maoa*, *Maob*, *Tdo2*, *Th*, *Tph1*, *Tph2*). En el caso de genes relacionados con el transporte, BPA reguló positivamente el gen que codifica el transportador de 5-HT (*Slc6a4*) sin afectar los niveles de transcritos del transportador de DA (*Slc6a3*).

Por otro lado, BPA ejerció una regulación negativa en la mayoría de los genes que codifican los receptores de DA (DRs) (*Drd2*, *Drd3*, *Drd5*), mientras que sólo la subunidad A del receptor tipo 3 de 5-HT (*Htr3a*) fue afectada por este tratamiento. Asimismo, la administración de BPA reguló en ambas direcciones algunos genes asociados con señales de transducción. Entre estos genes, elementos de las vías adenosín monofosfato cíclico (AMPC)/proteína quinasa A (PKA) (*Adcy2*) y fosfolipasa C (PLC; *Plcb2*) fueron sobre-regulados, así como componentes de las vías de señalización de GPCR (*Adrb1*, *Adrbk1*). *Alox12*, relacionado con la vía de la fosfolipasa A2 (PLA2), fue infra-regulado. No se observaron efectos en elementos de la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt después del tratamiento con BPA.

Con respecto a otros genes diana relacionados con los sistemas DA y 5-HT estudiados (*Bdnf*, *Ephb1*, *Gdnf*, *Gfap*, *Nr4a1*, *Nr4a3*, *Pdyn*, *Ptgs2*, *Slc18a1*,

Slc18a2, *Syn2*), 2 genes fueron regulados por BPA. En concreto, *Gdnf* fue regulado negativamente y *Nr4a3* positivamente.

<i>GenBank™</i> <i>Accession no.</i>	<i>Gene</i> <i>Symbol</i>	<i>Full name</i>
NM_031007	<i>Adcy2</i>	Adenylate cyclase 2
NM_012701	<i>Adrb1</i>	Adrenergic, beta-1, receptor
NM_012776	<i>Adrbk1</i>	Adrenergic, beta, receptor kinase 1
NM_001105798	<i>Alox12</i>	Arachidonate 12-lipoxygenase
NM_012547	<i>Drd2</i>	Dopamine receptor D2
NM_017140	<i>Drd3</i>	Dopamine receptor D3
NM_012768	<i>Drd5</i>	Dopamine receptor D5
NM_019139	<i>Gdnf</i>	Glial cell derived neurotrophic factor
NM_024394	<i>Htr3a</i>	5-hydroxytryptamine receptor 3a
NM_017352	<i>Nr4a3</i>	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
NM_053478	<i>Plcb2</i>	Phospholipase C, beta 2
NM_013034	<i>Slc6a4</i>	Solute carrier family 6, member 4

Table 3.4: List of PCR array genes changed by BPA treatment in prefrontal cortex of 21-days-old rats. The table contains data from the genes showed in Figure 3.18.

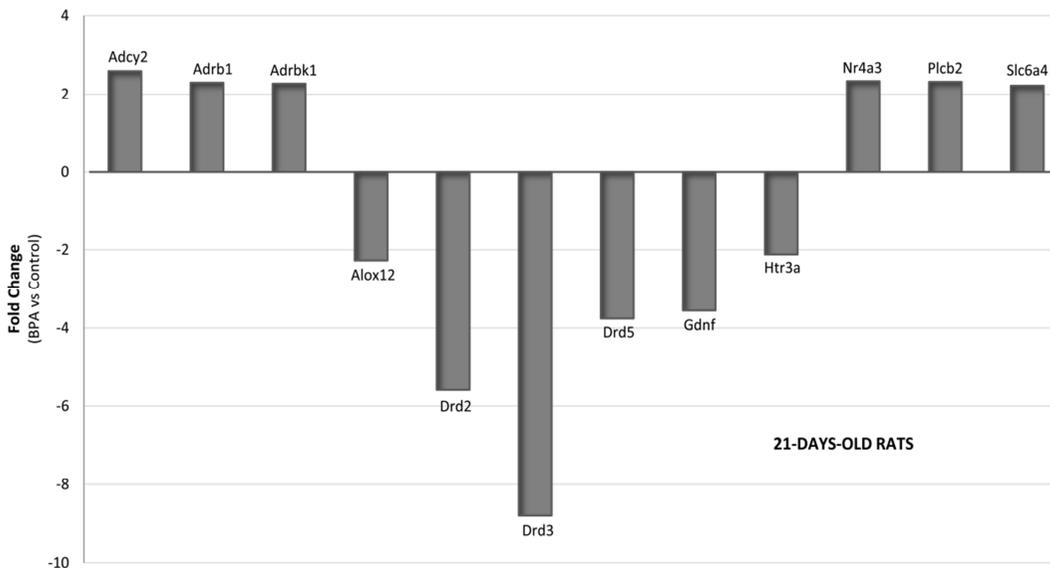


Figure 3.18: Effects of BPA (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) on relative expression of genes involved in dopamine and serotonin systems in prefrontal cortex of juvenile (PND21) male rats. Data represent the mean of three arrays. Fold change >2; t-test with Benjamini-Hochberg correction, $p < 0.05$.

- **Análisis de la transcripción a PND90**

En la Tabla 3.5 se listan los 4 genes del PCR-array utilizado que fueron modificados significativamente por la exposición perinatal a BPA en la CPF de ratas macho a PND90. En las ratas tratadas con BPA, 2 genes fueron regulados positivamente y 2 negativamente, en comparación con los controles (Fig. 3.19).

BPA ejerció un efecto positivo sobre *Th*, mientras que disminuyó *Tph2*, implicados en la síntesis de DA y 5-HT, respectivamente; sin afectar genes implicados en la degradación de estos neurotransmisores. BPA tampoco modificó significativamente genes relacionados con el transporte de DA o 5-HT.

En el caso de genes relacionados con los receptores de DA y 5-HT estudiados (*Drd1a*, *Drd2*, *Drd3*, *Drd4*, *Drd5*, *Htr1a*, *Htr1b*, *Htr1d*, *Htr1f*, *Htr2a*, *Htr2b*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr3b*, *Htr4*, *Htr5a*, *Htr6*, *Htr7*), sólo un gen que codifica para un DR fue afectado por BPA, en concreto *Drd3* fue sobre-regulado. No se observaron efectos en genes que codifican elementos de las vías AMPc/PKA, PLC, PLA2 o PI3K/Akt después de la exposición a BPA.

Con respecto a otros genes diana de estos sistemas estudiados, sólo se afectaron los niveles de transcritos de *Gdnf*, los cuales fueron regulados negativamente por BPA.

<i>GenBank™ Accession no.</i>	<i>Gene Symbol</i>	<i>Full name</i>
NM_017140	<i>Drd3</i>	Dopamine receptor D3
NM_019139	<i>Gdnf</i>	Glial cell derived neurotrophic factor
NM_012740	<i>Th</i>	Tyrosine hydroxylase
NM_173839	<i>Tph2</i>	Tryptophan hydroxylase 2

Table 3.5: List of PCR array genes changed by BPA treatment in prefrontal cortex of 90-days-old rats. The table contains data from the genes showed in Figure 3.19.

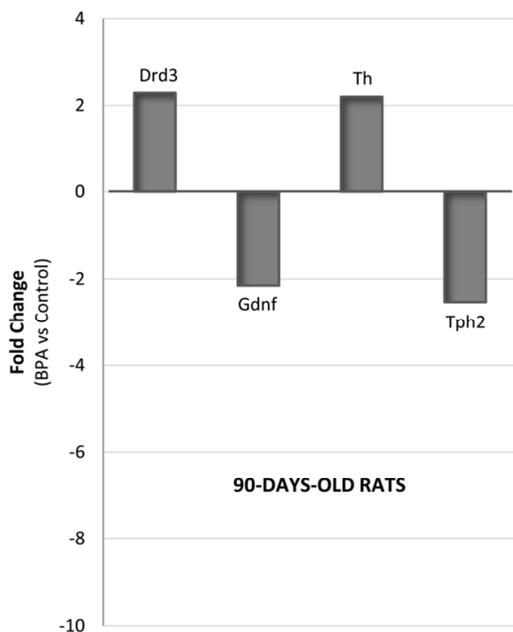


Figure 3.19: Effects of BPA (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) on relative expression of genes involved in dopamine and serotonin systems in prefrontal cortex of adult (PND90) male rats. Data represent the mean of three arrays. Fold change >2 ; t-test with Benjamini-Hochberg correction, $p < 0.05$.

Discusión

En el presente estudio, hemos demostrado que la exposición a BPA durante el desarrollo temprano de los sistemas DA y 5-HT precorticales produce, no sólo alteraciones en estos sistemas durante el período juvenil, sino también alteraciones permanentes y consecuencias a largo plazo relevantes en la adultez. Estos efectos fueron observados usando 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, una dosis muy baja relativa al NOAEL de 5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ (EFSA, 2006) identificado para BPA por Tyl y cols. (2002).

Los resultados presentados aquí revelan que BPA altera la expresión de una variedad amplia de genes importantes para el desarrollo y/o mantenimiento del sistema DA. A este respecto, BPA incrementó en ratas jóvenes los niveles de ARNm de *Nr4a3*, el cual regula genes de la neurotransmisión dopaminérgica (Eells et al., 2012), mientras que disminuyó los niveles de *Gdnf*, un factor neurotrófico esencial para el desarrollo, supervivencia y función de las neuronas dopaminérgicas (Allen et al., 2013). Interesantemente, el descenso ejercido por

BPA sobre los transcritos de *Gdnf* persistió a lo largo de la vida del animal. Este hallazgo está en línea con los resultados de Miyagawa y cols. (2007a), quienes mostraron un descenso en la expresión de *Gdnf* en el área límbica de ratones expuestos de forma crónica y prenatalmente a BPA.

BPA también disminuyó la transcripción de algunos miembros de los RsD (R5D, R2D y R3D) en ratas jóvenes. Sin embargo, otros estudios han reportado que la exposición perinatal a BPA resulta en una sobre-regulación del R1D en la zona límbica anterior del cerebro de ratón (Narita et al., 2006; Suzuki et al., 2003) y en un descenso de la función del R3D, sin afectar a su síntesis (Mizuo et al., 2004). Estas discrepancias entre estudios podrían basarse en diferencias en la dosis y/o ruta de exposición. Ambos receptores, R2D y R5D, parecen ser críticos para los procesos de aprendizaje y memoria de trabajo, los cuales son mediados por la CPF (Müller et al., 1998). Por otro lado, una disminución de los Rs2D podría incrementar el riesgo de desarrollo de comportamientos adictivos (Volkow et al., 1999), los cuales, interesantemente, han sido también ligados con la exposición a BPA (Welshons et al., 2006). Dado que el sistema precortical dopaminérgico está involucrado en la adicción a drogas (Kalivas et al., 2005), la disminución de los niveles del R2D por BPA podría contribuir a este efecto, especialmente durante la adolescencia, un período crítico para la vulnerabilidad a la adicción (Crews et al., 2007).

Esta hipótesis está sustentada fuertemente con el marcado descenso de *Drd3* que se obtuvo en este estudio en ratas jóvenes tratadas con BPA, dado que los Rs3D podrían modular funciones de los Rs2D (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Interesantemente, Fishburn y cols. (1996) indicaron que el R2D es el receptor tipo D2 dominante en el cerebro adulto, mientras que el R3D podría ser el dominante en etapas tempranas del desarrollo, sugiriendo que podría tener un papel funcional en el desarrollo prenatal.

Los efectos que observamos en los RsD en ratas jóvenes expuestas a BPA podrían ser explicados, al menos en parte, por la sobre-regulación de *Adrbk1*,

que codifica para la quinasa GRK2 (*G protein-coupled receptor kinase 2*). GRK2 inhibe la expresión del R2D (Namkung et al., 2009) y regula la señalización y tráfico de muchos subtipos de R2D (Evron et al., 2012). Además, GRKs regulan numerosos GPCRs, resultando en una atenuación de la señalización mediada por GPCR (Evron et al., 2012). De conformidad, GRK2 fosforila la forma activada del receptor beta-adrenérgico (β AR), actuando así como un mecanismo de retroalimentación negativa (Rengo et al., 2012). Esto podría contrarrestar el incremento de los transcritos por BPA del β AR tipo 1 (*Adrb1*) cuya activación resulta en un incremento en la liberación frontocortical de noradrenalina, glutamato y DA (Millan et al., 2000). BPA podría de este modo producir alteraciones no solo en elementos del sistema DA, sino también en GPCRs implicados en la neurotransmisión de varios péptidos.

Las evidencias anteriores apuntan a que la neurotransmisión dopaminérgica podría estar disminuida en la CPF de ratas jóvenes expuestas a BPA. Cabe considerar que se necesitan niveles óptimos de DA para el control adecuado del comportamiento y la atención ejercido por la CPF (Arnsten, 2006). En esta línea, Sullivan y Brake (2003) describieron que la disminución de la función del sistema DA en la CPF predispone a TDAH. Además, roedores jóvenes con un déficit en el desarrollo de neuronas DA o Rs3D muestran hiperactividad motora (Shaywitz et al., 1976; Xu et al., 1997). Curiosamente, BPA produce hiperactividad y comportamiento agresivo en tanto en animales de experimentación jóvenes como en niños (Perera et al., 2012; Saili et al., 2012), a través de mecanismos todavía desconocidos.

Una consecuencia a largo plazo observada en ratas adultas expuestas a BPA fue el incremento de la transcripción de tirosina hidroxilasa (*Th*). Otros autores han encontrado diferencias en la expresión de *Th* tras la exposición a BPA, hecho que depende del área estudiada (Ishido et al., 2007; Nakamura et al., 2010). La regulación transcripcional de *Th* es modulada diferencialmente por estrógenos, resultando en un incremento a través de la activación del RE α y en una disminución vía RE β (Maharjan et al., 2005). Dado que BPA muestra una

afinidad diez veces mayor por el RE β que por el RE α (Routledge et al., 2000), el efecto esperado sería una disminución de la expresión de *Th*. Una posibilidad es que en este estudio la inducción de la transcripción de *Th* podría responder a un mecanismo compensatorio para mantener el tono dopaminérgico, como resultado de su disminución en la CPF juvenil. Ahora bien, tanto la sobre-estimulación como la infra-estimulación de RsD son perjudiciales para la función cognitiva precortical (Murphy et al., 1996).

En relación al sistema serotoninérgico, nuestro estudio solamente identificó tres genes como dianas potenciales de la exposición perinatal a BPA en la CPF de rata. Así, BPA sobre-expresó en ratas jóvenes el transportador de 5-HT (*Slc6a6*), datos en línea con los resultados reportados por Matsuda y cols. (2013) en el hipocampo de ratones y que podrían conducir a un descenso de los niveles de 5-HT en la hendidura sináptica. Además, BPA podría afectar la función del receptor de 5-HT tipo 3 (5-HT 3) vía descenso de *Htr3a*, el cual codifica para la subunidad *a* de dicho receptor. No obstante, se hacen necesarios más estudios para clarificar este aspecto.

Un efecto adicional observado en ratas adultas tratadas con BPA (y no en juveniles), fue un descenso en los niveles de ARNm de *Tph2*. Sin embargo, en nuestro estudio anterior y, en línea con otros autores (Matsuda et al., 2010; Nakamura et al., 2010) indicamos que BPA incrementó la expresión de *Tph2*. Diferencias en las dosis, tiempo y duración de la exposición (aguda *vs* crónica) deberían tenerse en cuenta.

En resumen, nuestros resultados indican que la exposición perinatal a BPA podría producir una regulación negativa sobre el sistema serotoninérgico precortical. Ha sido descrito que la disminución de la transmisión de 5-HT podría contribuir a incrementar la impulsividad, agresión y comportamientos suicidas (Roggenbach et al., 2002), anomalías conductuales que han sido también ligadas con la exposición a BPA (Richter et al., 2007b). Por otro lado, algunos procesos cognitivos en los cuales la CPF está involucrada (p.e. memoria

de trabajo) maduran durante la adolescencia tardía (Funahashi and Inoue, 2000). De esta forma, los efectos a largo plazo de la exposición a BPA que implican alteraciones en estas funciones ejecutivas podrían ser manifestados en la adultez. En esta línea, ha sido descrito que la exposición pre- y postnatal temprana a BPA provoca déficits cognitivos a largo plazo en roedores (Gonçalves et al., 2010; Miyagawa et al., 2007b). Resulta asimismo interesante que la reducción de 5-HT en la CPF altera la memoria de trabajo (Clarke et al., 2004) o atenúa la activación cortical frontal en humanos (Allen et al., 2006).

En síntesis, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que BPA, incluso a una baja dosis, podría tener consecuencias negativas para los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico precorticales en ambos períodos de la vida. En su conjunto, el sistema DA parece ser el más afectado en ratas jóvenes tratadas con BPA. En ratas adultas, la mayoría de los genes relacionados con los sistemas DA y 5-HT estudiados no fueron modificados por BPA, sin embargo alteraciones en enzimas limitantes de la síntesis de DA y 5-HT apuntan a consecuencias adversas en este período de la vida.

Hay un rango crítico de actividad dopaminérgica y serotoninérgica para el funcionamiento óptimo de la CPF. Dado que la CPF controla funciones ejecutivas (memoria de trabajo, inhibición del comportamiento, atención, etc.), alteraciones en la homeostasis de DA y 5-HT precortical podría incrementar la susceptibilidad a enfermedades mentales o del comportamiento.

V. Efectos de la exposición perinatal a BPA y sus análogos (BPF y BPS) sobre isoenzimas 5 α -R y genes relacionados con los sistemas dopaminérgico/serotoninérgico en la CPF de rata hembra joven

El NTP de EE.UU reconoció en 2008 tener “alguna preocupación” sobre los efectos potenciales del BPA en el cerebro y comportamiento de fetos, recién nacidos y niños expuestos. Conforme la preocupación por la seguridad del BPA continúa creciendo, el uso de alternativas, principalmente BPF y BPS, ha incrementado recientemente. No obstante, hay pocos datos disponibles acerca de los efectos tóxicos de estos BPs. En este estudio evaluamos el efecto de BPA, BPF y BPS sobre la expresión precortical de 5 α -R, implicada en la síntesis de NE-3 α ,5 α reducidos, así como sobre genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, cuyas alteraciones podrían desencadenar anomalías en el comportamiento y psicopatologías.

Diseño experimental

Los animales fueron aclimatados durante dos semanas antes del apareamiento. Las hembras fueron inspeccionadas diariamente con objeto de observar la presencia de tapón vaginal (GD0). Las ratas gestantes fueron s.c. inyectadas con BPA, BPF o BPS a dosis de 10 μ g/kg/d o con aceite de oliva sólo (control) desde GD12 hasta el parto.

Las crías hembras recibieron la misma dosis de BPA, BPF, BPS o vehículo desde PND1 a PND21. A los 30 min de la última inyección, los animales fueron eutanizados por decapitación.

En este estudio se realizaron los siguientes experimentos: a) cuantificación absoluta de los niveles de ARNm de los isoenzimas 5α -R (5α -R1, 5α -R2, 5α -R3), mediante PCR a tiempo real; b) análisis de la expresión proteica mediante western blot; c) PCR-arrays para analizar simultáneamente los niveles de ARNm de 84 genes asociados estrechamente con los sistemas DA y 5-HT. El diseño experimental se ilustra en la Figura 3.20.

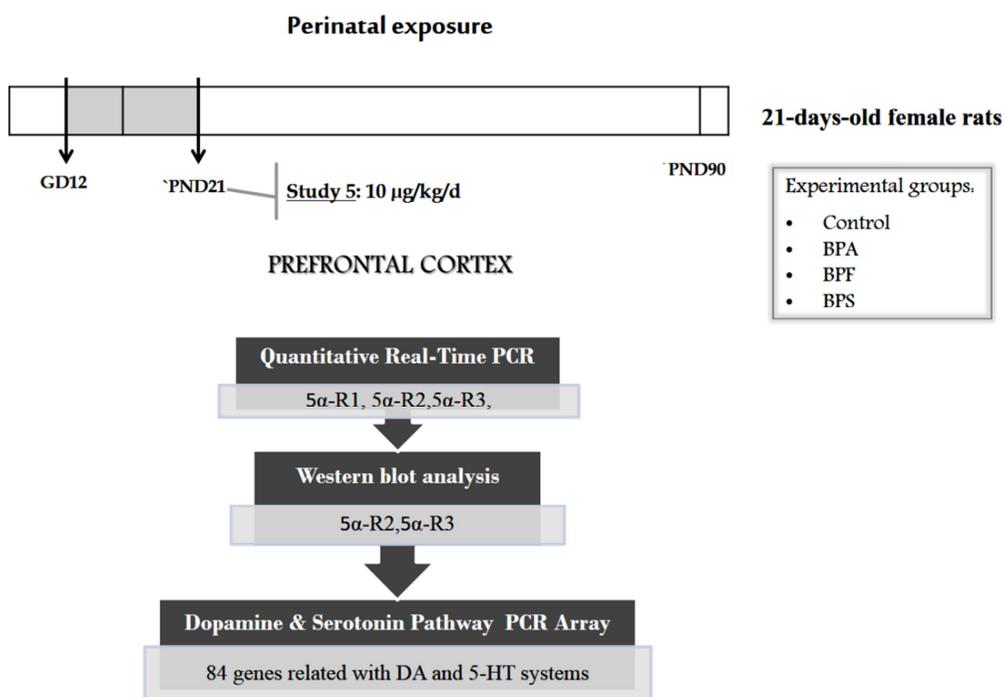


Figure 3.20: Experimental design Study 5: *Effects of perinatal* exposure to Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S on precortical 5α -reductase and, dopamine-serotonin systems related genes in female rats. Gestating rats were treated with either vehicle or 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPs (BPA, BPF or BPS) from gestational day (GD) 12 to parturition. Then, female pups were exposed from postnatal day (PND) 1 through day 21, when they were euthanized and RT-PCR, western blot and PCR-array experiments were performed.

Resultados

- **Análisis del perfil de expresión de los isoenzimas 5α -R**

La administración de BPA, BPF o BPS no produjo ningún cambio significativo en la expresión de 5α -R1, en comparación con las ratas no expuestas (Fig. 3.21). En cambio, los niveles de ARNm de 5α -R2 fueron disminuidos significativamente en las ratas tratadas con BPA, en comparación con los controles (Fig. 3.22, panel A). No se observaron efectos significativos sobre esta isoenzima en las ratas tratadas con BPF o BPS. El análisis de la expresión de la proteína 5α -R2 mostró una correlación con los niveles de ARNm hallados en las ratas tratadas con BPA (Fig. 3.22, panel C).

Por otra parte, los niveles de ARNm de 5α -R3 fueron disminuidos significativamente en todos los grupos tratados con BPs, en comparación con las ratas no expuestas (Fig. 3.22, panel B), el mayor descenso fue obtenido en el grupo que recibió BPA. Sólo la exposición a BPA disminuyó los niveles proteicos de 5α -R3 (Fig. 3.22, panel D).

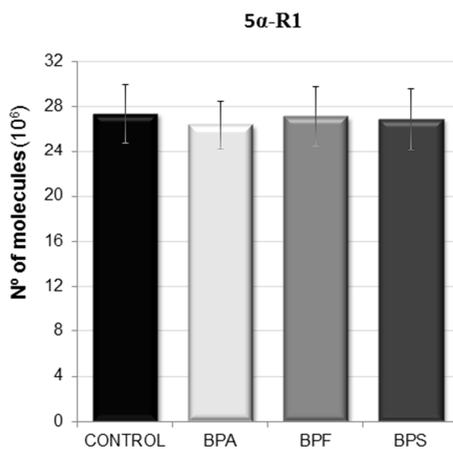


Figure 3.21: mRNA levels of 5α -Reductase type I (5α -R1) in prefrontal cortex of Control, and BPA-, BPF- and BPS-treated female rats at postnatal day 21. ($n=12$ animals from 6 litters in all cases). Error bars indicate SE.

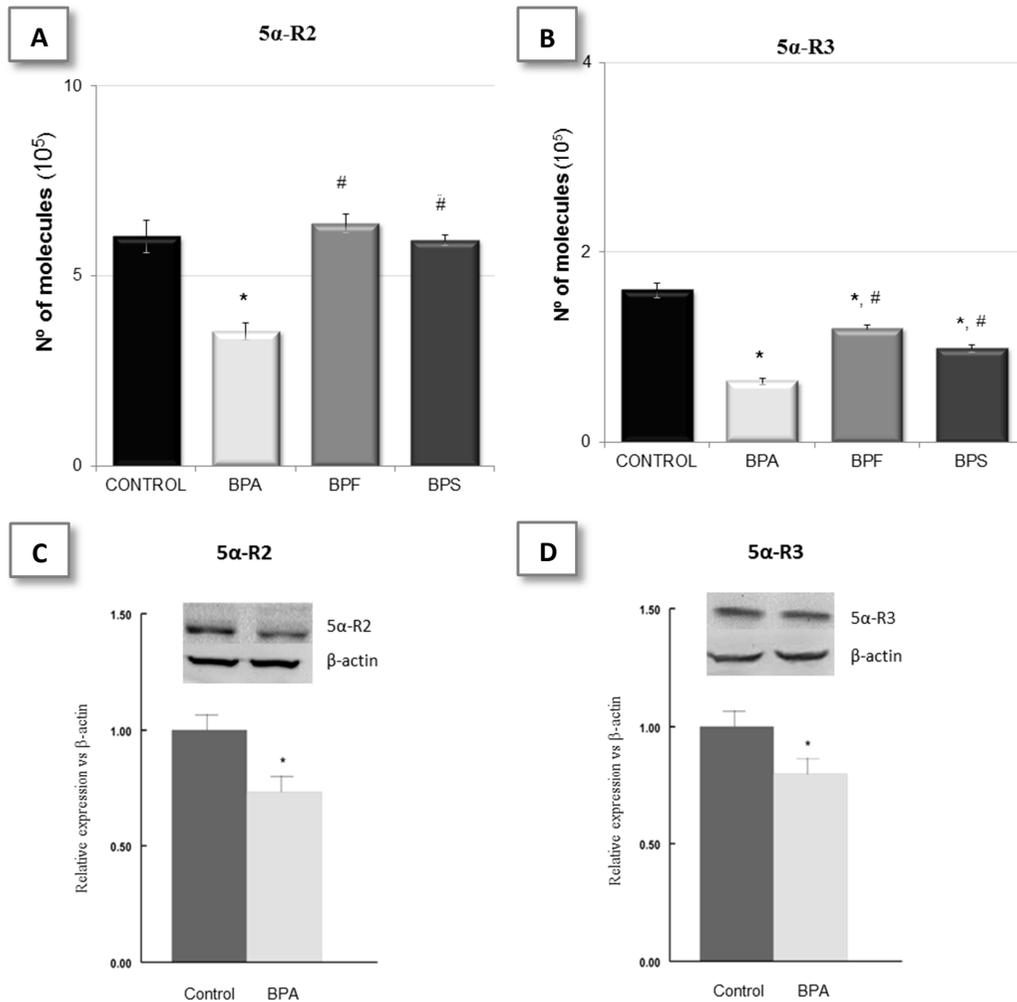


Figure 3.22: Panel A and B: mRNA levels of 5α-Reductase type 2 (5α-R2) and type 3 (5α-R3) in prefrontal cortex of Control, and BPA-, BPF- and BPS-treated female rats at postnatal day 21. ($n = 12$ animals from 6 litters in all cases).

Panel C and D: Effects of BPA on protein levels of 5α-R2 and 5α-R3 in prefrontal cortex of controls and BPA-treated female rats. ($n \geq 6$ animals from 6 litters in all cases).

* $p < 0.05$ compared with vehicle controls, and # $p < 0.05$ comparing BPF or BPS with BPA. Error bars indicate SE.

- **Regulación transcripcional de genes relacionados con los sistemas dopaminérgico/serotoninérgico (PCR-arrays)**

La exposición perinatal a BPA, BPF o BPS reguló en ambos sentidos algunos de los 84 genes analizados en el PCR-array utilizado (*Rat Dopamine & Serotonin Pathway PCR Array*) (Fig. 3.23). Concretamente, 7 genes fueron regulados por BPA (*Cyp2d4*, *Ddc*, *Grk6*, *Htr7*, *Pdyn*, *Slc18a2*, *Tdo2*); 17 genes por BPF (*Adcy1*, *Adcy2*, *Akt1*, *Akt3*, *App*, *Comt*, *Cyp2d4*, *Dbh*, *Ddc*, *Htr1a*, *Htr1d*, *Htr4*, *Nr4a1*, *Pde4c*, *Slc18a1*, *Slc18a2*, *Syn2*) y 9 genes por BPS (*Adcy2*, *Cyp2d4*, *Dusp1*, *Grk6*, *Htr4*, *Nr4a1*, *Pde4b*, *Slc18a1*, *Tph1*). En la Tabla 3.6 se muestra la lista de genes modificados, así como información complementaria.

Los genes modulados en común o específicamente por estos BPs se muestran en la Figura 3.24. Sólo un gen (*Cyp2d4*) fue identificado como una diana génica común para BPA, BPF y BPS.

<i>GenBank™ Accession no.</i>	<i>Gene Symbol</i>	<i>Full name</i>
NM_001107239	<i>Adcy1</i>	Adenylate cyclase 1
NM_031007	<i>Adcy2</i>	Adenylate cyclase 2
NM_033230	<i>Akt1</i>	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
NM_031575	<i>Akt3</i>	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)
NM_019288	<i>App</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein
NM_012531	<i>Comt</i>	Catechol-O-methyltransferase
NM_138515	<i>Cyp2d4</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 4
NM_013158	<i>Dbh</i>	Dopamine beta-hydroxylase
NM_012545	<i>Ddc</i>	Dopa decarboxylase
NM_053769	<i>Dusp1</i>	Dual specificity phosphatase 1
NM_031657	<i>Grk6</i>	G protein-coupled receptor kinase 6
NM_012585	<i>Htr1a</i>	5-hydroxytryptamine receptor 1A
NM_012852	<i>Htr1d</i>	5-Hydroxytryptamine receptor 1D
NM_012853	<i>Htr4</i>	5-hydroxytryptamine receptor 4
NM_022938	<i>Htr7</i>	5-hydroxytryptamine receptor 7
NM_024388	<i>Nr4a1</i>	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
NM_017031	<i>Pde4b</i>	Phosphodiesterase 4B, cAMP specific
NM_001276765	<i>Pde4c</i>	Phosphodiesterase 4C, cAMP-specific
NM_019374	<i>Pdyn</i>	Prodynorphin
NM_013152	<i>Slc18a1</i>	Solute carrier family 18, member 1
NM_013031	<i>Slc18a2</i>	Solute carrier family 18, member 2
NM_019159	<i>Syn2</i>	Synapsin II
NM_022403	<i>Tdo2</i>	Tryptophan 2,3-dioxygenase
NM_001100634	<i>Tph1</i>	Tryptophan hydroxylase 1

Table 3.6: List of PCR array genes significantly altered by BPA, BPF or BPS treatment in prefrontal cortex of 21-days-old female rats. The table contains data from the genes showed in Figures 3.23 and 3.24.

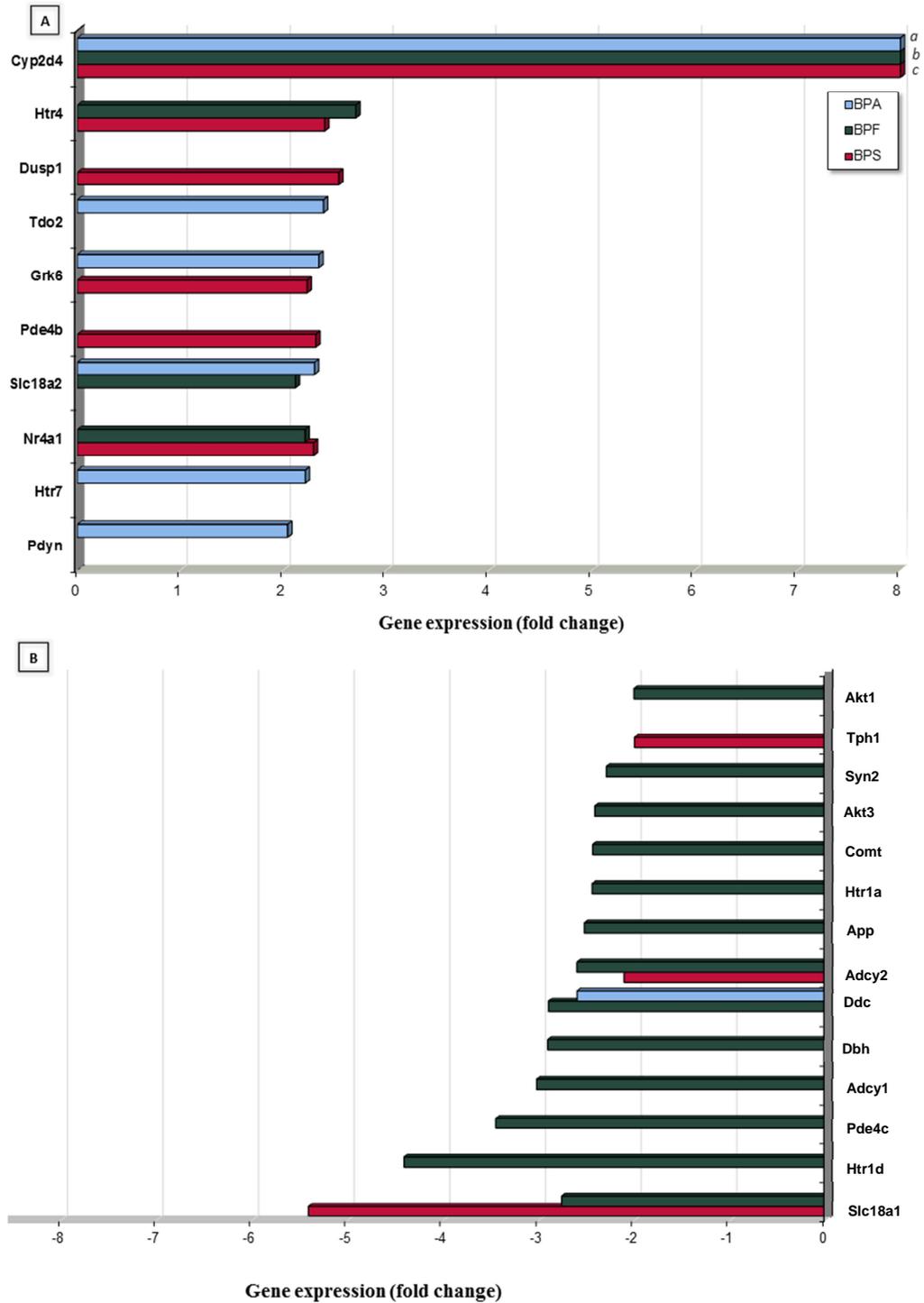


Figure 3.23: Dopamine and serotonin related genes up-regulated (A) and down-regulated (B) by BPA, BPF or BPS in prefrontal cortex of female rats at postnatal day 21. ^a35.5-fold change (BPA). ^b18.1-fold change (BPF). ^c35.8-fold change (BPS). >2-fold change; t-test with Benjamini-Hochberg correction, p-value <0.05

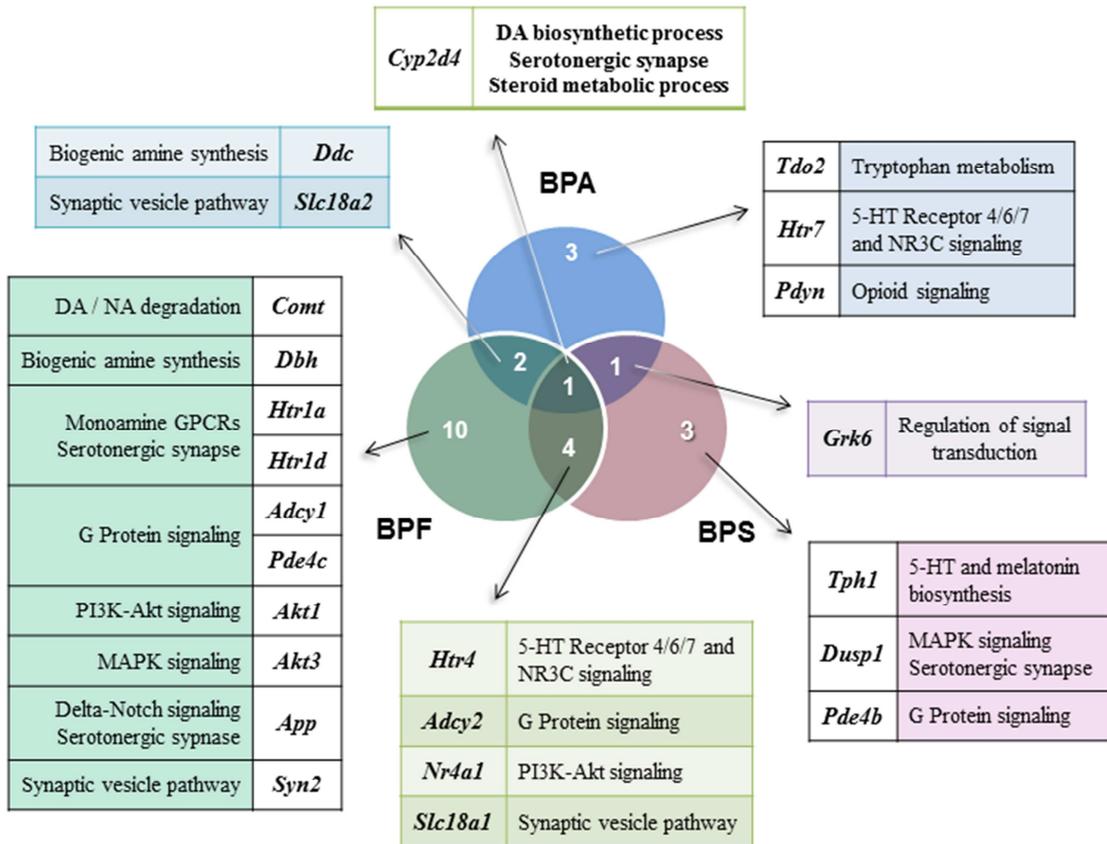


Figure 3.24: Venn diagram showing the overlap in genes significantly altered by BPA, BPF or BPs treatments. Pathways associated are also shown. DA: dopamine, GPCR: G protein-coupled receptors, 5-HT: serotonin, NA: noradrenaline

Discusión

El presente estudio proporciona el primer conjunto de evidencias indicando que la exposición temprana a bajas dosis de BPA, BPF o BPS modifica la expresión de las isoenzimas 5α -R y altera el perfil de transcripción de genes ligados con los sistemas DA y 5-HT en la CPF de ratas hembras jóvenes.

Efectos sobre las isoenzimas 5α -R

En este trabajo, BPA disminuyó 5α -R2 sin afectar la expresión de 5α -R1, lo cual difiere de nuestros hallazgos descritos en el *Estudio 3* realizado con ratas adultas. Las diferencias entre ambos estudios podrían reflejar efectos temporales o compensatorios, como resultado de diferencias en los tiempos de exposición o mecanismos dosis-dependientes (Vandenberg et al. 2012). Otra posibilidad es que el BPA, debido a su actividad anti-androgénica a través del RA (Lee et al. 2003), podría regular diferencialmente 5α -R1 y 5α -R2 dependiendo de la edad de exposición, como trabajos previos de nuestro grupo de investigación han indicado para el agonista del RA, DHT (Sánchez et al. 2005; Torres and Ortega 2006).

Aunque investigaciones anteriores llevadas a cabo en nuestro laboratorio evidenciaron que 5α -R1 es la isoenzima más abundante en la CPF de ratas hembra jóvenes (Sánchez et al. 2005, 2006), tanto 5α -R1 como 5α -R2 presentan una capacidad mayor para reducir PROG que otros substratos esteroideogénicos (Negri et al. 1996). Esto implicaría que los niveles del metabolito de la progesterona (AloP) podrían estar disminuidos en ratas tratadas con BPA. Este hecho tiene una importancia especial ya que AloP, a parte de su papel en el desarrollo de psicopatologías (Schüle et al. 2014), promueve la proliferación de células progenitoras neuronales (Wang et al. 2005), proceso de gran relevancia durante la etapa de la vida estudiada.

Llama la atención la disminución de los niveles de ARNm de 5 α -R3 tras el tratamiento con estos tres BPs. A pesar de ello, solo los niveles proteicos de esta isoenzima fueron modificados en el grupo tratado con BPA, lo cual podría ser debido al descenso mayor de su transcripción obtenido en estas ratas comparado con los grupos tratados con BPF o BPS. No se conocen muy bien las funciones fisiológicas de 5 α -R3, dado su reciente descubrimiento, no obstante en el cerebro esta isoenzima juega, al menos, un papel importante en la N-glicosilación de proteínas (Cantagrel et al. 2010). La deficiencia congénita de 5 α -R3 ha sido ligada con una enfermedad rara en la cual los pacientes nacen con retraso mental (Cantagrel et al. 2010). Por tanto, se hace necesario realizar estudios futuros para identificar las implicaciones en la salud humana de estos hallazgos.

Efectos sobre genes relacionados con los sistemas DA y 5-HT

Nuestros resultados mostraron que estos tres BPs administrados modifican la transcripción de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de neurotransmisores (*véase Fig. 3.25 para una mejor comprensión*). Así, el tratamiento con BPA resultó en un incremento de la transcripción de la triptófano 2,3-dioxigenasa (*Tdo2*), enzima que cataliza el primer paso y limitante de la vía de quinurenina, la principal ruta metabólica de la degradación del triptófano (Wolf, 1974). Como resultado, la cantidad de triptófano disponible para la síntesis de 5-HT podría verse comprometida. Interesantemente, una ligera sobre-expresión de *Tdo2* ha sido descrita en la corteza frontal de pacientes con esquizofrenia (Miller et al. 2004), una patología que ha sido ligada también con la exposición a BPA (Brown, 2009). Adicionalmente, ambos BPA y BPF, disminuyeron los transcritos de la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) descarboxilasa, enzima que cataliza la descarboxilación de DOPA y 5-hidroxitriptófano (5HTP) a DA y 5-HT, respectivamente. Como muestran nuestros resultados, BPS es capaz también de afectar la síntesis de 5-HT a través del descenso de la transcripción de *Tph1*. Por lo tanto, parece que BPA, BPF y BPS podrían disminuir la síntesis precortical de 5-HT a través de la vía clásica.

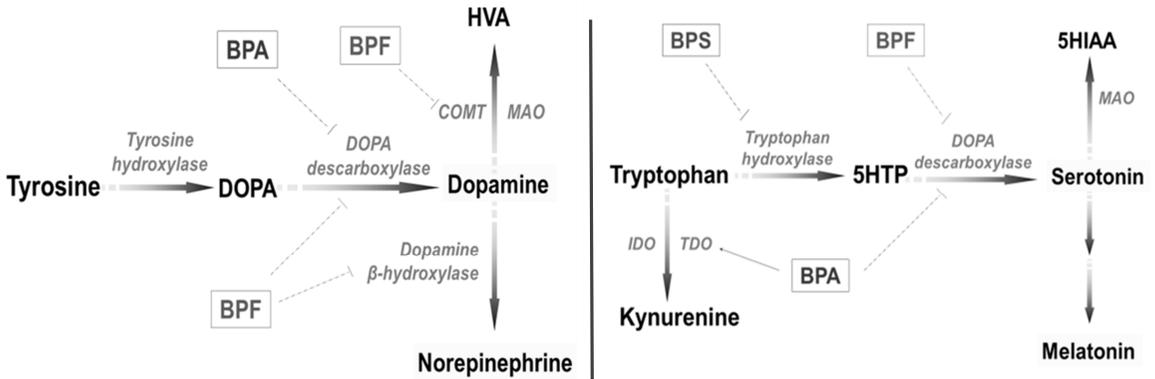


Figure 3.25: Metabolizing enzymes of dopamine and serotonin altered by BPA, BPF or BPS.

COMT: Catechol-O-methyl transferase, DOPA: 3,4-dihydroxyphenylalanine, IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase, MAO: monoamine oxidase, TDO: tryptophan 2,3-dioxygenase, 5HTP: 5-hydroxytryptophan

Cabe considerar, por otra parte, que BPF podría interferir con la síntesis de noradrenalina, vía descenso de DA beta-hidroxilasa (*Dbh*), así como con la degradación de catecolaminas, vía catecol-O-metiltransferasa (*Comt*). Debe señalarse que ni BPA ni BPS mostraron efectos significativos sobre la transcripción de enzimas degradadoras de DA y 5-HT. Sin embargo, un incremento en el metabolito de 5-HT, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), así como del cociente 5-HIAA/5-HT y en el recambio (*turnover*) de DA han sido observados en algunas áreas cerebrales después del tratamiento con BPA (Honma et al. 2006; Matsuda et al. 2013). Diferentes mecanismos del BPA podrían explicar estas discrepancias, incluyendo a través de la modificación de la actividad de la enzima monoamino oxidasa (MAO) por BPA (Matsuda et al. 2012).

Además de los cambios presinápticos, la actividad dopaminérgica y serotoninérgica puede ser afectada también por BPs a través de la interrupción de la expresión y/o función de receptores de DA y 5-HT. A este respecto y, tal y

como se indicó previamente, BPA sobre-regula el R1D en la zona límbica anterior de ratones machos perinatalmente expuestos (Narita et al. 2006; Suzuki et al. 2003). Sin embargo, en este trabajo no se obtuvo ningún efecto de estos BPs en los transcritos de RsD, lo cual podría ser debido a efectos sexo-específicos. Por el contrario, BPA, BPF y BPS afectó la transcripción de algunos de los receptores de 5-HT estudiados. Ambos, BPF y BPS, incrementaron los transcritos de *Htr4*. Existe evidencia de que este receptor, vía activación de la adenilato ciclasa (*Adcy*) y, de este modo, incrementando los niveles intracelulares de AMPc, mejora el funcionamiento cognitivo (Eglen et al. 1995). Sin embargo, una disminución de la transcripción de *Adcy1* y *Adcy2* fue observada también en estos grupos experimentales. Esto podría ser agravado además por un incremento en el gen que codifica la enzima que hidroliza AMPc (fosfodiesterasa, *Pde4b*) por BPS.

Otro hallazgo relevante fue que BPF exhibió cambios importantes en el perfil de expresión de genes relacionados con la neurogénesis y el desarrollo. Además de la disminución del receptor de 5-HT 1A (*Htr1a*), un regulador positivo de la neurogénesis cortical (Vitalis et al. 2013), BPF disminuyó los transcritos de *App*, involucrado en el crecimiento de neuritas y la axogénesis (Milward et al. 1992; Perez et al. 1997) y *Syn2*, implicada en el crecimiento de neuritas y formación sináptica (Fornasiero et al. 2010). *Akt1*, que regula precursores progenitores corticales (Sinor and Lillien 2004), fue también disminuido por este químico.

Uno de los hallazgos más fascinantes que observamos fue los efectos sobre *Cyp2d4* por estos tres BPs administrados. Recientemente, ha sido sugerido que DA y 5-HT podrían ser producidas en el cerebro por una vía alternativa de señalización mediada por citocromo P450 (CYP2D) (Bromek et al. 2010; Haduch et al. 2013). Este es el primer estudio, a nuestro conocimiento, en demostrar que BPA, BPF y BPS produce una fuerte inducción de la transcripción de *Cyp2d4*, la isoforma principal de la subfamilia CYP2D presente en el cerebro de rata (Hiroi et al. 1998). Este hecho podría no ser debido a la

débil actividad estrogénica que presentan estos BPs, dado que los estrógenos incrementan ligeramente la expresión de *Cyp2d* (Bergh and Strobel 1996) y, por otra parte BPS, el cual presenta una estrogenicidad más baja (Chen et al. 2002), produjo una inducción mayor de *Cyp2d4* comparado con las ratas tratadas con BPF.

Aunque el significado fisiológico de la formación de DA y 5-HT mediada por *Cyp2d4* todavía no se ha clarificado, es sabido que *Cyp2d4* cataliza en el cerebro la C21-hidroxilación de PROG, 17-hidroxi-PROG y AloP (Kishimoto et al. 2004). Por tanto, su pronunciado incremento por BPs podría contribuir a dos hechos importantes: (a) un mayor descenso en los niveles de AloP, con sus potenciales consecuencias negativas derivadas, y/o (b) un incremento en los niveles de corticosteroides locales. La enorme importancia de los corticoesteroides en el cerebro en desarrollo hace este evento de particular preocupación. En efecto, los corticosteroides regulan procesos de muerte celular apoptótica en el SNC (Almeida et al. 2000) y su incremento podría resultar en una degeneración de capas específicas de la CPF (Cerqueira et al. 2005). Aunque Rosenmai y cols. (2014) describieron que BPF incrementa y, BPA o BPS disminuyen, los niveles de corticoesteroides en células H295R de adeno-carcinoma, Poimenova y cols. (2010) describieron, en línea con nuestros resultados, un incremento en los niveles plasmáticos de corticosteroides en ratas hembra adolescentes expuestas a través de la gestación y la lactación a BPA.

Este estudio provee las primeras evidencias *in vivo* de los potenciales efectos neurotóxicos de BPF y BPS. Aunque son necesarios estudios adicionales para definir las implicaciones de las alteraciones descritas anteriormente, nosotros mostramos aquí mecanismos moleculares posibles a través de los cuales estos BPs podrían afectar comportamientos dependientes de la CPF y conferir cierto riesgo para el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos.

En conjunto, se observaron diferentes patrones de expresión, indicando que estos BPs podrían tener mecanismos de acción diferentes y,

consecuentemente, efectos diferentes en el cerebro en desarrollo. Consideración especial debe ser tomada en cuenta con el BPF, que mostró un peor perfil neurotóxico. A pesar de que BPS produjo menos efectos neurotóxicos con respecto a los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico precorticales, su acción pronunciada sobre el gen que codifica la enzima Cyp2d4 sugiere que podría no ser un sustituto seguro de BPA.

Capítulo 4

DISCUSIÓN GENERAL

Capítulo 4

DISCUSIÓN GENERAL

Los EDCs no presentan una relación unívoca dosis-respuesta, de hecho un mismo EDC tiene diferentes modos de actuación según la concentración a la que se encuentre y según el momento específico de desarrollo del tejido con el que contacte. Los efectos adversos causados pueden variar dependiendo del equilibrio hormonal de la persona expuesta (que depende de la edad y del sexo entre otros factores), además éstos pueden manifestarse tras periodos de latencia de varios años (Colborn 2004).

1. Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad

Aunque la determinación de la relación dosis-respuesta en los efectos observados en las ratas expuestas a BPA no se estableció como objetivo de la presente Tesis doctoral, los resultados del *Estudio 1* (llevado a cabo en próstata de rata con diferentes dosis de BPA) pusieron de manifiesto los siguientes hechos: (a) a mayor dosis de BPA hubo un mayor descenso de los niveles de T plasmáticos, salvo para la dosis de 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, que no mostraron diferencias significativas entre ellas; (b) BPA produjo un incremento en los niveles de E2 plasmáticos independientemente de la dosis (todas mostraron el mismo efecto); (c) respecto a los niveles de mRNA de las isoenzimas $5\alpha\text{-R1}$ y $5\alpha\text{-R2}$, aunque se observó un mayor descenso en las ratas tratadas con dosis mayores de BPA, algunas de las dosis administradas no tuvieron diferencias significativas entre ellas; (d) no se observó una relación dosis-respuesta lineal en los niveles de transcritos de $5\alpha\text{-R3}$ y aromatasa.

La evaluación del riesgo en toxicología se basa en la asunción de que a mayor dosis de exposición mayor riesgo, derivando en una curva dosis-respuesta monótonica, en la que existe un límite por debajo del cual no existe riesgo (principio toxicológico de que “*la dosis hace el veneno*”, postulado por Paracelso). Los resultados de este estudio sustentan la hipótesis de que muchas sustancias químicas con actividad endocrina, entre ellas el BPA, pueden no responder a curvas dosis-respuesta lineales. No obstante, se hace necesario la administración de un rango de dosis más amplio que el utilizado en este estudio para caracterizar, de forma más precisa, la relación dosis-respuesta en los efectos observados.

Es interesante señalar que el nivel de efecto adverso observable más bajo (LOAEL) para el BPA fue fijado en los años 80 en 50 mg/kg/d, en base a él la EPA calculó una dosis de referencia (o *dosis segura*) de BPA de 50 µg/kg/d. Desde entonces y, en línea con los resultados obtenidos en esta Tesis, numerosos estudios han descrito efectos adversos del BPA a niveles más bajos que los calculados como “seguros”.

2. Mecanismos de acción específicos de tejido

Si se comparan los efectos del BPA sobre las isoenzimas 5 α -R y la enzima aromatasa en próstata (*Estudio 1*) y CPF (*Estudio 3*) de rata macho adulta sometidas al mismo régimen de administración (4 días, 50 µg/kg/d), se observan los siguientes hechos: (i) aromatasa es incrementada en ambos tejidos por BPA, (ii) BPA afecta la expresión de las tres isoenzimas de 5 α -R en la próstata, no teniendo, sin embargo, efecto en la expresión de estas isoenzimas a nivel de CPF (véase Tabla 4.1). Los efectos observados sobre las isoenzimas 5 α -R corroboran la hipótesis de que el BPA produce efectos diferentes según el tejido analizado (Richter et al., 2007b). De hecho, aunque en nuestro caso BPA incrementó la expresión de aromatasa en ambos tejidos, se han encontrado efectos opuestos en

diferentes tejidos y/o líneas celulares (Kamat et al., 2002; Kwintkiewicz et al., 2010).

Órgano	Período	Género	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$)	Estudio	5 α R1	5 α R2	5 α R3	Aromatasa
Próstata	adultas	M	50	1	↓	↓	↑	↑
CPF	adultas	M	50	3	NO	NO	NO	↑
CPF	adultas	H	50	3	↓	NO	NO	↑ (ARNm)
CPF	jóvenes	H	10	5	NO	↓	↓	----

Tabla 4.1: Resumen comparativo de los principales resultados obtenidos en la regulación de 5 α -R y aromatasa por BPA. Abreviaturas y símbolos: H, hembra; M, macho; NO: no efecto; ↓ disminución; ↑ aumento

3. Implicaciones del período de exposición

Hay periodos de vulnerabilidad durante el cual la exposición a EDCs puede ser particularmente dañina. La mayor preocupación respecto a la exposición a EDCs se centra en la etapa de desarrollo fetal y la vida posnatal temprana hasta la adolescencia. Durante estos periodos, críticos en el desarrollo de los órganos, pueden ocurrir efectos adversos permanentes, incluyendo efectos que pueden ser transmitidos a través de las generaciones (Anway et al., 2005). La mayor susceptibilidad a los efectos de la exposición a BPA y otros agentes químicos en fetos y niños es, en parte, debida a cambios que ocurren en la capacidad para metabolizar el BPA relacionados con la edad. Durante estos periodos, en los que las enzimas metabolizadoras no han alcanzado sus niveles óptimos, dosis de exposición a EDCs muchos más bajas que en el adulto pueden ocasionar efectos perjudiciales.

En el *Estudio 5* de esta Tesis, las ratas hembra tratadas perinatalmente con una dosis baja de BPA (10 µg/kg/d) mostraron efectos muy diferentes respecto a los niveles de las isoenzimas 5α-R en comparación con las ratas adultas sometidas a un tratamiento agudo con una dosis mayor (50 µg/kg/d) (Tabla 4.1). No obstante, cabe señalar que se tratan de regímenes de administración diferentes (crónica *vs* aguda), lo que dificulta la comparación.

Por otra parte, es sabido que los efectos de la exposición durante el periodo perinatal pueden no manifestarse hasta mucho más tarde en la vida. Este hecho se tuvo en consideración en el *Estudio 4* de la presente Tesis doctoral, en donde se evaluó los efectos de la exposición perinatal sobre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en el estado adulto. Los resultados obtenidos confirmaron dicha hipótesis.

Cabe señalar, que los efectos que ocurren durante la exposición adulta al BPA son considerados reversibles y, por ello (entre otros motivos), la evaluación del riesgo en estos sujetos ha gozado de un menor interés por parte de la comunidad científica y las agencias evaluadoras. No obstante, cada vez son más las publicaciones que muestran que la exposición adulta a BPA puede interferir con funciones fisiológicas importantes. A este respecto, Leranth y cols. (2008a,b) han demostrado que la exposición adulta a BPA interfiere con la formación de sinápsis inducidas por estrógenos y T en áreas cerebrales límbicas (entre ellas la CPF) de roedores y primates no humanos, lo cual, según estos autores, podría tener consecuencias adversas en diferentes procesos cognitivos y emocionales.

Hay que tener en cuenta que la exposición a este compuesto químico se produce de una forma continua en el humano, con lo cual los efectos observados en el estado adulto podrían ser mantenidos a lo largo del tiempo, llegando incluso a alterar los mecanismos homeostáticos. Asimismo, el potencial de bioacumulación del BPA en el organismo debe ser tenido en cuenta.

4. Evaluación de los efectos sexo-específicos

Nuestros resultados muestran diferencias de género tanto en los efectos del BPA sobre la expresión de las isoenzimas 5α -R (Tabla 4.1) y, probablemente de AloP, como en los efectos observados en genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico (Tabla 4.2). Al respecto, otros autores también han observado diferencias en hembras y machos expuestos a BPA en relación a los niveles de DA, 5-HT y sus metabolitos, en diferentes áreas cerebrales de roedores (Matsuda et al. 2010, 2012, 2013; Nakamura et al., 2010). Asimismo, ha sido descrito que la exposición a BPA resulta en diferencias sexo-específicas en el comportamiento de animales de experimentación y niños (Braun et al., 2011; Beronius et al., 2013). Los resultados aquí mostrados podrían explicar, al menos en parte, algunas de las diferencias de género manifestadas por estos sujetos, dado que, como se mencionó anteriormente, la CPF está implicada en el control de comportamientos y funciones complejas, incluyendo procesos de memoria y aprendizaje (Fuster, 2001).

Una limitación de los trabajos que integran esta Tesis es que no van acompañados de otros parámetros bioquímicos o funcionales, por ejemplo cambios en los niveles de los neurotransmisores DA y 5-HT o estudios de análisis del comportamiento para evaluar resultados fenotípicos tales como aprendizaje y memoria, ansiedad y depresión, agresividad, etc., lo cual constituiría un valor añadido de indudable importancia. No obstante, el interés de los estudios moleculares radica en que los cambios a este nivel (molecular) preceden (y predicen en muchas ocasiones) los eventos a nivel fisiológico.

Algunos desórdenes psiquiátricos (entre ellos trastornos relacionados con el estado del ánimo y ansiedad) muestran diferencias significativas entre género, relativo a los niveles de riesgo y severidad, lo que sugiere que los niveles de hormonas sexuales endógenas (y los genes regulados por ellas) juegan un papel importante (Westberg and Eriksson, 2008). Siguiendo este razonamiento los EDCs, interfiriendo con la homeostasis hormonal, podrían alterar la

vulnerabilidad humana para patologías neurológicas. En esta línea, en el *Estudio 3* sugerimos que, dado que alteraciones en los niveles de AloP han sido implicadas en la vulnerabilidad para diversas patologías mentales y emocionales vía R-GABA_A (p.e. depresión postparto, depresión mayor y epilepsia) (Birzniece et al., 2006; Turkmen et al., 2011), niveles cerebrales reducidos de 5 α -R1 en las ratas hembra expuestas a BPA podrían contribuir a un incremento de la susceptibilidad a estos desórdenes en este género.

Resulta asimismo interesante que algunos estudios indican que la exposición a EDCs podría estar asociada con depresión debido a cambios en los sistemas de neurotransmisión, principalmente en la vía de neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica (Chen et al., 2011; Santiago et al., 2010).

Período	Género	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$)	Estudio	Genes DA		Genes 5-HT	
				↑	↓	↑	↓
Adultas	M	50	3		<i>Drd2</i>	<i>Tph2</i>	
Adultas	H	50	3			<i>Tph2</i>	
Jóvenes	M	10	4		<i>Drd2</i> <i>Drd3</i> <i>Drd5</i> <i>Gdnf</i>	<i>Slc6a4</i>	<i>Htr3a</i>
Adultas	M	10	4	<i>Drd3</i> <i>Th</i>	<i>Gdnf</i>		<i>Tph2</i>
Jóvenes	H	10	5	<i>Slc18a2</i>	<i>Ddc</i>	<i>Slc18a2</i> <i>Tdo2</i> <i>Htr7</i>	

Table 4.2: Resumen comparativo de los principales resultados obtenidos en la regulación de genes relacionados con los sistemas dopaminérgico (DA) y serotoninérgico (5-HT) por BPA. Abreviaturas y símbolos: H, hembra; M, macho; ↓ disminución; ↑ aumento

5. Otras consideraciones

La ruta de administración en los trabajos integrantes de la presente Tesis doctoral ha sido la s.c., mientras que la principal vía de exposición en el humano es la ingestión. Esta ruta ha sido elegida con objeto de realizar adecuadamente estudios mecanísticos de acuerdo con Batista y cols. (2012).

Después de la administración a roedores de una misma dosis de BPA vía oral y s.c. resulta en niveles de BPA libre (forma bioactiva) más altos tras ésta última exposición, debido a su metabolización hepática después de su ingestión (Doerge et al., 2010, 2011). Sin embargo, debido a la limitada actividad de conjugación del BPA en el hígado de recién nacidos, los efectos de la ruta de administración en los niveles de BPA no conjugados obtenidos son significativamente menores (Prins et al., 2011; Taylor et al., 2008).

Interesantemente, Gayrard y cols. (2013) pusieron de manifiesto que el BPA posee una elevada absorción sublingual (aprox. 70 %), similar a la obtenida tras la administración intravenosa (i.v.), resultado en concentraciones altas de BPA no conjugado en sangre arterial (sangre que va directamente a tejidos y células). Es interesante destacar que Gayrard y cols. realizaron sus estudios en perros, modelos aceptados para el estudio de la exposición oral en humanos. Además, los valores circulantes de BPA libre obtenidos fueron mucho mayores que los reportados tras la administración por sonda nasogástrica.

Para la estimación de los riesgos asociados a la exposición al BPA en humanos, las agencias reguladoras en Europa y EE.UU están usando un modelo basado en que todas las exposiciones a BPA en el ser humano pueden ser evaluadas por una única administración por sonda nasogástrica en bolo (Patterson et al., 2013), desestimando otras rutas de exposición que pueden evitar el metabolismo de primer paso, tales como la sublingual y la dérmica (vom Saal and Welshons, 2014). Al respecto, se ha sugerido que el BPA presente

en el papel térmico podría ser un factor importante a tener en cuenta en los niveles séricos elevados de BPA no conjugado que han sido medidos en humanos (vom Saal and Welshons, 2014). Debido a diferencias en la permeabilidad de la piel, las mujeres podrían permitir un mayor transporte transdérmico de BPA, hecho que podría verse incrementado por un mayor uso de cremas en estos sujetos (Singh and Morris, 2011).

En base a los resultados de sus estudios, vom Saal y Welshons (2014) indicaron recientemente que una exposición continua (vía cápsulas implantadas subcutáneamente) podría ser un modelo mejor para evaluar la exposición humana que la exposición por bolo oral una vez por día. Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo podrían ser extrapolados a la vida real.

Conclusions

1. Adult exposure to BPA might increase the risk of prostate disease via modifications on 5α -R and aromatase expression.
2. BPA decreases 5α -R1 and 5α -R2 transcription in the adult prostate independently of circulating T.
3. Adult short-term exposure to BPA causes alterations in the expression of genes involved in PFC physiopathology that might affect its function and increase the risk for several psychopathologies.
4. Perinatal exposure to BPA produces short- and long-term consequences in precortical DA and 5-HT systems-related genes.
5. BPA, BPF and BPS showed different gene expression patterns, indicating that they might have different mechanisms of action, and consequently different effects, in the developing brain.

Referencias

Referencias

- Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, et al. 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145: 592–603.
- AFC (EFSA). 2006. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE. The EFSA Journal 428: 1-75.
- Allen PP, Cleare AJ, Lee F, et al. 2006. Effect of acute tryptophan depletion on pre-frontal engagement. *Psychopharmacology* 187: 486-497.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. 2013. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 138:155-175.
- Almeida OF, Conde GL, Crochemore C, et al. 2000. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* 14:779-790.
- Almstrup K, Fernández MF, Petersen JH, et al. 2002. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. *Environ Health Perspect* 110:743-748
- Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, et al. 2005. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ Health Perspect* 113:969-977.
- Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, et al. 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 114:106-112.
- Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 7:346–353.
- Anway MD, Cup AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466–1469.
- Arase S, Ishii K, Igarashi K, et al. 2011. Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. *Biol Reprod* 84: 734-742.
- Arnsten AF. 2006. Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: circuits and pathways. *J Clin Psychiatry* 67:7-12.
- Arnsten AF, Li BM. 2005. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57:1377-1384.
- Ashby J, Tinwell H, Haseman J. 1999. Lack of Effects for Low Dose Levels of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on the Prostate Gland of CF1 Mice Exposed in Utero. *Regul Toxicol Pharmacol* 30:156–166.
- Avissar S, Matuzany-Ruban A, Tzukert K, Schreiber G. 2004. Beta-arrestin-1 levels: reduced in leukocytes of patients with depression and elevated by antidepressants in rat brain. *Am J Psychiatry* 161: 2066–2072.
- Avissar-Whiting M, Veiga KR, Uhl KM, et al. 2010. Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in

- placental cells. *Reprod Toxicol* 29:401-406.
- Bakker J, De Mees C, Douhard Q. 2006. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nature Neuroscience* 9:220-226.
- Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, et al. 2010. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 202:393.e1-7.
- Batista TM, Alonso-Magdalena P, Vieira E, et al. 2012. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS One* 7: e33814.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182-217.
- Becker K, Göen T, Seiwert M, et al. 2009. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 212:685-692.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *JR Stat Soc Ser B* 57:289-300.
- Bergh AF, Strobel HW. 1996. Anatomical distribution of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P4502D forms in rat brain: effects of xenobiotics and sex steroids. *Mol Cell Biochem* 162:31-41.
- Beronius A, Johansson N, Rudén C, Hanberg A. 2013. The influence of study design and sex-differences on results from developmental neurotoxicity studies of bisphenol A: implications for toxicity testing. *Toxicology* 311:13-26
- Bilyeu B, Brostow W, Menard K, inventors; University of North Texas, assignee. Halogen containing epoxy composition and their preparation. US patent 20050228080. April 12, 2005.
- Birzniece V, Backstrom T, Johansson IM, et al. 2006. Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. *Brain Res Rev* 51: 212-239.
- Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. 2007. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* 115:69-76.
- Bortolato M, Frau R, Godar SC, et al. 2013. The implication of neuroactive steroids in Tourette syndrome pathogenesis: a role for 5 α -reductase? *J Neuroendocrinol* 25:1196-208.
- Boucher JG, Husain M, Rowan-Carroll A, et al. 2014. Identification of mechanisms of action of bisphenol a-induced human preadipocyte differentiation by transcriptional profiling. *Obesity (Silver Spring)* 22:2333-2343.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, et al. 2011. Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics* 128:873-882.
- Brinton RD. 2013. Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 9:241-250.
- Bromek E, Haduch A, Daniel WA. 2010. The ability of cytochrome P450 2D isoforms to synthesize dopamine in the brain: an in vitro study. *Eur J Pharmacol* 626:171-178.

- Brown JS Jr. 2009. Effects of bisphenol-A and other endocrine disruptors compared with abnormalities of schizophrenia: An endocrine disruption theory of schizophrenia. *Schizophr Bull* 35:256-278.
- Bushnik T, Haines D, Levallois P, et al. 2010. Lead and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health Rep* 21:7-18.
- Cagen SZ, Waechter JM Jr, Dimond SS, et al. 1999. Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol* 30:130-139.
- Calafat AM, Weuve J, Ye X, et al. 2009. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 117:639-644.
- Calafat AM, Ye X, Wong LY, et al. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 116:39-44.
- Calza A, Sogliano C, Santoru F, et al. 2010. Neonatal exposure to estradiol in rats influences neuroactive steroid concentrations, GABAA receptor expression, and behavioral sensitivity to anxiolytic drugs. *J Neurochem* 113:1285-1295.
- Can A, Semiz O, Cinar O. 2005. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod* 11:389-396.
- Cantagrel V, Lefebvre DJ, Ng BG, et al. 2010. SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell* 142: 203-217.
- Cao XL, Corriveau J. 2008. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *J Agric Food Chem* 56:6378-6381
- Carr R, Bertasi F, Betancourt A, et al. 2003. Effect of neonatal rat bisphenol a exposure on performance in the Morris water maze. *J. Toxicol Environ Health A* 66:2077-2088.
- Carson R. 1962. Silent Spring. New York: Houghton Mifflin Company.
- Cerqueira JJ, Pêgo JM, Taipa R, et al. 2005. Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci* 25:7792-7800.
- Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. 2008. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab* 19:300-307.
- Chen GL, Miller GM. 2012. Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin-stress interaction and clinical implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 159B: 152-171.
- Chen MY, Ike M, Fujita M. 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ Toxicol* 17:80-86.
- Chen WQ, Yuan L, Xue R, et al. 2011. Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *Neurotoxicology* 32:355-361.
- Chen Y, Fu AK, Ip NY. 2008. Bidirectional signaling of ErbB and Eph receptors at synapses. *Neuron Glia Biol* 4: 211-221.
- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. 2003. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 14: 119-127.

- Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1:581-585.
- Chung E, Genco MC, Megrelis L, Ruderman JV. 2011. Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17732-17737.
- Clagett DC, Shafer SJ. 1985. Polycarbonate resins. *Polym Eng Sci* 25: 458-461.
- Clarke HF, Dalley JW, Crofts HS, et al. 2004. Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* 304:878-880.
- Colborn T. 2004. Commentary: setting aside tradition when dealing with endocrine disruptors. *ILAR J* 45: 394-400.
- Colborn T, Clement C. 1992. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development - The Wildlife /Human Connection. *Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing Co.*
- Colborn T, Dumanoski D, Myers JP. 1996. Our Stolen Future. *New York, NY: Penguin Books.*
- COM (Comisión de las Comunidades Europeas) 1999, 706. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales).
- COM 2001, 68. Comunicación de la Comisión al Consejo, el Parlamento Europeo y el Comité Económico y Social. Propuesta sobre residuos de aparatos eléctricos y electrónicos.
- Conover CA, Bale LK, Overgaard MT, et al. 2004. Metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein A is a critical growth regulatory factor during fetal development. *Development* 131:1187-1194.
- Crews F, He J, Hodge C. 2007. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86:189-199.
- Danzl E, Sei K, Soda S, et al. 2009. Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *Int J Environ Res Public Health* 6:1472-1484.
- Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, et al. 1999. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 64:328-334.
- Della Seta D, Minder I, Dessì-Fulgheri F, Farabollini F. 2005. Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Res Bull* 65:255-260.
- Dermer OC. 1977. Bisphenol-A. In: McKetta, J.J. (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Processing and Design. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.*
- Derijck AA, Van Erp S, Pasterkamp RJ. 2010. Semaphorin signaling: molecular switches at the midline. *Trends Cell Biol* 20: 568-576.
- Dessi-Fulgheri F, Porrini S, Farabollini F. 2002. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats. *Environ Health Perspect* 110:403-407.
- Dickens F. 1975. Edward Charles Dodds, 13 October 1899-16 December 1973. *Biogr Mem Fellows R Soc* 21:227-267.
- Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, et al. 2005. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 22:106-118.

- Discover magazine. 2006. "25 greatest science books of all time". Disponible en <http://discovermagazine.com/2006/dec/25-greatest-science-books>. Consultado el 3 de noviembre de 2014.
- Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson R. 1938. Estrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* 141:247-248.
- Dodds EC, Lawson W. 1936. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996.
- Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. 2010. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 247:158-165.
- Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. 2011. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult CD-1 mice: inter-species comparisons with Sprague-Dawley rats and rhesus monkeys. *Toxicol Lett* 207:298-305.
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. 2007. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13056-13061.
- Doshi T, D'Souza C, Dighe V, Vanage G. 2012. Effect of neonatal exposure on male rats to bisphenol A on the expression of DNA methylation machinery in the postimplantation embryo. *J Biochem Mol Toxicol* 26:337-343.
- Durando M, Kass L, Piva J, et al. 2007. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect* 115:80-86.
- EC (European Commission) 2003. Risk assessment report of 4,4'-isopropylidenediphenol (BISPHENOL-A). Italy: Ispra.
- Eells JB, Wilcots J, Sisk S, Guo-Ross SX. 2012. NR4A gene expression is dynamically regulated in the ventral tegmental area dopamine neurons and is related to expression of dopamine neurotransmission genes. *J Mol Neurosci* 46:545-553.
- EFSA 2013. DRAFT Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs – Part: exposure assessment. Disponible en <http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/140117.pdf>
- Eglen RM, Wong EH, Dumuis A, Bockaert J. 1995. Central 5-HT4 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16:391-398.
- Ellem SJ, Schmitt JF, Pedersen JS, et al. 2004. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2434-2441.
- Emery AC, Pshenichkin S, Takoudjou GR, et al. 2010. The protective signaling of metabotropic glutamate receptor 1 is mediated by sustained, beta-arrestin-1-dependent ERK phosphorylation. *J Biol Chem* 285: 26041-26048.
- EPA (Environmental Protection Agency) 2005. Cross-species mode of action information assessment: a case study of bisphenol A. Govt Reports Announcements & Index, Issue 26, National Center for Environmental Assessment.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895
- Evron T, Daigle TL, Caron MG. 2012. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor

- desensitization. *Trends Pharmacol Sci* 33:154-164.
- Fang M, Jaffrey SR, Sawa A, et al. 2000. Dexasr1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron* 28: 183-193.
- Farabollini F, Porrini S, Della Seta D, et al. 2002. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect* 110:409-414.
- Fishburn CS, Bedford M, Lonai P, Fuchs S. 1996. Early expression of D3 dopamine receptors in murine embryonic development. *FEBS Lett* 381:257-261.
- Fitch RH, Denenberg VH. 1998. A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain. *Behav Brain Sci* 21: 311-327.
- Fornasiero EF, Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F. 2010. The role of synapsins in neuronal development. *Cell Mol Life Sci* 67:1383-1396.
- Frederick AL, Stanwood GD. 2009. Drugs, biogenic amine targets and the developing brain. *Dev Neurosci* 31:7-22.
- Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, et al. 2002. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 16: 99-110.
- Funahashi S, Inoue M. 2000. Neuronal interactions related to working memory processes in the primate prefrontal cortex revealed by cross-correlation analysis. *Cereb Cortex* 10:535-551.
- Fuster JM. 2001. The Prefrontal Cortex—An Update: Review Time Is of the Essence. *Neuron* 30: 319-333.
- Gaj S, Eijssen L, Mensink RP, Evelo CT. 2008. Validating nutrient-related gene expression changes from microarrays using RT(2) PCR-arrays. *Genes Nutr* 3:153-157.
- Gayraud V, Lacroix MZ, Collet SH, et al. 2013. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect* 121:951-956.
- Gerona RR, Woodruff TJ, Dickenson CA, et al. 2013. Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environ Sci Technol* 47:12477-12485.
- Geyer MA, Vollenweider FX. 2008. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends Pharmacol Sci* 29: 445-453.
- Godoy A, Kawinski E, Li Y, et al. 2011. 5 α -reductase type 3 expression in human benign and malignant tissues: a comparative analysis during prostate cancer progression. *Prostate* 71:1033-1046.
- Gonçalves CR, Cunha RW, Barros DM, Martínez PE. 2010. Effects of prenatal and postnatal exposure to a low dose of bisphenol A on behavior and memory in rats. *Environ. Toxicol Pharmacol* 30:195-201.
- Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, et al. 1992. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 327: 1185-1191.
- Gould JC, Leonard LS, Maness SC, et al. 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 142:203-14.
- Haduch A, Bromek E, Sadakierska-Chudy A, et al. 2013. The catalytic competence of cytochrome P450 in the synthesis of serotonin from 5-methoxytryptamine

- in the brain: An in vitro study. *Pharmacol Res* 67:53-59.
- Handa RJ, Weiser MJ, Zuloaga DG. 2009. A role for the androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, in modulating oestrogen receptor beta-mediated regulation of hormonal stress reactivity. *J Neuroendocrinol* 21:351-358.
- Hanioka N, Jinno H, Nishimura T, Ando M. 1998. Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver. *Arch Toxicol* 72:387-394.
- Herath CB, Jin W, Watanabe G, et al. 2004. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine* 25:163-172.
- Heringa MB, van der Burg B, van Eijkeren JC, Hermens JL. 2004. Xenoestrogenicity in in vitro assays is not caused by displacement of endogenous estradiol from serum proteins. *Toxicol Sci* 82:154-163.
- Hermans-Borgmeyer II, Süsens U, Borgmeyer U. 2000. Developmental expression of the estrogen receptor-related receptor gamma in the nervous system during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 97:197-199.
- Hess-Wilson JK, Webb SL, Daly HK, et al. 2007. Unique bisphenol A transcriptome in prostate cancer: novel effects on ERbeta expression that correspond to androgen receptor mutation status. *Environ Health Perspect* 115:1646-1653.
- Hiroi H, Tsutsumi O, Takeuchi T, et al. 2004. Differences in serum bisphenol a concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia. *Endocr J* 51:595-600.
- Hiroi R, McDevitt RA, Neumaier JF. 2006. Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol Psychiatry* 60: 288-295.
- Hiroi T, Imaoka S, Chow T, Funae Y. 1998. Tissue distributions of CYP2D1, 2D2, 2D3 and 2D4 mRNA in rats detected by RT-PCR. *Biochim Biophys Acta* 1380:305-312.
- Ho CK, Habib FK. 2011. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat Rev Urol* 8: 29-41.
- Honma T, Miyagawa M, Suda M, et al. 2006. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on brain neurotransmitters in female rat offspring. *Ind Health* 44:510-524.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte J, Prins GS. 2006. Developmental exposure estradiol and bisphenol A (BPA) increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant (PDE4D4) in the rat prostate. *Cancer Res* 66:5624-5632.
- Hormann AM, Vom Saal FS, Nagel SC, et al. 2014. Holding Thermal Receipt Paper and Eating Food after Using Hand Sanitizer Results in High Serum Bioactive and Urine Total Levels of Bisphenol A (BPA). *PLoS One* 9:e110509.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, et al. 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401:763-764.
- Huang H, Leung LK. 2009. Bisphenol A downregulates CYP19 transcription in JEG-3 cells. *Toxicol Lett* 189:248-252.
- Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, et al. 2003. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 13:546-553.

- Hutt P. 1982. Regulatory history of DES. *Am Stat* 36:267.
- Ichihara T, Yoshino H, Imai N, et al. 2003. Lack of carcinogenic risk in the prostate with transplacental and lactational exposure to bisphenol A in rats. *J Toxicol Sci* 28:165-171.
- Igarashi A, Ohtsu S, Muroi M, Tanamoto K. 2006. Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF-kappaB. *Biol Pharm Bull* 29: 2120-2122.
- Iida H, Mōri T, Kaneko A, et al. 2001. Disturbed spermatogenesis in mice prenatally exposed to an endocrine disruptor, Bisphenol A. *Mammal Study* 27:73-82.
- Ike M, Chen MY, Danzl E, et al. 2006. Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water Sci Technol* 53:153-159.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, et al. 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17:2839-2841.
- Inoue H, Yuki G, Yokota H, Kato S. 2003. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos* 31:140-144.
- IRIS 1988. Bisphenol A (CASRN 80-05-7). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. Disponible en: <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>
- Ishido M, Yonemoto J, Morita M. 2007. Mesencephalic neurodegeneration in the orally administered bisphenol A-caused hyperactive rats. *Toxicol Lett* 173:66-72.
- Jaffrey SR, Snyder SH. 1996. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 274:774-777.
- Ji K, Hong S, Kho Y, Choi K. 2013. Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environ Sci Technol* 47:8793-800.
- Jones DC, Miller GW. 2008. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol* 76:569-581.
- Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. 2004. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sci* 74:2931-2940.
- Kalivas PW, Volkow N, Seamans J. 2005. Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* 45:647-650.
- Kamat A, Hinshelwood MM, Murry BA, Mendelson CR. 2002. Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends Endocrinol Metab* 13: 122-128.
- Kang JH, Kito K, Kondo F. 2003. Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *J Food Prot* 66:1444-1447.
- Kaplan SA. 2012. Comparison of Dutasteride and Finasteride for Treating Benign Prostatic Hyperplasia: the Enlarged Prostate International Comparator Study (EPICS). *J Urol* 187: 584-585.
- Katafuchi T, Li AJ, Hirota S, et al. 2000. Impairment of spatial learning and hippocampal synaptic potentiation in c-kit mutant rats. *Learn Mem* 7: 383-392.
- Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V. 2011. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas,

- prostate, and mammary gland. *Adv Nutr* 2:101-111.
- Kishimoto W, Hiroi T, Shiraishi M, et al. 2004. Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology* 145:699-705.
- Kim JY, Han EH, Kim HG, et al. 2010. Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. *Toxicol Lett* 193:200-208.
- Kim K, Park H, Yang W, Lee JH. 2011. Urinary concentrations of bisphenol A and triclosan and associations with demographic factors in the Korean population. *Environ Res* 111:1280-1285.
- Klotz DM, Hewitt SC, Korach KS, Diaugustine RP. 2000. Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 141:3430-3439.
- Kristiina AK, Kristiina A, Maj-Len HE, et al. 2003. Allergic contact dermatitis from bisphenol A in PVC gloves. *Contact Dermatitis* 49:202-205.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, et al. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.
- Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, et al. 2009. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26:928-37.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.
- Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y. 2003. Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 73:17-25.
- Kwintkiewicz J, Nishi Y, Yanase T, Giudice LC. 2010. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environ Health Perspect* 118:400-406.
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, et al. 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300:1303-1310.
- Lauder JM. 1990. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann NY Acad Sci* 600:297-313.
- Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, et al. 2003. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 75:40-46.
- Leranth C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, et al. 2008a. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14187-14191.
- Leranth C, Szigeti-Buck K, MacLusky NJ, Hajszan T. 2008b. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology* 149:988-994.
- Levine S. 1971. Sexual differentiation: the development of maleness and femaleness. *California Medicine* 114:12-17.

- Li D, Zhou Z, Qing D, et al. 2010a. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod* 25:519-527.
- Li DK, Zhou Z, Miao M, et al. 2010b. Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. *J Androl* 31:500-506.
- Li DK, Zhou Z, Miao M, et al. 2011a. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril* 95:625-630.
- Li J, Ding Z, Wang Z, et al. 2011b. Androgen regulation of 5 α -reductase isoenzymes in prostate cancer: implications for prostate cancer prevention. *PLoS One* 6:e28840.
- Liao C, Kannan K. 2013. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J Agric Food Chem* 61:4655-4662.
- Liao C, Liu F, Kannan K. 2012b. Bisphenol s, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues. *Environ Sci Technol* 46:6515-6522.
- Liao C, Liu F, Moon HB, et al. 2012a. Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: spatial and temporal distributions. *Environ Sci Technol* 46:11558-11565.
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13:169-182.
- Liu XB, Murray KD. 2012. Neuronal excitability and calcium/calmodulin dependent protein kinase type II: location, location, location. *Epilepsia* 1:45-52.
- López-Cervantes J, Paseiro-Losada P. 2003. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit Contam* 20:596-606.
- Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, et al. 2007. Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Addit Contam* 24:95-102.
- Lupien SB, Bluhm EJ, Ishii DN. 2003. Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats. *J Neurosci Res* 74: 512-523.
- MacLusky N, Naftolin F. 1981. Sexual Differentiation of the Central Nervous System. *Science* 211: 1294-1302.
- Maharjan S, Serova L, Sabban EL. 2005. Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors alpha and beta and interactions with cyclic AMP. *J Neurochem* 93:1502-1514.
- Mahendroo MS, Cala KM, Landrum DP, Russell DW. 1997. Fetal death in mice lacking 5 α -Reductase type 1 caused by estrogen excess. *Mol Endocrinol* 11:917-927.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253:165-174.
- Martini M, Miceli D, Gotti S, et al. 2010. Effects of perinatal administration of Bisphenol A on the neuronal nitric oxide synthase expressing system in the hypothalamus and limbic system of CD1 mice. *J Neuroendocrinol* 22: 1004-1012.
- Masuo Y, Ishido M. 2011. Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible involvement in brain development and

- neurodegeneration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 14:346-369.
- Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, et al. 2013. Perinatal exposure to bisphenol A enhances contextual fear memory and affects the serotonergic system in juvenile female mice. *Horm Behav* 63:709-716.
- Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, et al. 2012. Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39:273-279.
- Matsuda S, Saika S, Amano K, et al. 2010. Changes in brain monoamine levels in neonatal rats exposed to bisphenol A at low doses. *Chemosphere* 78: 894-906.
- McEwen B, Lieberburg I, Chaptal C, et al. 1977. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Hormones and Behavior* 9: 249-263.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, et al. 2003. NFkappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072-1078.
- Mendonca K, Hauser R, Calafat AM, et al. 2014. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *Int Arch Occup Environ Health* 87:13-20.
- Mileva G, Baker SL, Konkle AT, Bielajew C. 2014. Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *Int J Environ Res Public Health* 11:7537-7561.
- Millan MJ, Lejeune F, Gobert A. 2000. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents. *J Psychopharmacol* 14:114-138.
- Miller CL, Llenos IC, Dulay JR, et al. 2004. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiol Dis* 15:618-629.
- Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, et al. 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9:129-137.
- Miyagawa K, Narita M, Narita M, et al. 2007b. Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A. *Neurosci Lett* 418:236-241.
- Miyagawa K, Narita M, Narita M, et al. 2007a. Changes in central dopaminergic systems with the expression of Shh or GDNF in mice perinatally exposed to bisphenol-A. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 27:69-75.
- Mizuo K, Narita M, Yoshida T, et al. 2004. Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addiction Biology* 9:19-25.
- Monje L, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, et al. 2009. Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. *Reprod Toxicol* 28:435-442.
- Moon MK, Kim MJ, Jung IK, et al. 2012. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *J Korean Med Sci* 27:644-652.

- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, et al. 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5185–5190.
- Müller U, von Cramon DY, Pollmann S. 1998. D1-versus D2-receptor modulation of visuospatial working memory in humans. *J Neurosci* 18: 2720-2728.
- Murphy BL, Arnsten AF, Goldman-Rakic PS, Roth RH. 1996. Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1325-1329.
- Murphy DD, Cole NB, Greenberger V, Segal M. 1998. Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 2550–2559.
- Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, et al. 2007. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23:383-390.
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, et al. 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 105:70–76.
- Nagel SC, Bromfield JJ. 2013. Bisphenol A: a model endocrine disrupting chemical with a new potential mechanism of action. *Endocrinology* 154:1962–1964.
- Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. 2007. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett* 420:100–105.
- Nakamura K, Itoh K, Yaoui T, et al. 2006. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res* 84:1197-1205.
- Nakamura K, Itoh K, Yoshimoto K, et al. 2010. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters brain monoamine concentration in adult mice. *Neurosci Lett* 484: 66–70.
- Namkung Y, Dipace C, Urizar E, et al. 2009. G Protein-coupled Receptor Kinase-2 Constitutively Regulates D Dopamine Receptor Expression and Signaling Independently of Receptor Phosphorylation. *J Biol Chem* 284:34103-34115.
- Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, et al. 2006. Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neurosci Lett* 402:249-252.
- Negri-Cesi P, Poletti A, Celotti F. 1996. Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5 alpha-reductase and aromatase in brain differentiation and functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58:455-466.
- Nickel JC. 2004. Comparison of clinical trials with finasteride and dutasteride. *Rev Urol* 6: S31-S39.
- Nishiyama T, Ogura K, Nakano H, et al. 2002. Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferases. *Drug Metab Pharmacokinet* 17:221-228.
- Nishizawa H, Imanishi S, Manabe N. 2005. Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *J Reprod Dev* 51:593–605.
- Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, et al. 2001. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown

- adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42:917–22.
- Ogura Y, Ishii K, Kanda H, et al. 2007. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. *Differentiation* 75: 745–756.
- Ohlstein JF, Strong AL, McLachlan JA, et al. 2014. Bisphenol A enhances adipogenic differentiation of human adipose stromal/stem cells. *J Mol Endocrinol* 53:345-353.
- Okada H, Tokunaga T, Liu X, et al. 2008. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect* 116:32-38.
- O’Kusky J, Ye P. 2012. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol* 33:230-251.
- Olea N, Pulgar R, Pérez P, et al. 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104:298-305.
- Ooe H, Taira T, Iguchi-Aruga SM, Ariga H. 2005. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci* 88:114–126.
- Ortega E, Ruiz E, Mendoza MC, et al. 1979. Plasma steroid and protein hormone concentrations in patients with benign prostatic hypertrophy and in normal men. *Experientia* 35: 844–845.
- Ozaki A, Yamaguchi Y, Fujita T, et al. 2004. Chemical safety analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food Chem Toxicol* 42:1323-1337.
- Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, et al. 2002. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 110:415–422.
- Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK. 2007. Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. *Neurotoxicology* 28:1–12.
- Patterson TA, Twaddle NC, Roegge CS, et al. 2013. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 267:41-48.
- Paul SM, Purdy RH. 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J* 6: 2311–2322.
- Paxinos G, Watson C. 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Academic Press.
- Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN. 1998. Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. *J Endocrinol* 158:11-14.
- Perera F, Vishnevetsky J, Herbstman JB, et al. 2012. Prenatal Bisphenol A Exposure and Child Behavior in an Inner-City Cohort. *Environ Health Perspect* 120:1190–1194.
- Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH. 1997. The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* 17:9407-9414.
- Pjevac M, Pregelj P. 2012. Neurobiology of suicidal behaviour. *Psychiatr Danub* 24: 336–341.
- Pirard C, Sagot C, Deville M, et al. 2012. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ Int* 48:78-83.

- Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kitraki E. 2010. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience* 167:741-749.
- Poole A, van Herwijnen P, Weideli H, et al. 2004. Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE). *Food Addit Contam* 21:905-919.
- Porras SP, Heinälä M, Santonen T. 2014. Bisphenol A exposure via thermal paper receipts. *Toxicol Lett* 230:413-420.
- Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. 2008. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:134-138.
- Prins GS, Ye SH, Birch L, et al. 2011. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol* 31:1-9.
- Puig MV, Gullledge AT. 2011. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol* 44: 449-464.
- Ramos JG, Varayoud J, Kass L, et al. 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 JG, Varayoud J, Sonnenschein C, et al. 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.
- Reddy DS. 2010. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res* 186:113-137.
- Rengo G, Perrone-Filardi P, Femminella GD, et al. 2012. Targeting the β -adrenergic receptor system through G-protein-coupled receptor kinase 2: a new paradigm for therapy and prognostic evaluation in heart failure: from bench to bedside. *Circ Heart Fail* 5:385-391.
- Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, et al. 2007b. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 24:199-224.
- Richter CA, Taylor JA, Ruhlen RL, et al. 2007a. Estradiol and Bisphenol A stimulate androgen receptor and estrogen receptor gene expression in fetal mouseprostate mesenchyme cells. *Environ Health Perspect* 115:902-908.
- Ricke WA, McPherson SJ, Bianco JJ, et al. 2008. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB J* 22: 1512-1520.
- Riitta J, Lasse K, Tuula E. 1995. Occupational allergic contact dermatitis caused by epoxy diacrylate in ultraviolet-light-cured paint, and bisphenol A in dental composite resin. *Contact Dermatitis* 33:94-99.
- Rittmaster R, Hahn RG, Ray P, et al. 2008. Effect of dutasteride on intraprostatic androgen levels in men with benign prostatic hyperplasia or prostate cancer. *Urology* 72: 808-812.
- Robbins TW, Roberts AC. 2007. Differential regulation of fronto-executive function by the monoamines and acetylcholine. *Cereb Cortex* 17:151-160.

- Rogers JA, Metz L, Yong VW. 2013. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol* 53:421-430.
- Roggenbach J, Muller-Oerlinghausen B, Franke L. 2002. Suicidality, impulsivity and aggression—is there a link to 5HIAA concentration in the cerebrospinal fluid? *Psychiatry Res* 113: 193–206.
- Rosenmai AK, Dybdahl M, Pedersen M, et al. 2014. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicol Sci* 139:35-47.
- Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP. 2000. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem* 275:35986-35993.
- Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, et al. 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147:3681-3691.
- Rubin BS, Soto AM. 2009. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 304:55-62.
- Rusell DW, Wilson JD. 1994. Steroid 5 alpha reductase: Two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:25–61.
- Santti R, Newbold RR, Makela S, et al. 1994. Development of estrogenization and prostatic neoplasia. *Prostate* 24: 67–78.
- Saili KS, Corvi MM, Weber DN, et al. 2012. Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicology* 291:83-92.
- Sánchez P, Torres JM, Del Moral RG, Ortega E. 2006. Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5alpha-reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem Int* 49:626-630.
- Sánchez P, Torres JM, Ortega E. 2005. Effects of dihydrotestosterone on brain mRNA levels of steroid 5alpha-reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem Res* 30:577-581.
- Santiago RM, Barbieiro J, Lima MM, et al. 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:1104-1114.
- SCF (Scientific Committee for Food) 1986. Certain monomers and other starting substances to be used in the manufacture of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. (Seventeenth Series), EUR 10778 EN, Commission of the European Communities, Luxembourg.
- SCF/CS/PM/3936 Final 3 May 2002 disponible en:http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out128_en.pdf
- Schambra UB, Duncan GE, Breese GR, et al. 1994. Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience* 62:65-85.
- Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, et al. 2002. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 110:703-707.
- Schüle C, Nothdurfter C, Rupprecht R. 2014. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Prog Neurobiol* 113:79-87.

- Sharpe RM, Skakkebaek NE. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-1395.
- Shaywitz BA, Yager RD, Klopfer JH. 1976. Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science* 191:305-308.
- Shelby MD. 2008. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. NTP CERHR MON (22):v, vii-ix, 1-64 passim.
- Shimizu M, Ohta K, Matsumoto Y, et al. 2002. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicol In Vitro* 16:549-556.
- Simoneau C, Valzacchi S, Morkunas V, Van den Eede L. 2011. Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28:1763-1768.
- Singh I, Morris AP. 2011. Performance of transdermal therapeutic systems: effects of biological factors. *Int J Pharm Investig* 1:4-9.
- Sinor AD, Lillien L. 2004. Akt-1 expression level regulates CNS precursors. *J Neurosci* 24:8531-8541.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, et al. 1998. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS* 106:3-11
- Snyder SH. 2011. Serotonin, cytokines, p11, and depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8923-8924.
- Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, et al. 2009. Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 117:1549-1555
- Span PN, Sweep CG, Benraad TJ, Smals A. 1996. Differential subcellular distribution of rat prostatic steroid 5alpha-reductase isozyme activities. *Eur J Endocrinol* 134:386-392.
- St Onge JR, Abhari H, Floresco SB. 2011. Dissociable contributions by prefrontal D1 and D2 receptors to risk-based decision making. *J Neurosci* 31: 8625-8633.
- Steers WD. 2001. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 58:17-24; discussion 24.
- Strous RD, Maayan R, Weizman A. 2006. The relevance of neurosteroids to clinical psychiatry: from the laboratory to the bedside. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:155-169.
- Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, et al. 2005. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 20:2325-2329.
- Suiko M, Sakakibara Y, Liu MC. 2000. Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem Biophys Res Commun* 267:80-84.
- Sullivan RM, Brake WG. 2003. What the rodent prefrontal cortex can teach us about attention-deficit/hyperactivity disorder: the critical role of early developmental events on prefrontal function. *Behav Brain Res* 146:43-55.
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N, et al. 2004. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 18:50150-50157.
- Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C, Bartolomei MS. 2013. Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLoS Genet* 9:e1003401.

- Suzuki T, Mizuo K, Nakazawa H, et al. 2003. 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.
- Takada H, Isobe T, Nakada N, et al. 1999. Bisphenol A and nonylphenols in human umbilical cords. *Proceedings of the International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Monte Verita, Ascona (Suiza)*.
- Takahashi S, Chi XJ, Yamaguchi Y, et al. 2001. Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon-alpha in human RSa cells. *Mutat Res* 490:199-207.
- Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, et al. 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 51:165-169.
- Tan MO, Karabiyik I, Uygur MC, et al. 2003. Serum concentrations of sex hormones in men with severe lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *Int Urol Nephrol* 35: 357–363.
- Taylor JA, Welshons WV, Vom Saal FS. 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.
- Teeguarden JG, Waechter JM Jr, Clewell HJ et al. 2005. Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci* 85:823-838
- Teng C, Goodwin B, Shockley K, et al. 2013. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions* 203:556-564.
- Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, et al. 2005. Differential alterations in 5alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *Prostate* 63: 231–239.
- Thomas P, Dong J. 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:175-179.
- Thornton J, Zehr JL, Loose MD. 2009. Effects of prenatal androgens on rhesus monkeys: a model system to explore the organizational hypothesis in primates. *Horm Behav* 55:633–645.
- Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, et al. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7014-7019.
- Torres JM, Ortega E. 2006. Steroid 5 α -reductase isozymes in the adult female rat brain: central role of dihydrotestosterone, *J Mol Endocrinol* 36:239-245.
- Torres JM, Ortega E. 2003b. Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J* 17: 1428–1433.
- Torres JM, Ruiz E, Ortega E. 2003a. Development of a quantitative RT-PCR method to study 5alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate* 15: 74–79.
- Torres JM, Ruiz E, Ortega E. 2001. Effects of CRH and ACTH administration on

- plasma and brain neurosteroid levels. *Neurochem Res* 26: 555–558.
- Toyama Y, Yuasa S. 2004. Effects of neonatal administration of 17beta-estradiol, beta-estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis *Reprod Toxicol* 19:181–188.
- Tsai WT. 2006. Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a review. *J Environ Sci Health C* 24: 225e255.
- Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E, et al. 1998. Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer* 75:290–294.
- Turkmen S, Backstrom T, Wahlstrom G, et al. 2011. Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor. *Br J Pharmacol* 162: 311–327.
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, et al. 2002. Three-Generation Reproductive Toxicity Study of Dietary Bisphenol A in CD Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Sci* 68:121–146.
- Uemura M, Tamura K, Chung S, et al. 2008. Novel 5 alpha-steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormonerefractory prostate cancer. *Cancer Sci* 99: 81–86.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33:378–455.
- Vandenberg LN, Wadia PR, Schaeberle CM, et al. 2006. The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J Steroid Biochem Mol Biol* 101:263–274.
- Vertes RP. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Viberg H, Lee I. 2012. A single exposure to bisphenol A alters the levels of important neuroproteins in adult male and female mice. *Neurotoxicology* 33: 1390–1395.
- Viñas R, Watson CS. 2013. Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. *Environ Health Perspect* 121:352–358.
- Vitalis T, Ansorge MS, Dayer AG. 2013. Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT3A and 5-HT6 receptor subtypes. *Front Cell Neurosci* 7:93.
- Völkel W, Bittner N, Dekant W. 2005. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 33:1748–1757.
- Völkel W, Colnot T, Csanády GA, et al. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15:1281–1287.
- Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, et al. 1999. Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels. *Am J Psychiatry* 156:1440–1443.
- Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, et al. 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* 24:131–138.
- Vom Saal FS, Welshons WV. 2014. Evidence that bisphenol A (BPA) can

- be accurately measured without contamination in human serum and urine and that BPA causes numerous hazards from multiple routes of exposure. *Mol Cell Endocrinol* doi: 10.1016/j.mce.2014.09.028.
- Waider J, Proft F, Langlhofer G, et al. 2013. GABA concentration and GABAergic neuron populations in limbic areas are differentially altered by brain serotonin deficiency in Tph2 knockout mice. *Histochem Cell Biol* 139: 267–281.
- Walther DJ, Bader M. 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66: 1673–1680.
- Wang JM, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD. 2005. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J Neurosci* 25:4706–4718.
- Warita K, Mitsuhashi T, Ohta K-i, et al. 2013. Gene expression of epigenetic regulatory factors related to primary silencing mechanisms is less susceptible to lower doses of bisphenol A in embryonic hypothalamic cells. *J Toxicol Sci* 38:285–289.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147:S56–69.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, et al. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111:994–1006.
- Westberg L, Eriksson E. 2008. Sex steroid-related candidate genes in psychiatric disorders. *J Psychiatry Neurosci* 33:319–330.
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, et al. 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol* 24:178–198
- Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, et al. 2002. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1:515–524.
- Wolf H. 1974. The effect of hormones and vitamin B6 on urinary excretion of metabolites of the kynurenine pathway. *Scand. J Clin Lab Invest* 136:1–186.
- Woo RS, Li XM, Tao Y, et al. 2007. Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54:599–610.
- Xi W, Lee CK, Yeung WS, et al. 2011. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 31: 409–417.
- Xu LC, Sun H, Chen JF, et al. 2005. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 216:197–203.
- Xu M, Koeltzow TE, Santiago GT, et al. 1997. Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron* 19:837–848.
- Xu X, Liu X, Zhang Q, et al. 2013. Sex-specific effects of bisphenol-A on memory and synaptic structural modification in hippocampus of adult mice. *Horm Behav* 63:766–775.
- Yamada H, Furuta I, Kato EH, et al. 2002. Maternal serum and amniotic

- fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 16:735-739.
- Ye L, Zhao B, Hu G, et al. 2011. Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol Lett* 207:137-142.
- Ye XY, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. 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* 831:110-115.
- Yoshino H, Ichihara T, Kawabe M, et al. 2002. Lack of significant alteration in the prostate or testis of F344 rat offspring after transplacental and lactational exposure to bisphenol A. *J Toxicol Sci* 27:433-439.
- Yamamoto T, Yasuhara A. 1999. Quantities of bisphenol a leached from plastic waste samples. *Chemosphere* 38:2569-2576.
- Yokota H, Iwano H, Endo M, et al. 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 340:405-409.
- Yoshihara S, Mizutare T, Makishima M, et al. 2004. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci* 78:50-59.
- Zhang Y, Bertolino A, Fazio L, et al. 2007. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20552-20557.
- Zhang Z, Rhind SM, Kerr C, et al. 2011. Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 685:29-35.
- Zhou L, Zhu DY. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20:223-230.
- Zhou R, Zhang Z, Zhu Y, et al. 2009. Deficits in development of synaptic plasticity in rat dorsal striatum following prenatal and neonatal exposure to low-dose bisphenol A. *Neuroscience* 159:161-171.
- Zhu YS, Imperato-McGinley JL. 2009. 5alpha-reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 1155:43-56.
- Zhu Z, Edwards RJ, Boobis AR. 2009. Increased expression of histone proteins during estrogen mediated cell proliferation. *Environ Health Perspect* 117:928-934.
- Zincke T. 1905. *JustusLeibigs Ann Chem* 343:75-79.
- Zoeller RT, Bansal R, Parris C. 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146:607-612.

Anexos

Anexo A

Información Complementaria

- ❖ Genes contenidos en el PCR array de neurotoxicidad utilizado en el *Estudio 3* (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PARN-096Z.html) agrupados utilizando la clasificación PANTHER *pathway* (www.pantherdb.org):

PANTHER pathway	Genes
5-Hydroxytryptamine biosynthesis	<i>Tph1</i>
5HT1 type receptor mediated signaling pathway	<i>Htr1a</i>
5HT3 type receptor mediated signaling pathway	<i>Htr3a</i>
Alzheimer disease-presenilin pathway	<i>Mmp9, Notch4</i>
Angiogenesis	<i>Notch4</i>
Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin	<i>Arrb1</i>
Apoptosis signaling pathway	<i>Traf2, Atf4, Hspa5, Bag4, Bik, Xiap, Nfkb1</i>
Axon guidance mediated by Slit/Robo	<i>Abl1</i>
B cell activation	<i>Nfkb1</i>
Cell cycle	<i>Ccnd1</i>
DNA replication	<i>Prim2</i>
Dopamine receptor mediated signaling pathway	<i>Drd2</i>
EGF receptor signaling pathway	<i>Ereg, Ywhae</i>
Endothelin signaling pathway	<i>Gucy1a3</i>
FAS signaling pathway	<i>Fas, Casp7, Faslg, Gsn</i>
FGF signaling pathway	<i>Ywhae</i>
Folate biosynthesis	<i>Gch1</i>
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	<i>Htr3a, Drd2</i>
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	<i>Pygb, Htr1a, Drd2</i>
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway	<i>Drd2</i>
Huntington disease	<i>Grin1</i>
Hypoxia response via HIF activation	<i>Egl3</i>

PANTHER pathway	Genes
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	<i>Camk2d, Nfkb1</i>
Integrin signalling pathway	<i>Abl1</i>
Interleukin signaling pathway	<i>Cdkn1a</i>
Ionotropic glutamate receptor pathway	<i>Grin1</i>
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	<i>Grin1</i>
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	<i>Bdnf</i>
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	<i>Grin1</i>
Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	<i>Grin1</i>
Nicotine pharmacodynamics pathway	<i>Drd2</i>
Notch signaling pathway	<i>Notch4</i>
Oxidative stress response	<i>Ddit3</i>
P53 pathway feedback loops 1	<i>Tp53</i>
PI3 kinase pathway	<i>Ccnd1</i>
Parkinson disease	<i>Gpr37, Hspa5, Ywhae</i>
Plasminogen activating cascade	<i>Mmp9</i>
T cell activation	<i>Nfkb1</i>
TGF-beta signaling pathway	<i>Lefty2</i>
Toll receptor signaling pathway	<i>Nfkb1</i>
Wnt signaling pathway	<i>Ccnd1, Tp53</i>
p53 pathway by glucose deprivation	<i>Tp53</i>
p53 pathway feedback loops 2	<i>Cdkn1a</i>
p53 pathway	<i>Traf2, Cdkn1a</i>

- ❖ Genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico contenidos en el PCR array utilizado en los *Estudios 4 y 5* (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PARN-158Z.html), clasificados según la casa comercial proveedora de los mismos (SA Biosciences):

Receptors:

Dopamine: *Drd1, Drd2, Drd3, Drd4, Drd5.*

Serotonin: *Htr1a, Htr1b, Htr1d, Htr1f, Htr2a, Htr2b, Htr2c, Htr3a, Htr3b, Htr4, Htr5a, Htr6, Htr7.*

Synthesis & Degradation:

Dopamine: *Comt, Dbh, Ddc, Maa, Th.*

Serotonin: *Maa, Maob, Tdo2, Tph1, Tph2.*

Dopamine & Serotonin Transporters: *Slc6a3, Slc6a4.*

Signal Transduction pathways:

cAMP/PKA Pathway: *Adcy1, Adcy2, Adcy3, Adcy5, Casp3, Cacna1a, Cdk5, Creb1, Dusp1, Fos, Prkaca, Mapk1, Ppp1r1b (Darpp32).*

PI3K/AKT Pathway: *Pik3ca, Pik3cg, Akt1, Akt2, Akt3, Gsk3a, Gsk3b.*

PLA2 Pathway: *Alox12, Cyp2d4, Pde4a, Pde4b, Pde4c, Pde4d, Pde10a, Pla2g5.*

PLC Pathway: *Itpr1, Plcb1, Plcb2, Plcb3.*

G-Protein Coupled Receptor Regulation: *Adrb1, Adrb2, Adrbk1, Adrbk2, App, Arrb1, Arrb2, Grk4, Grk5, Grk6, Snca, Sncaip.*

Dopamine & Serotonin Gene Targets: *Bdnf, Ephb1, Gdnf, Gfap, Nr4a1 (Nur77), Nr4a3 (Nor1), Pdyn, Ptgs2, Slc18a1, Slc18a2 (Vmat2), Syn2.*

Anexo B

Financiación

Los trabajos integrantes de la presente Tesis doctoral han sido realizados gracias a la financiación recibida por los siguientes organismos:

- Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU 2008-05340)
- Junta de Andalucía (CTS202-Endocrinología y Metabolismo)

El periodo de formación predoctoral ha sido financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, gracias al programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU)

Contribuciones científicas derivadas

Parte de los resultados recogidos en la presente Tesis doctoral han dado lugar a las siguientes aportaciones científicas:

Artículos en Revistas Científicas indexadas:

- **Castro B**, Sánchez P, Torres JM, Preda O, Del Moral RG, Ortega E. 2013. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 alpha-reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One* 8(2):e55905.
- Sánchez P, **Castro B**, Torres JM, Olmo A, Del Moral RG, Ortega E. 2013. Bisphenol A Modifies the Regulation Exerted by Testosterone on 5 α -Reductase Isozymes in Ventral Prostate of Adult Rats. *Biomed Res Int* 2013:629235.

- **Castro B**, Sánchez P, Torres JM, Ortega E. 2013. Effects of Adult Exposure to Bisphenol A on Genes Involved in the Physiopathology of Rat Prefrontal Cortex. *PLoS One* 8(9):e73584.
- **Castro B**, Sánchez P, Miranda MT, Torres JM, Ortega E. 2014. Developmental exposure to bisphenol A affects prefrontal cortical dopamine and serotonin systems in both juvenile and adult male rats. (*Submitted*)
- **Castro B**, Sánchez P, Torres JM, Ortega E. 2014. Developmental effects of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S on precortical 5 α -reductase isozymes and dopamine-serotonin systems in female rats. (*Submitted*)

Comunicaciones presentadas en Congresos y Jornadas de relevancia científica:

- *Efectos de bisfenol A sobre los niveles de mRNA del enzima aromatasa en próstata de rata adulta.* Beatriz Castro Bohórquez, M^a Pilar Sánchez Medina, Jesús M. Torres de Pinedo, Esperanza Ortega Sánchez. XXXIV Congreso SEBBM. Barcelona, 2011.
- *Bisphenol A exposure during adulthood alters aromatase and 5 α -reductase isozymes expression in prostate of rat.* Beatriz Castro Bohórquez, M^a Pilar Sánchez Medina, Jesús M. Torres de Pinedo, Esperanza Ortega Sánchez. 22^o IUBMB / 37^o FEBS Congress. Sevilla, 2012.
- *Adult Exposure To Bisphenol A Increases The mRNA Levels Of Aromatase In Female Rat Brain.* Beatriz Castro Bohórquez, Pilar Sánchez Medina, Jesús Manuel Torres De Pinedo, Esperanza Ortega Sánchez. III Jornadas Internacionales y V Nacionales de Ciencias de la Salud. Granada, 2013.
- *Efectos del Bisfenol A sobre los isoenzimas 5 α -reductasa en próstata de ratas castradas y tratadas con testosterona.* Castro Bohórquez, Beatriz; Sánchez Medina, Pilar; Torres de Pinedo, Jesús M.; Ortega Sánchez, Esperanza. XII Congreso Español de Salud Ambiental. VIII Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos. Granada, 2013.

- *El Bisfenol A modifica la regulación ejercida por testosterona sobre los isoenzimas de la 5 alfa-reductasa en próstata ventral de ratas adultas.* Pilar Sánchez Medina, Beatriz Castro Bohórquez, Jesús M. Torres de Pinedo, Esperanza Ortega Sánchez. XXXVI Congreso SEBBM. Madrid, 2013.
- *Effects of bisphenol a on genes involved in cell death and cell survival in the prefrontal cortex of adult rats.* Beatriz Castro, Pilar Sánchez, Jesús M. Torres, Esperanza Ortega. I Congreso Nacional Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores. Granada, 2014.
- *Bisphenol A exposure during adulthood alters the expression of tryptophan hydroxylase type II but not type I in the prefrontal cortex of rat: Possible alterations in local serotonin synthesis.* Beatriz Castro Bohórquez, Pilar Sánchez Medina, Jesús Manuel Torres De Pinedo, Esperanza Ortega Sánchez. XXXVII Congreso SEBBM. Granada, 2014.
- *Adult exposure to Bisphenol A decrease the expression of 5alpha-reductase type I in the prefrontal cortex of female rat. A novel mechanism underlying Bisphenol A-associated psychopathologies?* Esperanza Ortega Sánchez, Beatriz Castro Bohorquez, Pilar Sánchez Medina, Jesús M. Torres de Pinedo. XXXVII Congreso SEBBM. Granada, 2014.

