

ISTITUTO LOMBARDO ACCADEMIA di SCIENZE e LETTERE

INCONTRO DI STUDIO N. 100

SCIENZA E... NON SOLO
L'ISTITUTO LOMBARDO PER LUCIANO MARTINI

A cura di Marcella Motta^(†) e Adele Robbiati Bianchi

Milano, 19 giugno 2018



Istituto Lombardo di Scienze e Lettere

MILANO
2019

LA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE DEL CERVELLO NON È SOLO UNA QUESTIONE DI ORMONI

PAOLA NEGRI-CESI (*)

SUNTO. – Uno degli eventi chiave che si verificano durante lo sviluppo del cervello fetale è l'induzione di differenze sessuali morfo-funzionali permanenti in numerose aree encefaliche. Questo meccanismo di "imprinting", operante su un cervello ancora plastico in una precisa finestra temporale, porta a risposte genere-specifiche ad uno stesso stimolo sia nella neurochimica/neuroendocrinologia, sia in alcune risposte comportamentali. Quale sia l'origine di tale dimorfismo è un tema di ricerca che affascina gli studiosi di neuroscienze da più di 60 anni. Secondo la teoria originale, l'organizzazione maschile o femminile del cervello di numerose specie animali, compreso l'uomo, dipende dall'esposizione precoce agli ormoni gonadici: la secrezione prenatale di testosterone (T) tipica del maschio è coinvolta sia negli effetti organizzativi mascolinizanti dei nuclei cerebrali, sia nella loro defemminizzazione. In assenza di ormoni gonadici fetali, come avviene nella femmina, il cervello tenderebbe invece a differenziarsi spontaneamente in senso femminile. Alcuni effetti del T dipendono dalla sua conversione in estradiolo o DHT, due metaboliti attivi formati rispettivamente dagli enzimi aromatasi e 5alfa-riduttasi tipo 2. Gli studi effettuati sui roditori nel nostro e in altri laboratori hanno chiarito che estradiolo e DHT sono implicati in entrambi i processi di mascolinizzazione e defemminizzazione, mentre nell'uomo il ruolo organizzativo dominante è svolto dagli androgeni (T e DHT). Tuttavia, le ricerche più recenti, discusse in questa breve rassegna, hanno ora chiarito che l'ambiente ormonale da solo non è sufficiente ad innescare l'intero processo e che per la genesi del dimorfismo cerebrale è indispensabile una precisa coordinazione e interazione fra ormoni gonadici, patrimonio genetico neuronale ed epigenoma. Data la complessità dell'intero processo è intuitivo che qualsiasi perturbazione esterna possa creare modificazioni dei meccanismi differenziativi con conseguenze più o meno rilevanti su numerosi parametri. Nella parte finale della rassegna verranno perciò analizzate brevemente alcune possibili variazioni legate all'esposizione prenatale a inquinanti ambientali che interferiscono con l'attività ormonale e/o con l'epigenoma.

ABSTRACT. – One of the key events occurring during fetal brain development is the induc-

(*) Già docente di Fisiologia presso la Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano, Italia. E-mail: paola.negricesi@unimi.it

tion of permanent morpho-functional sexual differences in many brain areas. This “imprinting” mechanism, operating on a plastic brain within a narrow sensitive window, leads to gender-specific responses to the same stimulus both in neurochemistry/neuroendocrinology, and in some behavioral responses. The origin of CNS dimorphism is a topic that has fascinated neuroscientists for more than 60 years. The conventional view of brain sexual differentiation proposes that the masculine or feminine brain organization depends on the presence or absence of early gonadal steroid exposure: prenatal testosterone (T) surge in males induces both the masculinization and the defeminization of some brain nuclei, while in the absence of fetal gonadal hormones, as in females, the brain appears to feminize spontaneously. Some effects of T depend on its conversion to estradiol or DHT, two active metabolites formed by the enzymes aromatase and 5 α -reductase type 2, respectively. Many studies carried out on rodents in our and in other laboratories clarified that estradiol and DHT are implicated in both masculinization and defeminization; on the contrary, T as such and DHT seem to be the main brain organizers in men. However, the most recent research, briefly discussed in this paper, has now clarified that the hormonal environment alone is not sufficient to trigger the whole process and that a precise coordination and interaction among hormonal signals, neuronal genome and the epigenome are pivotal to the genesis of brain gender-specific differentiation. Given the complexity of the whole process, it is not surprising that any external perturbation that brain sex differentiation may have heavy consequences on several parameters. Some possible variations related to prenatal exposure to environmental pollutants that interfere with the hormonal activity and/or the epigenome will be briefly analyzed in the final part of the paper.

1. INTRODUZIONE

E' indubbio che maschi e femmine siano biologicamente differenti per quanto riguarda le gonadi e i caratteri sessuali secondari. Per molti anni è stata invece sottostimata la diversità genere-specifica della struttura e funzionalità di altri organi e sistemi. Ne deriva che le conclusioni tratte sulla base di studi condotti nei maschi non sempre possono essere applicate al genere femminile e viceversa. Questa consapevolezza è stata un recente passo in avanti importante per la definizione della medicina di genere. Gli effetti di genere sono da tenere in considerazione anche per quanto riguarda il cervello (SNC), dove influenzano il fenotipo neuronale in modo analogo ad altre importanti variabili. Alcuni esempi sono, oltre al controllo degli assi endocrini, la differente suscettibilità a numerose patologie neuropsichiatriche o neurocomportamentali, gli effetti prodotti da danni cerebrali, nonché la diversa incidenza delle patologie neurodegenerative legate all'invecchiamento [1].

Le differenze di genere del cervello sono sia morfologiche che funzionali, si possono riscontrare in tutto il regno animale, compresa la specie umana, e riguardano sia aree e comportamenti legati alla ripro-

duzione, sia regioni coinvolte nelle funzioni superiori. Ad esempio, nell'ipotalamo, alcuni nuclei dell'area preottica che governano il comportamento riproduttivo (SDN-POA nei roditori; INAH nell'uomo) hanno un volume doppio nei maschi rispetto alle femmine, mentre altri nuclei dell'ipotalamo antero-ventrale (AVPV), che controllano la secrezione ciclica delle gonadotropine, sono significativamente più grandi nelle femmine. Analoghe differenze morfologiche legate al genere sono riscontrabili anche in numerose aree extra-ipotalamiche e corticali, e più in generale nel rapporto materia grigia/materia bianca e nella connettività sinaptica [2-5].

Alle differenze della citoarchitettura cerebrale corrispondono risposte funzionali dimorfiche quali, ad esempio, il comportamento sessuale, il controllo centrale della produzione di alcuni ormoni, la secrezione di numerosi neurotrasmettitori, la risposta allo stress, le strategie di apprendimento e memorizzazione, l'elaborazione emozionale, la risposta ad uno stimolo dolorifico (vedere [3] per riferimenti bibliografici).

Quale sia l'origine del dimorfismo morfo-funzionale cerebrale è un tema di ricerca complesso e non ancora chiarito appieno, ma che ha affascinato gli studiosi di neuroscienze fin dalla fine degli anni 50, quando alcuni studi pionieristici condotti nei roditori avevano suggerito che le differenze di genere nel funzionamento del cervello adulto potessero originarsi durante lo sviluppo prenatale e costituissero un potente imprinting che durava tutta la vita [6].

2. MODELLO CLASSICO DELLA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE DEL CERVELLO: GLI ORMONI GONADICI

La visione classica della differenziazione sessuale del cervello dei mammiferi si basava in gran parte sulla scoperta che le femmine di roditore esposte a testosterone prima della nascita mostravano da adulte un comportamento sessuale di tipo maschile [6]. Su queste basi fu quindi proposto che il dimorfismo cerebrale fosse determinato dal differente ambiente ormonale a cui erano esposti maschi e femmine: durante la vita prenatale, grazie all'espressione di un gene di determinazione testicolare sul cromosoma Y (SRY), le gonadi embrionali bipotenziali si differenziano in testicoli che, in una finestra temporale ristretta della gestazione (attorno al 18° giorno nei roditori e attorno alla 16° settimana nell'uomo) secernono testosterone. In assenza di SRY, nelle femmi-

ne, le gonadi si differenziano spontaneamente in ovaie e non producono ormoni. Il particolare ambiente ormonale prenatale nel maschio induce quindi una mascolinizzazione e defemminizzazione permanente sia delle strutture riproduttive sia del cervello; nelle femmine, l'assenza di testosterone, causa invece la spontanea differenziazione di questi organi in senso femminile. Per quanto riguarda il SNC, il testosterone influenza la maggior parte dei parametri coinvolti nello sviluppo cerebrale (proliferazione, apoptosi, differenziazione e migrazione neuronale, arborizzazione dendritica, sinaptogenesi, mielinizzazione, ecc.) esercitando effetti "*organizzativi*" permanenti sulla sua neuroarchitettura [7,8]. Questa organizzazione cerebrale prenatale genere-specifica determinerà, nell'individuo adulto, risposte funzionali dimorfiche ad uno stesso stimolo sia nella neurochimica e nella neuroendocrinologia, sia in alcune delle risposte comportamentali (effetti "*attivazionali*").

Negli stessi anni si è poi scoperto che in molti casi il meccanismo d'azione del T a livello dei tessuti bersaglio è mediato dalla sua conversione intracellulare in steroidi più attivi, DHT ed estradiolo, ad opera rispettivamente dei due sistemi enzimatici specifici della 5alfa-riduttasi di tipo 2 (5alfaR2) e dell'aromatasi (Aro). DHT ed estradiolo, interagendo con i rispettivi recettori androgenici (AR) ed estrogenici (ER) amplificano e diversificano quindi l'azione ormonale [9]. Come dimostrato alcuni anni fa dal nostro laboratorio, 5alfaR2 e Aro sono presenti e attivi nel ratto maschio già in epoca embrionale in numerose aree cerebrali [10], dove sono fondamentali per formare le opportune concentrazioni locali di DHT ed estradiolo che esercitano i loro effetti organizzativi mascolinizanti e/o defemminizzanti su numerosi parametri. Fra questi si possono citare:

- l'espressione di geni correlati alla differenziazione e al rimodellamento neuronale [11,12];
- il controllo della migrazione neuronale [13];
- la sinaptogenesi e la densità delle spine dendritiche [14,15];
- l'espressione regio-specifica di neurotrofine e di fattori pro- o anti-apoptotici, con conseguenti differenze nella sopravvivenza neuronale e nel volume di specifici nuclei cerebrali [16,17].

Nell'uomo, invece, gli studi che hanno tentato di definire i fattori critici per una corretta differenziazione sessuale del cervello si sono basati essenzialmente sull'analisi del comportamento e sull'identificazione di genere in caso di patologie in cui già durante il periodo embrionale sono presenti alterazioni dei normali livelli circolanti di ormoni

sessuali. Questi studi hanno messo in luce il ruolo organizzativo dominante degli androgeni (testosterone e DHT) nel processo di mascolinizzazione cerebrale, mentre gli estrogeni, seppure presenti, non sembrano essere coinvolti (vedere [9] per riferimenti bibliografici). Bisogna sottolineare, tuttavia, che lo studio dell'”imprinting” sessuale nella specie umana è molto complesso, in quanto l'ambiente in cui viene allevato il bambino e i condizionamenti socio-culturali possono influenzare pesantemente ogni tipo di comportamento. Questo è particolarmente vero quando, a causa di anomalie nella differenziazione degli organi riproduttivi, il sesso cromosomico non corrisponde al fenotipo.

3. MODELLO ATTUALE DELLA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE DEL CERVELLO

La rilevanza del differente ambiente ormonale prenatale nei maschi e nelle femmine nello scolpire un cervello dimorfico rimane un cardine della neurobiologia dello sviluppo; tuttavia, ricerche più recenti in vari modelli animali e i risultati di test psico-sessuali in uomini con patologie del differenziamento hanno ora chiarito che il dimorfismo cerebrale ha un'origine multifattoriale.

Infatti, è probabile che anche il patrimonio genetico neuronale [18] e l'epigenoma [19] siano fondamentali nel determinare alcune differenze cerebrali genere-specifiche che precedono e/o possono essere indipendenti dalla presenza in circolo di ormoni gonadici. A riprova di ciò, ora sappiamo ad esempio che l'espressione di alcuni geni neuronali è differente nei due sessi già prima dell'inizio dell'attività gonadica [20] e che molti geni la cui espressione è dimorfica non presentano nella loro sequenza zone di legame per i recettori androgenici o estrogenici (ARE ed ERE, rispettivamente)[21]. Inoltre, l'epigenoma cerebrale presenta numerose differenze genere-specifiche e la sua manipolazione sperimentale interferisce con i normali processi di mascolinizzazione [22].

3.1 *Influenza genica*

Studiare l'influenza genica nella determinazione del dimorfismo cerebrale prenatale a prescindere dagli influssi ormonali ha creato non poche difficoltà; ad oggi, i principali modelli utilizzati per valutare l'importanza di fattori extra-gonadici sono essenzialmente due:

1. l'allestimento di culture neuronali ottenute prima della differenziazione gonadica da diencefali di animali sperimentali divisi per sesso. Con tale modello si è dimostrato, ad esempio, che le cellule prelevate da maschi o da femmine e mantenute in identiche condizioni di coltura sviluppano fenotipi differenti per quanto riguarda l'attività dell'aromatasi (M>F, [23]) o il contenuto di dopamina (F>M, [24]).
2. la creazione di topi transgenici in cui il sesso genetico (presenza di cromosomi sessuali XX o XY) non è congruente con il sesso gonadico (presenza di ovaie o testicoli) [25]. Utilizzando questo modello si è confermato anche *in vivo* che la sola presenza del cromosoma Y nel genoma neuronale fa aumentare l'espressione dell'aromatasi [26] e della tirosino idrossilasi [27], indipendentemente dai livelli circolanti di testosterone.

Anche lo studio approfondito del cervello di un unico caso di diamante mandarino ginandromorfo, che presentava il lato destro del corpo con un testicolo e fenotipo maschile e quello sinistro con un ovaio e un fenotipo femminile, ha rivelato che i nuclei del canto (che negli uccelli presentano uno spiccato dimorfismo) avevano dimensioni maggiori nel cervello di destra rispetto a quello di sinistra, nonostante i livelli di testosterone circolanti fossero uguali in entrambi i lati [28].

Tuttavia, il fatto che la presenza di testicoli funzionanti sembra essere un requisito fondamentale per avere un'espressione di tipo maschile di alcune proteine neuronali negli animali transgenici e che non tutti i soggetti affetti da patologie del differenziamento con cariotipo 46,XY allevati come femmine e androgenizzati alla pubertà chiedano la riassegnazione del sesso [29], dimostrano che geni ed ormoni sono parimenti importanti nel modellare la morfologia e le funzioni dimorfiche del cervello.

3.2 *Ruolo dell'epigenetica*

L'accensione/spengimento rapido della trascrizione e/o della traduzione genica garantisce l'origine e il mantenimento nel tempo della specificità cellulare. Ciò avviene grazie a modificazioni epigenetiche del DNA e della cromatina che permettono o meno l'accessibilità dei fattori di trascrizione/traduzione genica. Le principali modificazioni epigenetiche sono:

- la metilazione di zone particolari di DNA ricche in citosina nelle sequenze promotrici di numerosi geni. Più zone sono metilate, meno il DNA è accessibile all'apparato di trascrizione;

- l'acetilazione o metilazione delle arginine o delle lisine presenti sulle code delle proteine istoniche. A seconda dell'istone, del tipo di aminoacido e del tipo di legame chimico, le porzioni di DNA avvolte sugli istoni risultano più o meno compatte e di conseguenza la trascrizione impedita o facilitata;
- la produzione di corte sequenze di RNA non codificante (miRNA) in grado di legarsi a omologhe sequenze di RNA messaggero, impedendone la traduzione.

Non solo il cervello in via di sviluppo è particolarmente sensibile alle variazioni dell'epigenoma, ma anche la comparsa e il mantenimento del dimorfismo cerebrale sembra dipendere strettamente dall'impronta epigenetica della cromatina. Infatti, nel nucleo dimorfico dell'area preottica delle femmine (si ricorda che questo nucleo è più piccolo nelle femmine rispetto ai maschi) si trova un maggiore grado di metilazione del DNA sul promotore del gene che codifica per ER [19]. La conseguenza è una minore espressione di ER ed un minor effetto trofico esercitato dagli estrogeni, che è congruente con le minori dimensioni del nucleo. Inoltre, la modificazione sperimentale del grado di metilazione del DNA o del profilo istonico perturba lo sviluppo di molti circuiti neuronali e contrasta il processo fisiologico di differenziazione genere-specifica in specifiche regioni cerebrali. Ad esempio, aumentando la trascrizione genica, grazie ad una riduzione della metilazione del DNA, si ottiene la mascolinizzazione del cervello delle femmine di roditore e la comparsa di comportamenti sessuali tipici del maschio [19]. È stato inoltre dimostrato che il profilo istonico sia nel cervello in toto che in alcune aree cerebrali è nettamente dimorfico e che l'esposizione degli animali femmina al testosterone in epoca prenatale è in grado di far aumentare l'acetilazione istonica a livelli tipici del maschio [22]. Infine, sempre nei roditori, è stato dimostrato di recente che il profilo di miRNA a livello ipotalamico e ippocampale è nettamente dimorfico e che è particolarmente sensibile ai livelli intracellulari di estradiolo [30].

I recettori per gli ormoni gonadici (AR e ER) sono in grado di interagire con gli enzimi che regolano il grado di metilazione del DNA o la metilazione/acetilazione istonica e costituiscono pertanto fattori importanti nella regolazione epigenetica. Lo studio delle interazioni fra ormoni sessuali ed epigenetica è solo agli albori, ma è noto, ad esempio, che così come il testosterone altera in modo permanente l'epigenoma, consentendo l'espressione e il mantenimento del fenotipo cerebrale maschile per tutta la vita, anche la modificazione farmacologica/ambientale dei

processi epigenetici in epoca prenatale modifica gli effetti degli steroidi gonadici sulla differenziazione sessuale del cervello [31].

4. INTERFERENTI ENDOCRINI E DIFFERENZIAZIONE

Dato il ruolo cruciale degli ormoni sessuali e dell'epigenoma, non è sorprendente che il processo differenziativo genere-specifico del cervello sia particolarmente sensibile all'ambiente in cui il feto cresce. Fra le sostanze con cui l'organismo può venire in contatto in epoca prenatale vi sono gli interferenti endocrini, chiamati anche distruttori endocrini o EDC. Con EDC si fa riferimento ad una pletera di sostanze ubiquitarie di sintesi o naturali (pesticidi, farmaci, plastificanti, cosmetici, componenti di piante, ecc.), accomunate dalla capacità di interferire con tutti gli aspetti del meccanismo d'azione ormonale anche a bassissime dosi. Peculiarità degli EDC sono la stabilità chimica e la lipofilità, che permette loro di accumularsi nell'ambiente e di raggiungere gli organismi in via di sviluppo attraverso la catena alimentare e il latte materno [32].

Gli effetti degli EDC, oltre che dal tipo di sostanza, dipendono dal tessuto preso in considerazione, dalla dose, dall'epoca e dalla durata dell'esposizione, ma gli organismi in via di sviluppo sembrano essere particolarmente vulnerabili e possono sviluppare modificazioni fenotipiche permanenti a carico di numerosi organi, fra cui il cervello, che diverranno manifeste solo più avanti nello sviluppo o nella vita adulta [33,34]. Una descrizione dettagliata dei numerosissimi dati presenti in letteratura va oltre lo scopo di questa breve relazione. Tuttavia, fra i tanti effetti osservati sul SNC in via di sviluppo e che ancora sono presenti nell'animale adulto, si possono citare, ad esempio, i cambiamenti genere-specifici dell'espressione ipotalamica di 5α R2 e Aro [35], la capacità di legarsi e attivare il recettore degli androgeni [36], l'interazione, spesso genere-specifica, con l'epigenoma [34,36]. Gli EDC quindi, sono in grado di interferire in modo importante con i meccanismi di base che portano alla differenziazione sessuale del cervello sia modificando direttamente l'azione degli ormoni riproduttivi a livello neuronale, sia agendo in modo indiretto, grazie alla capacità di modificare e/o interagire con i meccanismi epigenetici. In questo modo gli EDC potrebbero riprogrammare, in modo differente nelle femmine e nei maschi, l'espressione di geni fondamentali per il processo differenziativo.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, in più di 60 anni di ricerche, si è passati da un modello differenziativo governato esclusivamente dagli ormoni gonadici ad uno molto più complesso, schematizzato nella *Fig. 1*, in cui la differenziazione genere-specifica del cervello è il risultato della stretta interazione fra ormoni, genetica ed epigenetica. In epoca prenatale, dunque, in presenza di un substrato genetico genere-specifico, gli ormoni gonadici sono essenzialmente dei comprimari, in grado di attivare specifici pattern epigenetici e di modulare in tempi diversi vie di segnale differenti nelle varie regioni cerebrali. Il processo di differenziazione neuroanatomica che ne risulta aumenterebbe il dimorfismo cerebrale riducendo la normale variabilità di risposta comportamentale all'interno di ciascun sesso.

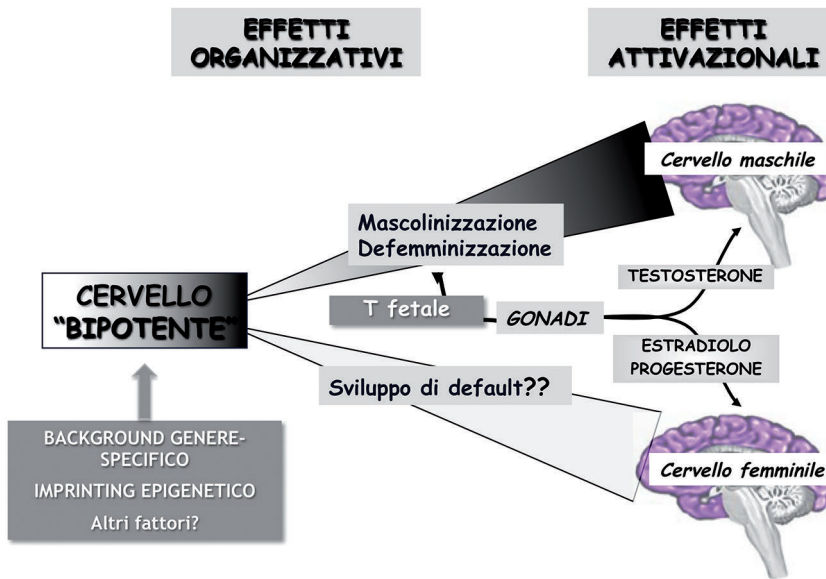


Fig. 1. Ipotesi attuale sull'origine del dimorfismo cerebrale.

E' importante infine avere ben presente che alcune variabili ambientali, fra cui gli EDC, possono influenzare l'intero processo interferendo con l'azione ormonale e/o con la regolazione epigenetica dell'espressione di geni chiave.

6. RINGRAZIAMENTI

Lo studio dei meccanismi di base della differenziazione sessuale del cervello è stato un leitmotiv della ricerca portata avanti nel nostro laboratorio negli anni, e che ha prodotto alcuni dei risultati descritti in questa breve rassegna. Per questo motivo, un grazie speciale va al professor Martini, scienziato illuminato e disponibile, che mi ha accettato nell'Istituto di Endocrinologia e che ha saputo suscitare in me la curiosità per le neuroscienze. Vorrei poi ricordare e ringraziare Fabio Celotti, Alessandra Colciago, Ornella Mornati, Antonia Pravettoni e Lavinia Casati con cui, più di tutti, ho condiviso le gioie e le delusioni del lavoro quotidiano di laboratorio in tutti questi anni.

Da ultimo vorrei qui ricordare con affetto la professoressa Marcella Motta, mancata di recente, che tanta parte ha avuto nella vita dell'Istituto di Endocrinologia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Cahill L, Why sex matters for neuroscience, *Nat Rev Neurosci*, 2006: 7:477-484.
- [2] Allen JS, Damasio H, Grabowski TJ, Normal neuroanatomical variation in the human brain: an MRI-volumetric study, *Am J Phys Anthropol*, 2002: 118:341-358.
- [3] Cosgrove KP, Mazure CM, and Staley JK, Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry, *Biol Psychiatry*, 2007: 62:847-855.
- [4] Ingalhalikar M, Smith A, Parker D, Satterthwaite TD, Elliott MA, Ruparel K, Hakonarson H, Gur RE, Gur RC, Verma R, Sex differences in the structural connectome of the human brain, *PNAS*, 2014: 111:823-828.
- [5] Grgurevic N and Majdic G, Sex differences in the brain-an interplay of sex steroid hormones and sex chromosomes, *Clinical Science*, 2016: 130:1481-1497.
- [6] Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC, Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig, *Endocrinology*, 1959: 65:369-382.
- [7] Thompson BL, Levitt P, Stanwood GD, Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education, *Nat Rev Neurosci*, 2009: 10:303-312.
- [8] Manoli DS, Tollkuhn J, Gene regulatory mechanisms underlying sex differences in brain development and psychiatric disease, *Ann NY Acad Sci*, 2018: 1420:26-45.
- [9] Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Motta M, Sexual differentiation of the brain: role of testosterone and its active metabolites, *J Endocrinol Invest*, 2004: 27(Supp 6): 120-127.
- [10] Colciago A, Celotti F, Pravettoni A, Mornati O, Martini L, Negri-Cesi P, Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic

- area of developing rats, *Develop Brain Res*, 2005: 155:107-116.
- [11] Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M, Expression analyses of sex steroid-regulated genes in neonatal rat hypothalamus, *J Reprod Dev*, 2003: 49:547-552.
- [12] Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ, Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice, *Genome Res*, 2006: 16, 995-1004.
- [13] Tobet S, Knoll JG, Hartshorn C, Aurand E, Stratton M, Kumar P, Searcy B, McClellan K, Brain sex differences and hormone influences: a moving experience?, *J Neuroendocrinol*, 2009: 21:387-392.
- [14] Mhyre AJ, Dorsa DM, Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia, *Neuroscience*, 2006: 138:851-858.
- [15] Amateau SK and McCarthy MM, Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior, *Nat Neurosci*, 2004: 7:643-650.
- [16] Chung WC, Swaab DF, De Vries GJ, Apoptosis during sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat brain, *J Neurobiol*, 2000: 43:234-243.
- [17] Forger NG, Cell death and sexual differentiation of the nervous system, *Neuroscience*, 2006: 138:929-938.
- [18] Arnold A, Xu J, Grisham W, Chen X, Kim Y-H, Itoh Y, Minireview: Sex chromosomes and brain sexual differentiation, *Endocrinology*, 2004: 145:1057-1062.
- [19] Forger NG, Epigenetic mechanisms in sexual differentiation of the brain and behaviour, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016: 371:20150114.
- [20] Dewing P, Shi T, Horvath S, Vilain E, Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation, *Mol Brain Res*, 2003: 118:82-90.
- [21] Reinius B, Saetre P, Leonard JA, Blekhman R, Merino-Martinez R, Gilad Y, Jazin E, An evolutionarily conserved sexual signature in the primate brain, *PLoS Genet*, 2008: 4:e1000100.
- [22] Tsai H-W, Grant PA, Rissman EF, Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain, *Epigenetics*, 2009: 4:47-53.
- [23] Negri-Cesi P, Colciago A, Motta M, Martini L, Celotti F, Aromatase expression and activity in male and female cultured rat hypothalamic neurons: effect of androgens, *Mol Cell Endocrinol*, 2001: 178: 1-10.
- [24] Reisert I and Pilgrim C, Sexual differentiation of monoaminergic neurons—genetic or epigenetic?, *TINS*, 1991: 14:468-473.
- [25] De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger CJ, Swain A, Lovell-Badge R, Burgoyne PS, Arnold AP, A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits, *J Neurosci*, 2002: 22:9005-9014.
- [26] Cisternas CD, Tome K, Caeiro XE, Dadam FM, Garcia-Segura LM, Cambiasso MJ, Sex chromosome complement determines sex differences in aromatase expression and regulation in the stria terminalis and anterior amygdala of the developing mouse brain, *Mol Cell Endocrinol*, 2015: 414:99-110.
- [27] Carruth LL, Reisert I, Arnold AP, Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation, *Nature Neuroscience*, 2002: 5:933-934.

-
- [28] Agate RJ, Grisham W, Wade J, Mann S, Wingfield J, Schanen C, Palotie A, Arnold AP, Neural, not gonadal, origin of brain sex differences in a gynandromorphic finch, *PNAS*, 2003: 100: 4873-4878.
- [29] Cohen-Kettenis PT, Gender change in 46,XY persons with 5alpha-reductase-2 deficiency and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency, *Arch Sex Behav*, 2005: 34:399-410.
- [30] Morgan CP and Bale TL, Sex differences in microRNA-mRNA networks: examination of novel epigenetic programming mechanisms in the sexually dimorphic neonatal hypothalamus, *Biology of Sex Diff*, 2017: 8:27.
- [31] Sekido R, The potential role of SRY in epigenetic gene regulation during brain sexual differentiation in mammals, *Adv Genet*, 2014: 86:135-165.
- [32] Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT, Executive summary to EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals, *Endocr Rev*, 2015: 36:593-602.
- [33] Negri-Cesi P, Bisphenol A Interaction With Brain Development and Functions, *Dose Response*, 2015: 13:1559325815590394.
- [34] Walker DM. and Gore AC, Epigenetic impacts of endocrine disruptors in the brain, *Front Neuroendocrinol*, 2017: 44:1-26.
- [35] Colciago A, Casati L, Mornati O, Vergoni AV, Santagostino A, Celotti F, Negri-Cesi P, Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat. Part 2: effects on reproductive parameters, on sex behavior, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5alpha-reductases in the offspring, *Toxicol and Applied Pharmacol*, 2009: 239:46-54.
- [36] Casati L, Ramon R, Poletti A, Negri-Cesi P, Celotti F, Androgen receptor activation by polychlorinated biphenyls: epigenetic effects mediated by the histone demethylase Jarid1b, *Epigenetics*, 2013: 8:1061-1068.