



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

“EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES PARA ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS EN CEREBROS DE RATAS MACHO WISTAR TRATADAS CON CADMIO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

BIÓL. TÁBATA NELVA MENDOZA MENDOZA

CODIRECTORAS.

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

ASESOR.

DR. SERGIO MONTES LÓPEZ

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT. La alumna Tábata Nelva Mendoza Mendoza recibió apoyo de la UAM, del CONACyT, (número de registro CVU/Becario: 511009/302762) y del COMECyT (folio de beca: 14BTM0120).



Comité Tutorial:

Dra. Marcela Arteaga Silva (Codirectora interna). Profesor Titular C, Tiempo Completo. Laboratorio de Neuroendocrinología de la Conducta Reproductiva. Depto. Biología de la Reproducción. División CBS, UAM Iztapalapa.

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor (Codirectora externa). Investigadora en Ciencias Médicas D. Laboratorio de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Pediatría.

Dr. Sergio Montes López (Asesor). Investigador en ciencias médicas D. Laboratorio de Neuroquímica. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Este trabajo fue realizado en:

- Laboratorio de Neuroendocrinología de la Conducta Reproductiva, S-338 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM Iztapalapa
- Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría
- Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Evaluación de la conducta sexual y expresión de receptores para andrógenos y estrógenos en cerebros de ratas macho Wistar tratadas con cadmio" con fecha de examen el día 29 de junio de 2015.



PRESIDENTA

Dra. Edith Arenas Ríos

Investigador del Lab. de Reproducción
Animal Asistida, Universidad Autónoma
Metropolitana



SECRETARIO

Dr. Sergio Montes López

Investigador del Lab. de Neuroquímica,
Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía



SINODAL

Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo

Investigador del Lab. de Biología de la
Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría



SINODAL

Dr. Julio César Rojas Castañeda

Investigador del Lab. de Biología de la
Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a las dos mujeres más importantes en mi vida, que siempre fueron el motor que me impulsó a seguir adelante: Mi madre y mi hija. Mi madre forjó en mi camino las huellas de superación y valentía que una mujer debe tener en la vida, y lo mismo intento hacer con mi hija.

Las amo incesantemente.

Agradecimientos

La gratitud es el reconocimiento al trabajo de las personas. Por ello, quisiera agradecer a todos aquellos que de manera directa o indirecta colaboraron en la realización y culminación del presente trabajo.

*A mis codirectoras, **Dra. Marcela Arteaga Silva** y **Dra. Rosa María Viguera Villaseñor**, por otorgarme este proyecto y por todo lo aprendido, así como brindarme todo el equipo y material biológico y de laboratorio para el desarrollo del presente trabajo, y por ofrecerme un espacio en sus laboratorios.*

*A mi asesor, **Dr. Sergio Montes López**, por todas las valiosas observaciones y aportaciones que hizo a lo largo de este proyecto, y por toda la ayuda recibida especialmente en la técnica de espectrofotometría.*

*Al **Sr. Pedro Medina Granados**, histotecnólogo del laboratorio de biología de la reproducción en el INP, por sus valiosas enseñanzas y consejos en la realización de la técnica inmunohistoquímica por flotación.*

*A los **Dres. Sergio Montes López, Julio César Rojas Castañeda, Francisco Javier Jiménez Trejo** y **Dra. Edith Arenas Ríos**, por todas las valiosas observaciones y revisiones que hicieron para mejorar notablemente mi trabajo.*

*A los **Drs. Miguel Ángel León Galván** y **Pablo Damián Matzumura**, por que pocas veces conozco a gente tan apasionada y tan comprometida con su trabajo y con tanta vocación. Gracias porque siempre que tuve una dificultad, conté con Uds.*

*A mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron presentes para darme una mano siempre que lo necesité: **Joel, Ofelia, Malinally y Anita.***

*A mi familia. Gracias **mamá**, por estar siempre que te necesito, porque eres un excelente ser humano y una mujer maravillosa y por guiarme en la vida.*

*A mis hermanos, que también son mis mejores amigos: **Bárbara y Afaía**, es difícil dejarse caer cuando se tienen hermanas tan exitosas, gracias por todos los consejos y las reprimendas. **Víctor**, gracias por todos los buenos momentos de compañía, discusión y diversión. **Valeria**, gracias por ayudarme tanto con mi hijita cuando te lo pedía, porque sé que soy un ejemplo para ti y me lo has hecho saber. **Papí**, gracias por ser mi amigo, por tus consejos y por todas horas de juego y las discusiones que se dan en tu mesa sobre educación, política, ciencia, etc.*

*A **Norberto Farfán**, Por tu cariño, cuyo fruto es la obra más grande de nuestras vidas: Nuestra hermosa hija. A la **familia Farfán Santillán**, por todo el apoyo que le han brindado siempre a mi pequeña familia.*

***Abuelitos**, gracias por oír siempre mis plegarias. Ha pasado mucho tiempo desde que se fueron y les sigo dando mucha lata. Son los ángeles que me protegen y a los que acudo siempre.*

*A mis amigos de la universidad, con quienes pasé gratos momentos y disfruté de amenas conversaciones: **Marisol, Pablo León, Alejandro Soto y Dulce Diana.***

*A ti, **Dios mío**, porque me acompañas en tiempos de dicha y felicidad, y también en momentos de duda y dificultad. Porque hay cosas que no tienen explicación y simplemente suceden.*

Índice

DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	11
ABSTRACT	14
ABREVIATURAS	16
INTRODUCCIÓN	19
CONDUCTA SEXUAL	19
MODELOS DE ESTUDIO DE LA CONDUCTA SEXUAL	21
CONDUCTA SEXUAL EN LA RATA MACHO	21
ESTUDIO DE LA MOTIVACIÓN SEXUAL	22
MOTIVACIÓN SEXUAL INCENTIVA	23
REGULACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA	24
<i>Regulación neural de la conducta sexual masculina</i>	<i>24</i>
<i>Regulación hormonal de la conducta sexual masculina</i>	<i>26</i>
<i>Receptores para andrógenos y estrógenos</i>	<i>28</i>
<i>Efectos genómicos del Receptor de estrógenos</i>	<i>30</i>
<i>Receptor de andrógenos</i>	<i>32</i>
<i>RE α y β, RA y Conducta Sexual</i>	<i>33</i>
NEUROTRANSMISORES QUE REGULAN EL COMPORTAMIENTO COPULATORIO	34
ANTECEDENTES	36
FACTORES QUE AFECTAN LA CONDUCTA SEXUAL	36
QUÍMICA DEL CADMIO	39
PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN Y EXPOSICIÓN AL CADMIO	40
<i>MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL CADMIO</i>	<i>43</i>
NEUROTOXICIDAD POR CADMIO	44
EFECTOS NEUROENDOCRINOS DEL CADMIO	45
EFECTOS DEL CADMIO EN LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA	48
JUSTIFICACIÓN	50
HIPÓTESIS	51
OBJETIVO GENERAL	51
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
DISEÑO EXPERIMENTAL	52
SUJETOS EXPERIMENTALES:	52
1. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL CADMIO SOBRE LA FASE EJECUTORIA DE LA CONDUCTA SEXUAL	53
2. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL CADMIO SOBRE LA FASE MOTIVACIONAL DE LA CONDUCTA SEXUAL	55
CAJA DE MOTIVACIÓN SEXUAL INCENTIVA (MSI; ÁGMO, 2002)	56

3. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA EN SUERO SANGUÍNEO EN RATAS CON INTERACCIÓN SEXUAL PREVIA.....	57
4. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN SANGRE, HIPOTÁLAMO, BULBO OLFATORIO Y APARATO REPRODUCTOR EN RATAS CON INTERACCIÓN SEXUAL PREVIA	57
5. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RA Y RE A Y B EN SUSTRATOS NEURALES DE RATAS CON INTERACCIÓN SEXUAL PREVIA.....	58
<i>Preparación de los tejidos para inmunohistoquímica por flotación</i>	<i>58</i>
<i>Técnica de NISSL</i>	<i>59</i>
.....	61
<i>Inmunohistoquímica por flotación.....</i>	<i>62</i>
<i>Determinación morfométrica</i>	<i>63</i>
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
RESULTADOS.....	65
CUANTIFICACIÓN DE CADMIO EN SANGRE, HIPÓFISIS, ALGUNOS SUSTRATOS NEURALES QUE REGULAN LA CONDUCTA SEXUAL Y APARATO REPRODUCTOR MASCULINO.....	65
TESTOSTERONA EN SUERO SANGUÍNEO	66
MOTIVACIÓN SEXUAL INCENTIVA (MSI)	67
EJECUCIÓN SEXUAL.....	69
INMUNOHISTOQUÍMICA POR FLOTACIÓN.....	72
<i>Evaluación de la población neuronal</i>	<i>77</i>
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIÓN	86
PERSPECTIVAS	87
BIBLIOGRAFÍA.....	88
ANEXO	103

Resumen

El cadmio (Cd) es un metal pesado que se encuentra en el ambiente por causas naturales y como producto de actividades antropogénicas como son la industria y la minería. Hasta el momento, se desconoce que este metal desempeñe alguna función biológica en el organismo, pero algunos de sus efectos tóxicos si han sido estudiados.

Los humanos y animales nos encontramos expuestos a este metal principalmente dentro de dos categorías, una ocupacional y otra no ocupacional. Dentro de la categoría ocupacional se agrupan a los mineros que inhalan partículas de Cd en las minas, donde el metal es un producto de desecho, así como a los soldadores y trabajadores de fábricas de baterías de níquel-Cd. Dentro de la categoría no ocupacional, la principal fuente exposición se da por la inhalación del humo del cigarro y la ingesta de alimentos y agua contaminada.

El Cd es capaz de entrar a nuestro organismo y bioacumularse, permaneciendo dentro de nuestro sistema hasta por un periodo de 40 años. Dentro del organismo, este metal ejerce diversos efectos tóxicos como son el cáncer de próstata y pulmón, daños histológicos en el testículo y enfermedades óseas muy graves, como es el caso de la osteomalacia o enfermedad Itai-Itai.

El Cd también se acumula en el aparato reproductor masculino, ocasionando daño en las células de Sertoli y de Leydig (estas últimas son las responsables de la secreción de testosterona en el testículo, hormona que es considerada como un buen índice de la función testicular); es capaz de disminuir las concentraciones plasmáticas de testosterona, y por lo tanto es capaz de alterar los patrones de la cópula y la motivación sexual. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos que este metal ejerce sobre la conducta sexual en sus fases motivacional y ejecutoria, así como determinar la expresión de receptores de andrógenos y estrógenos en cerebros de ratas macho sexualmente maduras y con interacción sexual previa.

Para ello, ratas macho Wistar fueron expuestas desde el nacimiento hasta los 56 días de vida postnatal a una solución de Cd en dos dosis diferentes (0.5 y 1mg/kg de peso corporal) vía IP. El grupo control fue tratado únicamente con 0.1 ml de solución salina estéril por la misma vía de administración. A los 120 días de vida se les realizaron las pruebas correspondientes para evaluar la motivación sexual incentiva y la ejecución sexual. Posteriormente, las ratas se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron muestras de suero sanguíneo para cuantificar la testosterona por medio de la técnica de radioinmunoensayo, y muestras de tejido para cuantificar las concentraciones de Cd en aparato reproductor y estructuras neurales que regulan la conducta sexual mediante espectrofotometría de absorción atómica. Se extrajeron los cerebros de las ratas tratadas con Cd y del grupo control para evaluar, por medio de la técnica de inmunohistoquímica por flotación, la expresión de receptores para andrógenos y estrógenos en estructuras neurales que regulan la conducta sexual.

Los resultados obtenidos mostraron que el Cd no suprimió la motivación sexual, pero si disminuyó la intensidad de la motivación sexual en las ratas que fueron tratadas con las dosis empleadas en el presente trabajo (0.5 y 1 mg/kg de peso corporal).

El Cd es capaz de alterar también los parámetros de la cópula, aumentando el número de montas que realizan los animales, lo cual se vio reflejado en un aumento en el número de intentos que los animales realizaron antes de eyacular, lo que podría interpretarse como una imposibilidad de estos machos para copular; aumentaron las latencias de monta y de intromisión, parámetros que también son considerados índices de motivación sexual, por lo cual, de acuerdo con lo mencionado con anterioridad en los organismos a los que se les administró Cd, éste provocó la disminución en la motivación sexual. El Cd también alteró el número de montas e intromisiones y la latencia de eyaculación.

El Hit rate es un índice que nos dice qué tan efectivo es un animal para copular, y éste valor también disminuye de manera dosis dependiente con la

administración de Cd, por lo cual, a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede inferir que el Cd es un metal tóxico capaz de disminuir la eficiencia copulatoria en ratas.

No encontramos diferencias significativas en la cuantificación de la expresión de receptores para andrógenos y estrógenos entre los animales tratados con Cd y el grupo control en estructuras importantes para la expresión de esta conducta, como son el área preóptica medial, el núcleo amigdalino lateral y el bulbo olfatorio.

Abstract

Cadmium (Cd) is a heavy metal found in the environment by natural causes and as a result of human activities such as industry and mining. So far, no biological function of cadmium in the body is known, but some of its toxic effects have been studied. Humans and animals are exposed to this metal mainly by two causes: the first is called occupational and the other one is called non-occupational. Within the occupational category are grouped miners who inhale particles of Cd in the mines, where the metal is a waste product, as well as welders and factory workers who make Ni-Cd batteries. Within the non-occupational category, the main source for exposure to Cd is inhalation of cigarette smoke and intake of contaminated food and water. This metal can enter our body and accumulates, staying within our system up to a period of 40 years. Within the organism it exerts various toxic effects like prostate and lung cancer, testicular tissue damage, and very serious bone diseases, such as osteomalacia or Itai-Itai disease.

Cd also accumulates in the male reproductive system, causing damage to Sertoli and Leydig cells; the latter responsible for the secretion of testosterone in the testis hormone that is considered a good rate of testicular function.

Cd is able to decrease the plasma concentrations of testosterone, and therefore is able to alter patterns of intercourse and sexual motivation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects that this metal exerts on the sexual behavior in their appetitive and consummatory phases, and to determinate the expression of estrogen and androgen receptors in the brains of sexually mature male rats with sexual experience. For this purpose, male Wistar rats were exposed from birth to 56 days of postnatal life to a solution of cadmium in two different doses (0.5 and 1 mg of CdCl₂/ kg body weight, intraperitoneally).

The control group was treated only with 0.1 ml of sterile saline solution by the same means of administration. At 120 days of age, there were carried out tests to assess the incentive sexual motivation and sexual performance of male rats in the

three groups. Subsequently, blood samples were obtained to measure serum testosterone and tissue samples to quantify the concentrations of Cd in reproductive and neural structures that regulate sexual behavior. The brains of rats treated with cadmium and the control group were removed to evaluate, through flotation immunohistochemistry, the receptor expression for estrogens and androgens in neural structures that regulate the sexual behavior. The results showed that cadmium did not suppress sexual motivation of the animals treated with both doses of the metal, but decreased the intensity of sexual motivation in rats that were treated with toxic doses used in this study (0.5 and 1 mg of CdCl₂/ kg body weight).

Cd can also alter the parameters of copulation in the rats treated with doses used in this work, increasing the number of mounts made by the animals, which is reflected in an increase in the number of attempts that animals made before ejaculation, which could be interpreted as a failure of these males to copulate. Cd also increases latencies of mounts and intromissions, parameters that are considered measurements of sexual motivation, whereby, in accordance with the aforementioned results of management of sexual motivation, Cd decreases sexual motivation. It also alters the number of mounts, intromissions, and latency of ejaculation. Hit rate is an index that tells us the effectiveness of an animal in terms of copulation. This value also decreases in a dose-dependent manner with the administration of Cd. Therefore, from the results obtained in this study, it can be inferred that Cd is a toxic metal capable of reducing the copulation efficiency in rats.

No significant differences were found in the quantification of the expression of receptors for androgens and estrogens among animals treated with cadmium and control, in important structures for the expression of this behavior, such as the medial preoptic area, amygdala lateral and olfactory bulb.

Abreviaturas

17 β -HSD, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

3 β -HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

5 α - DHT, 5 α -dihidrotestosterona

5-HT, Serotonina

Acc, Núcleo accumbens

Al, Núcleo alar

AMGco, Amígdala corticomedia

APOm, Área preóptica media

ATV, Área tegmental ventral

AVPe, Núcleo periventricular anteroventral

BNST, Núcleo de la base de la *stria terminalis*

BHE, Barrera hematoencefálica

CAT, Catalasa

Cd, Cadmio

CdCl₂, dicloruro de cadmio

CeA, Núcleo central de la amígdala

Cp, Ceruloplasmina

CSM, Conducta sexual masculina

DA, Dopamina

E2, 17 β -estradiol

ENC, Encefalinas

FSH, Hormona folículo estimulante

GABA, Ácido Gama Aminobutírico

GPX, Glutación peroxidasa

GR, Glutación reducido

HHG, Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
HYP, Hipotálamo
Hip, Hipocampo
IP, Vía intraperitoneal
JAK1, Janus cinasa 1
JAK2, Janus cinasa 1
KO, Gen Knockout
LH, Hormona luteinizante
LPO, Lipoperoxidación
meA, Amígdala media
MEpd, Región posteromedial amigdalina
MnPO, Núcleo preóptico medial
MSI, Motivación sexual incentiva
MTs, *Metalotioneínas*
NA, Noradrenalina
RA, Receptores para andrógenos
RE α , Receptor para estrógenos alfa
RE, Receptores para estrógenos
Red-Ox, óxido-reducción
RE β , Receptor para estrógenos beta
RIA, Radioinmunoanálisis
ROS, Especies reactivas de oxígeno
SNC, Sistema nervioso central
SOD, Superóxido dismutasa
Ss, Sujetos experimentales
T, Testosterona
TF, Transferrina

VLPO, Núcleo preóptico ventrolateral

VMPO, Núcleo preóptico ventromedial

VOLT, Órgano vascular de la lámina terminalis

Introducción

Conducta sexual

La conducta sexual se define como una serie de comportamientos que tienen como función biológica la reproducción de un individuo de cualquier especie con reproducción sexual (Ágmo, 2010; Hernández-González *et al.*, 2009). El inicio y mantenimiento de la misma involucra interacciones espontáneas entre dos individuos que se dan cuando un sujeto detecta una pareja sexual potencial (Ágmo, 2010; Hernández-González *et al.*, 2009). Para que se lleve a cabo la actividad sexual es necesario que se inicien en el individuo, alrededor de la pubertad, diversos cambios neuroendocrinos, conductuales y morfológicos que están regulados por la activación del **eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG)**, de cuya adecuada funcionalidad dependen el desarrollo de los órganos sexuales y la fertilidad (Meisel & Sachs, 2006; Hull *et al.*, 2007).

En el humano, esta conducta guarda una estrecha relación con el estado de salud y con la calidad de vida del individuo, pues se sabe que es una fuente importante de placer, bienestar físico, fisiológico y social, y su adecuada expresión es una parte esencial de las relaciones sociales (McCabe & Cummins, 1998; Ventegodt, 1998; Frohlich & Meston, 2002; Taleporos & McCabe, 2002; Arrington *et al.*, 2004). Esta conducta es innata en el humano, pero gran parte de su desarrollo es aprendido (Bantman, 1998).

Sin embargo, aunque tradicionalmente se ha vinculado la conducta sexual con la reproducción, diferentes estudios en algunos mamíferos como la rata han demostrado que al acompañarse de sensaciones placenteras, la ejecución de la conducta sexual no necesariamente implica la procreación de nuevos individuos, por ello se ha planteado que no tiene otro significado que su propia ejecución (Agmo, 1999) y es intrínsecamente hedónica y reforzante (Camacho *et al.*, 2007); lo cual

hace suponer que si la conducta sexual se ve afectada en el individuo, puede impactar en otros ámbitos de su desarrollo personal (Perfiles de Salud Reproductiva, CONAPO, 2011).

Para su estudio, la respuesta sexual humana ha sido separada en cuatro fases, todas ellas resultado de la estimulación sexual. La primera de ellas se caracteriza por la activación cortical y medular en el sistema nervioso, la cual se correlaciona con un fenómeno de tumescencia (fases de excitación y meseta); la tercera está caracterizada por contracciones de músculo liso y/o estriado (fase orgásmica) y finalmente ocurre un fenómeno de detumescencia, tanto a nivel genital como extra genital (fase resolutive: Bianco, 1990).

En esta respuesta clásica hay que incorporar la aportación que Kaplan (1979), hizo a la misma, incorporando el factor del deseo sexual, que refiere a las fantasías sobre la actividad sexual y el deseo de llevarlas a cabo. Dicha clasificación tiene utilidad clínica, ya que muchos procesos patológicos, como son las alteraciones en el mecanismo de unión del par cromosómico 23, alteraciones en la síntesis hormonal o en los receptores de hormonas sexuales, alteraciones en el núcleo supraquiasmático (que es sexualmente dimórfico), daños a nivel anatómico (principalmente en venas y arterias), infecciones, enfermedades degenerativas, metabólicas o de aprendizaje y neoplasias, pueden alterar la función sexual (Bianco, 1988).

La disfunción o insatisfacción en cualquiera de las principales áreas de interés en el comportamiento puede surgir como resultado fisiopatológico y mecanismos psicológicos (Baggaley, 2008). La disfunción sexual es un trastorno que afecta la sexualidad tanto en hombres como en mujeres, influyendo de forma directa a la salud física y mental, distorsionando el equilibrio familiar, laboral y social (Real, 2010).

Modelos de estudio de la conducta sexual

El análisis del comportamiento sexual de la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) se ha utilizado como un modelo para realizar aproximaciones experimentales y conocer más sobre sus bases biológicas, neurales, hormonales y anatómicas. Esto debido a que, en general, los roedores son útiles para estudios del comportamiento sexual por las siguientes razones: 1. comparte muchas de las bases fisiológicas de los mamíferos en general, 2. Su tamaño permite mantener a los individuos experimentales en condiciones de laboratorio a bajo costo, 3. Su sistema neuroendocrino se asemeja mucho al del humano, 4. Presentan un comportamiento copulatorio oportunista, es decir, pueden copular bajo diferentes condiciones (Pfaus *et al.*, 2003).

Por los motivos antes mencionados, así como por el hecho de que hoy en día los índices confiables de la pubertad y de la maduración sexual, se han tomado de los modelos utilizados en la rata macho (Stoker *et al.*, 2000). El presente estudio se enfoca en los mecanismos involucrados en la maduración sexual de estos organismos, con la finalidad de poder extrapolar los resultados de nuestros experimentos en el ser humano.

Conducta sexual en la rata macho

La **conducta sexual en la rata macho (CSM)** es probablemente una de las mejor descritas entre los mamíferos. Dentro de estas conductas se distingue una serie de comportamientos que se reconocen como precopulatorios, copulatorios y postcopulatorios. Durante la conducta precopulatoria, el macho y la hembra se persiguen, hay exploración del área anogenital de la hembra, y se emiten vocalizaciones ultrasónicas (Lucio & Tlachi-López, 2008). Durante las conductas copulatorias en la rata macho se presentan diferentes patrones motores innatos y

altamente estereotipados que pueden distinguirse fácilmente en tres conductas: 1. Monta, 2. Intromisión y 3. Eyaculación (Guevara-Pérez & Hernández-González, 2006; Hull *et al.*, 2006). Finalmente, durante la conducta postcopulatoria, en el macho se da el periodo refractario absoluto y el relativo. En el periodo refractario absoluto el macho presenta poca locomoción, es insensible a estimulación sexual y poco sensible a otro tipo de estímulos; mientras que durante el periodo refractario relativo el macho empieza a responder a estímulos externos y emite vocalizaciones ultrasónicas (Lucio & Tlachi-López, 2008).

Para facilitar su estudio, la conducta o interacción sexual en la rata macho, ha sido dividida en dos fases que se encuentran reguladas e inducidas por la acción de hormonas gonadales sobre estructuras del **Sistema Nervioso Central (SNC)** y órganos del aparato reproductor. La primera de estas fases la constituye la motivación sexual, que se refiere a los aspectos previos a la cópula que permiten al macho acercarse a la hembra entre los que se pueden mencionar el olfateo, la exploración anogenital, la persecución de la hembra, la emisión de vocalizaciones audibles o ultrasónicas y el acicalamiento. Si estas conductas son las adecuadas, entonces se da el apareamiento. Éste conforma la segunda fase de la conducta sexual, que también se conoce como fase ejecutoria, ejecución sexual o simplemente cópula. En esta fase se encuentran involucradas conductas como la monta del macho sobre la grupa de la hembra, la realización de movimientos pélvicos por parte del macho, la inserción peneana intravaginal y la eyaculación (Dewsbury, 1979; Agmo, 1999; Hernández-González *et al.*, 2002; Pfaff & Agmo, 2002).

Estudio de la motivación sexual

Como se mencionó con anterioridad, por motivación sexual entendemos todos los procesos que hacen que un animal busque contacto sexual con otro de su misma

especie (Hernández-González *et al.*, 2002). Sin embargo, dentro del grupo de los roedores, estas conductas exploratorias no reflejan completamente la motivación del individuo, por lo que hoy en día se utilizan pruebas más específicas para la evaluación de esta conducta (Arteaga-Silva *et al.*, 2005).

La evaluación de la motivación sexual, en roedores no ha sido sencilla, dado que algunos autores han descrito efectos sobre la motivación sexual en términos de medidas de la copula, tales como olfateo, acicalamiento anogenital, orientación del macho hacia la hembra, persecución antes de la primera monta o intromisión, latencia de monta y la latencia de intromisión, sin embargo estas medidas reflejan componentes de la ejecución sexual (Hernández-González *et al.* 2002).

Motivación sexual incentiva

Un método sencillo y directo para medir la motivación sexual es la prueba de **motivación sexual incentiva (MSI)**, que permite cuantificar las conductas de acercamiento con un fin sexual, y al mismo tiempo, dissociar esta conducta del acercamiento con un fin social utilizando una rata macho como incentivo social y una rata hembra como incentivo sexual. Éste método, diseñado en sus inicios por un grupo de investigadores suecos (Hetta & Meyerson, 1978; Meyerson *et al.*, 1979; Eliasson & Meyerson, 1981) y posteriormente modificado por el Dr. Agmo en el 2002 consiste en un campo abierto con forma rectangular, con dos cajas laterales donde se coloca a los incentivos sexual y social, separados de la arena principal por una malla de alambre. El sujeto experimental es libre de moverse por toda la arena principal y la medida de las conductas de acercamiento es el tiempo que pasa el sujeto experimental en el área próxima al incentivo sexual comparada con el tiempo que pasa en cercanía con el incentivo social (Agmo, 2010). Utilizando este procedimiento se ha podido demostrar que el valor del “incentivo sexual” depende de

hormonas gonadales que en los machos corresponden a andrógenos y en las hembras corresponden a estrógenos (Agmo, 2003b; Ellingsen & Agmo, 2004).

Regulación de la conducta sexual masculina

La regulación de la conducta sexual es sumamente compleja e involucra la interacción de diferentes hormonas gonadales con neurotransmisores en áreas neuroanatómicas implicadas en la regulación de la copula (Hull *et al.*, 2006). A continuación se analiza el papel que juegan las principales hormonas, así como de las diferentes áreas cerebrales que regulan la CSM.

Regulación neural de la conducta sexual masculina

Existen diversas estructuras cerebrales a las cuales se les ha involucrado con expresión y mantenimiento de la conducta sexual. Entre éstas, se encuentran la **amígdala medial (meA)**, la corteza frontal, el septum lateral, el **hipotálamo (HYP)**, el **área preóptica medial (APOm)**, el **área tegmental ventral (ATV)** y la médula espinal. Además, existe suficiente evidencia de que las respuestas de erección y eyaculación son mecanismos reflejos (Meisel & Sachs, 1994).

El sistema vomeronasal y el **bulbo olfatorio (BO)** permiten la entrada de estímulos químico-sensoriales. En una primera etapa, la información procedente del BO principal y accesorio, así como los estímulos somatosensoriales del área pélvica son procesados en la meA (Hull *et al.*, 2006). Posteriormente, tanto la información recopilada por la meA, como la recopilada por la vía de núcleo basal de la **stria terminalis (BNST)**, van hacia el APOm y son esenciales para la expresión de la cópula en ratas macho (Kondo & Arai, 1995).

Diferentes estructuras cerebrales han sido implicadas de manera importante en el procesamiento de los estímulos incentivos sexuales en los machos. El sistema vomeronasal y el BO principal probablemente son las áreas encargadas de recibir los estímulos más importantes para la manifestación de la conducta sexual en las ratas macho. Como se observa en los estudios de Hull *et al.*, (2006), en los que se demostró que la bulbectomía olfatoria bilateral, produce incapacidad para copular y para tener erecciones sin contacto, siendo más susceptibles los machos sexualmente inexpertos

La amígdala es un núcleo de suma importancia en las conductas motivadas, algunos estudios han sugerido que el **núcleo central de la amígdala (CeA)** juega un papel crítico en los eventos emocionales positivos representados por el refuerzo (See *et al.*, 2003). También se sabe, que la meA participa en el procesamiento y la expresión de conductas emocionales (Davis, 1992; Leroux, 1992; Gallagher & Holland, 1994). Además, la meA es otra de las estructuras que participa como un importante sitio de integración de las señales sensoriales y hormonales como lo demuestran los estudios de (Wood, 1998). Se ha sugerido que la **región posteromedial amigdalina (MEpd)** está específicamente involucrada en el procesamiento de los estímulos sexuales (Kollack-Walker & Neuman, 1992) como fue demostrado en hámster machos, en los cuales, después de que la amígdala fuera lesionada se registró una disminución en la preferencia de los olores desprendidos por el sexo opuesto (Maras & Petrulis, 2006).

Asimismo, existen datos de que las lesiones en la amígdala basolateral también alteran la capacidad de las ratas para discriminar olores, así como señales auditivas y visuales (Baxter & Murray, 2002). En los humanos también se tienen evidencias de que estas estructuras cerebrales y unas cuantas más participan en los procesos de activación y motivación sexual (Beauregard *et al.*, 2001).

Por otra parte, algunos estudios realizados en ratas macho sugieren que la APOm también se encuentra involucrada en la regulación de la CSM ya que la lesión

bilateral en ésta área suprime la conducta sexual de ratas macho (Everitt & Stacey, 1987).

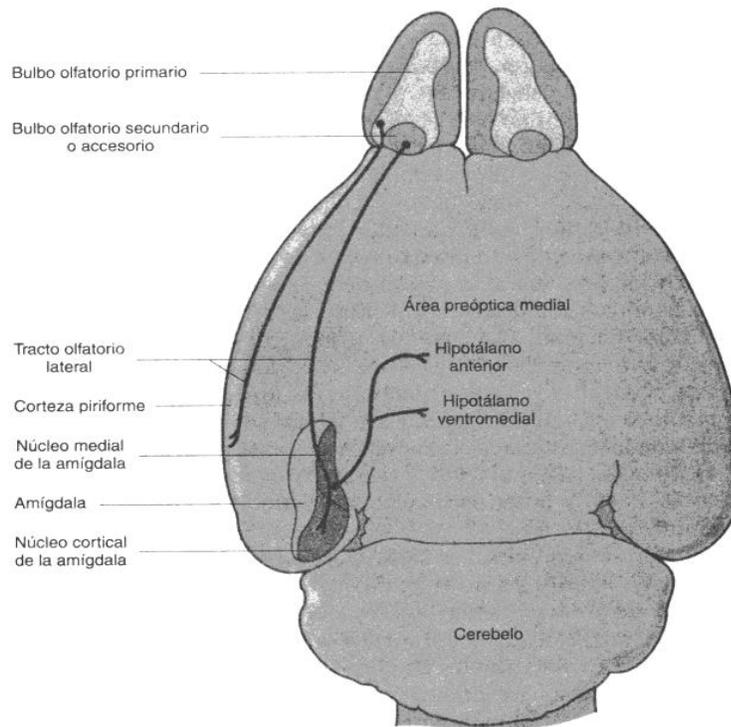


Fig. 1 Esquema donde se representa la regulación neural de la conducta sexual. El bulbo olfatorio es la vía por donde entran los estímulos olfativos, que viajan a través del tracto olfatorio lateral y son procesados en el núcleo medial de la amígdala y el núcleo de la cama de la *stria terminalis*; finalmente, estos estímulos químico-sensoriales serán procesados en el área preóptica del hipotálamo. Tomado de Hull *et al.* 2002.

Regulación hormonal de la conducta sexual masculina

De manera general se ha descrito que, dentro de las especies de mamíferos estudiadas, el retiro de hormonas gonadales por medio de la castración provoca una reducción de la CSM, disminuyendo tanto la motivación como la ejecución sexual. En los estudios realizados con ratas macho, se ha reportado que la castración provoca

que: 1. Aumentan las latencias de monta y de intromisión, 2. al cabo de una o dos semanas posteriores a la castración, las ratas pierden la capacidad para lograr intromisiones y la eyaculación y 3. La monta es la última conducta copulatoria en desaparecer y posteriormente desaparece completamente el despliegue de la conducta sexual (Larsson, 1979; Meisel & Sachs, 1994).

En relación con el componente motivacional se sabe que cuando se extirpan los testículos, el impulso sexual también decae rápidamente, observándose que los machos castrados no buscan a las hembras, ni luchan para lograr el acceso a ellas y esta actividad sexual puede ser restituida mediante la administración de hormonas testiculares (Beach & Holtz, 1946).

El tratamiento con **testosterona (T)** puede invertir los efectos de la castración sobre la conducta reproductora de la rata macho. El restablecimiento de la CSM después de una terapia sostenida de andrógenos refleja la manera en que desaparecieron estas conductas: primero se presenta la monta, y a continuación le siguen las intromisiones y por último la eyaculación. Si la terapia de restitución con andrógenos se inicia inmediatamente después de la castración a lo cual se le llama tratamiento de mantenimiento, se necesitan niveles más bajos de hormonas para recuperar la conducta sexual. Si se inicia el tratamiento hormonal más tarde, a lo cual se le conoce como tratamiento de restablecimiento, los niveles de hormonas que se necesitan son más altos (Davidson, 1966).

Como se mencionó en el apartado anterior, la administración de T, puede mantener la conducta de apareamiento en los roedores castrados (Sachs & Meisel, 1988); sin embargo la administración de **5 α -dihidrotestosterona (5 α - DHT)** que es un metabolito obtenido a partir de una 5 α -reducción de la T, no evita el decaimiento post-castración en la conducta copulatoria, independientemente si se suministra en el momento de la castración o después de varios días (Feder, 1971). La 5 α - DHT es importante para el mantenimiento y función de los órganos sexuales accesorios como las vesículas seminales, la próstata y el pene, entre otros. Así, la T procedente

de los testículos parece funcionar principalmente como una pre-hormona que suministra, por un lado, estrógenos a estructuras del SNC que regulan la expresión de la CSM y, por otro, la 5 α -DHT a la periferia para regular el mantenimiento de los órganos sexuales accesorios necesarios para la expresión de las conductas copulatorias (Sachs & Meisel, 1988).

La administración de **17 β -estradiol (E₂)**, producto de la aromatización de la T, solo restituye parcialmente la actividad sexual en las ratas macho castradas, las cuales presentan montas e intromisiones, pero la conducta de eyaculación se restablece únicamente en las ratas que tuvieron experiencia sexual previa a la castración o en quienes el tratamiento se inició inmediatamente después de la cirugía (Davidson, 1969). Por otro lado, el tratamiento combinado de E₂ con 5 α -DHT reestablece, en los machos castrados, las conductas de monta, intromisión y de eyaculación (Larsson *et al.*, 1973; Södersten, 1973).

Todos estos hallazgos han llevado a la conclusión de que la expresión de la CSM en la rata depende de la acción sinérgica de un estrógeno y de un andrógeno (Beyer, 1998) pero puede verse afectada por factores ambientales (Bancroft, 1993).

Receptores para andrógenos y estrógenos

Numerosos trabajos han hecho evidente que las hormonas gonadales son esenciales para la generación de estímulos que activan las conductas de motivación sexual, así como también para la adecuada ejecución de los actos sexuales consumatorios. Actualmente se sabe que tanto los **receptores para andrógenos (RA)** como los **receptores para a estrógenos (RE)** se encuentran ampliamente distribuidos en estructuras cerebrales que están implicadas en la modulación de la ejecución y motivación sexual.

El RE es una proteína que pertenece a la súper familia de los receptores nucleares (Evans, 1988) y en la actualidad se conocen dos isoformas de, denominadas α y β , a los cuales el E_2 se une con gran afinidad (Kuiper *et al.*, 1997). El descubrimiento de las dos isoformas del RE incrementó significativamente la complejidad del estudio de la fisiología de los estrógenos, sin mencionar que existen también receptores localizados en la membrana que median igualmente funciones de estas hormonas. Nilsson & Gustafsson (2002) proponen diferentes mecanismos para la acción del E_2 , sugiriendo que la reproducción puede estar regulada por ambos receptores. Aunado a esto se ha encontrado la presencia de estos dos tipos de receptores en tracto reproductor de la rata macho y el ratón, presentándose una mayor cantidad de RE β ; lo cual también ha sido reportado en otras especies de mamíferos (Hess, 2003).

Los RE están conformados por seis dominios denotados con letras que van de la A a la F. La región AB se encuentra localizada del lado aminoterminal de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Esta región tiene la función de activación de la transcripción genética (Activation Function 1 o AF-1) y posee varios sitios de fosforilación, importantes para el proceso de activación proteínicas, especialmente en aquellos procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1992; Pietras *et al.*, 1995). El dominio C corresponde al sitio de unión del DNA y es la parte más conservada entre los receptores nucleares. Está compuesto por nueve residuos de cisteínas, de los cuales ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{+2} para formar dos dedos de zinc, que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al DNA. La unión a una secuencia específica en el DNA está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc, conocida como capa P (P box; Freedman, 1992). El dominio D conforma la región bisagra de la molécula. Es en este sitio donde se encuentra unida la proteína chaperona de golpe de calor 90, la cual permanece unida al receptor mientras se encuentra en estado inactivo; y finalmente la región EF que se encuentra en el extremo

carboxiterminal, es también conocida como región de unión al ligando o región LBD, la cual reconoce a estrógenos naturales o a ligandos sintéticos que pueden ser antagonistas totales o moduladores selectivos de los RE y pueden activar o inhibir al receptor, dependiendo del contexto celular (Ver Fig. 2; Noriega-Reyes & Langley-Mc Carron, 2008). Los estrógenos pueden ejercer sus efectos a través de efectos genómicos y no genómicos mediados por el RE de membrana.

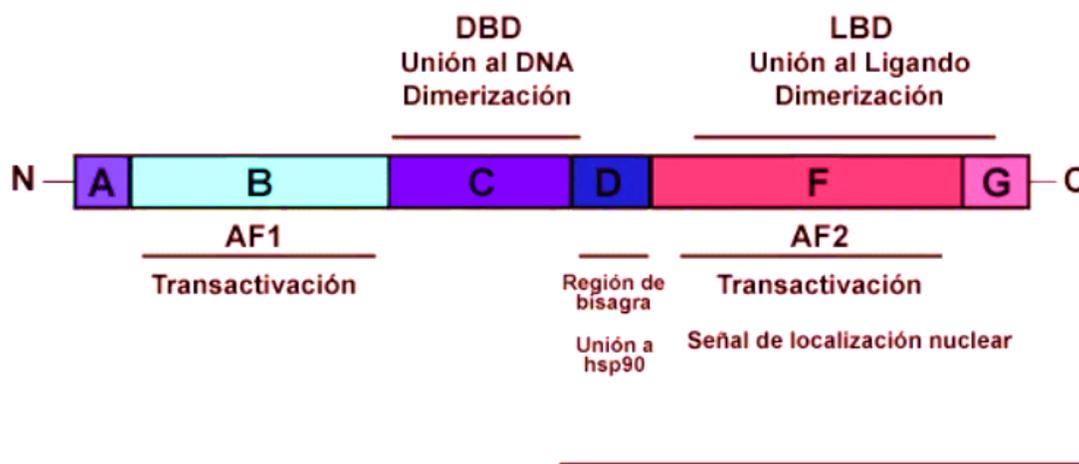


Fig. 2 Esquema que muestra de manera general los dominios funcionales del RE. Tomado de Márquez 2012 (Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3012.pdf).

Efectos genómicos del Receptor de estrógenos

Este mecanismo clásico de acción de hormonas esteroideas establece que el RE es activado al unir el E₂, y así actúa como un factor de transcripción al unirse al DNA, estimulando la transcripción de genes y ejerciendo su acción en el núcleo celular (Evans, 1988; Beato *et al.*, 1996). Después de la unión del ligando al receptor, ocurre un proceso de homo o heterodimerización (dos RE α o un RE α se heterodimeriza con un RE β) y se da el reconocimiento de una secuencia específica del DNA (Lieberman, 1997). En consecuencia se activa el proceso de transcripción al formarse el complejo de iniciación de la transcripción al cual se le van a unir una serie de proteínas

correguladoras llamadas “Proteínas de interacción con los receptores” o RIPs, que pueden activar o reprimir el proceso de transcripción (Ver Fig. 3).

Este proceso genómico, donde se induce la síntesis de RNA que resulta en la producción final de nuevas proteínas, requiere de por lo menos 1 o 2 horas después de iniciado el tratamiento hormonal (Lieberman, 1997).

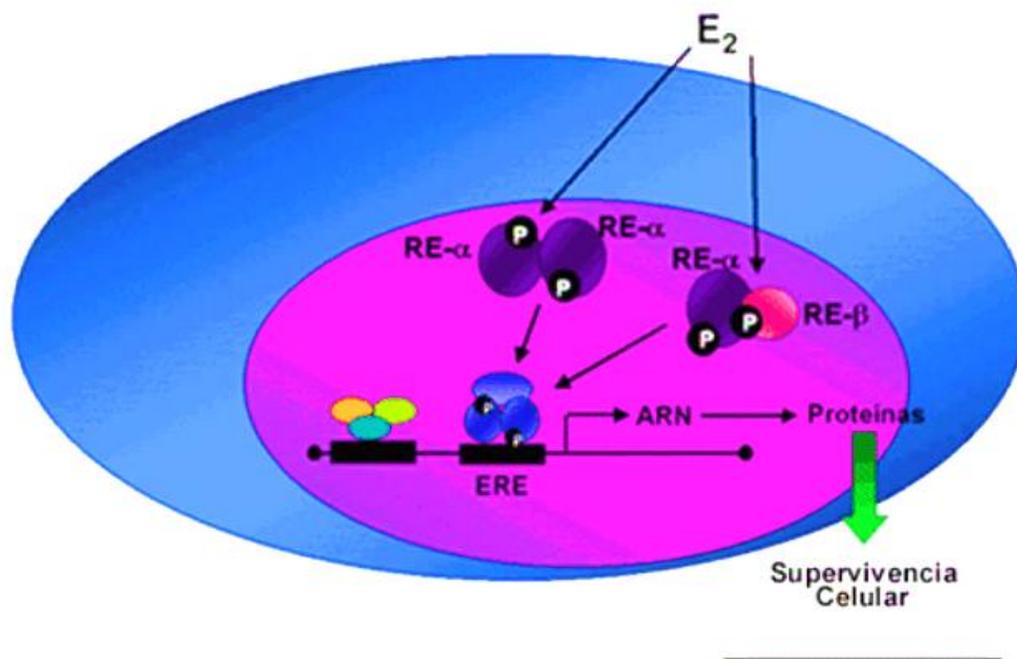


Fig. 3 Esquema que muestra los efectos genómicos del RE. En este proceso ocurre la activación del $RE\alpha$ o $RE\beta$ al unir el E_2 . Una vez que este atraviesa la membrana celular. La activación de la transcripción ocurre a nivel del núcleo celular después de la homo o heterodimerización del receptor, estimulando así la síntesis de genes que promueven la supervivencia celular. Tomado de Márquez 2012 (Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3012.pdf).

Efectos no genómicos del Receptor de estrógenos

El modo de acción no genómico del RE es un proceso rápido, que ocurre en pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas para poder producir su efecto, por esta razón debe ser mediado por

un **receptor de estrógenos localizado en la membrana (REm)**. Entre estos efectos rápidos se encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas kinasas asociadas a la membrana (Ver Fig. 4; Nemere, 1998; Watson, 1999; Falkenstein, 2000).

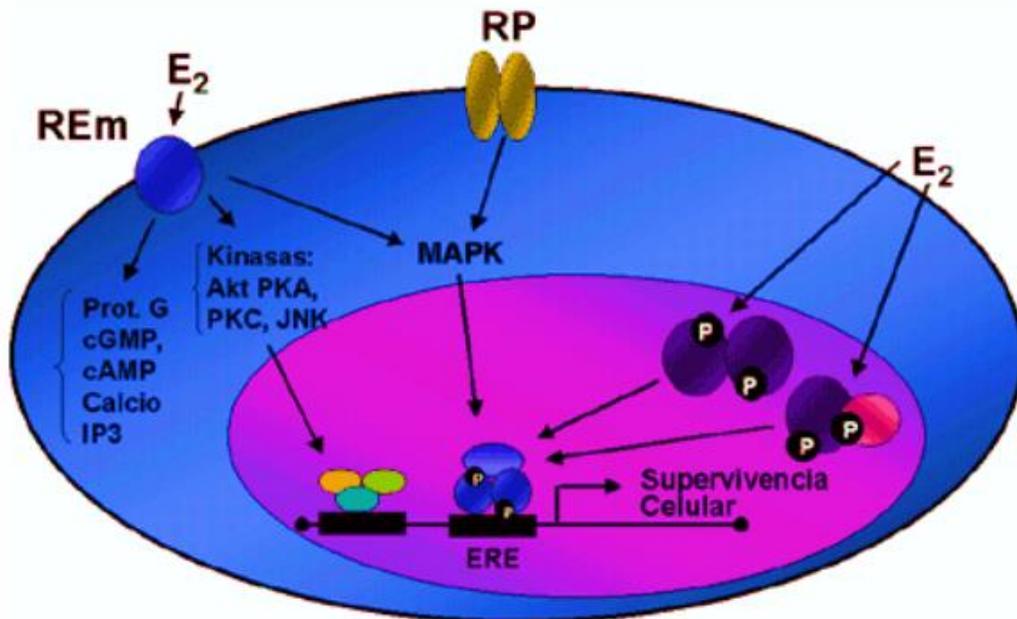


Fig. 4 Esquema que muestra los efectos no genómicos del RE a través de un REm. En este proceso, el receptor se une al E₂ y activa diferentes cascadas de señales que pueden estimular la activación de mecanismos genómicos. Entre los efectos mediados por el receptor de membrana están la activación de canales de Ca⁺², proteínas G, interacción con receptores de péptidos, activación de kinasas, etc. Tomado de Márquez 2012. Disponible en http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3012.pdf.

Receptor de andrógenos

Los efectos biológicos de la T y la 5α-DHT son mediados a través del RA (Xing *et al.*, 2001; Gelman, 2002; Matsumoto *et al.*, 2005; Dehms & Tindall, 2007; Zhu & Kyprianou, 2008). Por su parte los RA responden principalmente a la T, sin embargo, tiene mayor afinidad por su principal metabolito: la 5α-DHT. Además, el complejo 5α-

DHT-receptor es más estable que el complejo T-receptor (Amado & Flórez, 1998). El RA tiene cuatro dominios funcionales: 1) un dominio NH₂-terminal (NTD), encargado de la activación transcripcional y es el más variable entre los receptores nucleares tanto en longitud como en secuencia (Heinlein & Chang, 2002; Gelman, 2002) 2) un **dominio de unión a DNA (DBD)**, localizado en la parte central de la molécula del RA y su función es reconocer secuencias específicas del DNA, 3) un **dominio de unión al ligando (LBD)**, encargado de la dimerización y activación de la transcripción. Este dominio regula la interacción entre el RA y las **proteínas de choque térmico (Hsp)** e interactúa con el dominio NTD del receptor para estabilizar la unión del andrógeno (Heinlein & Chang, 2002) y 4) una región bisagra, no conservada y flexible, encargada de unir a los dominios LBD y DBD y de regular la unión al DNA, la translocación nuclear y la transactivación del RA (Haelens *et al.*, 2007). El RA tiene efectos importantes durante el transcurso de la vida del macho, que van desde el desarrollo en la pubertad y la madurez sexual hasta alteraciones en su regulación que conllevan a o al desarrollo de patologías como la hiperplasia y cáncer de próstata.

RE α y β , RA y Conducta Sexual

Recientemente se ha encontrado la presencia de RA y RE en las siguientes tres estructuras: 1. El área preóptica media, 2. El núcleo amigdaloides medial y 3. El núcleo ventromedial del hipotálamo (Abdelgadir *et al.*, 1999; Michael *et al.*, 1989; Roselli *et al.*, 1987, 1991). Reportándose densidades cerebrales más altas de RE y RA en el núcleo ventromedial del hipotálamo y el bulbo olfatorio (BO) (Genazzani *et al.*, 1996), la **amígdala cortico medial (AMGco)**, el APOm, el HYP y la hipófisis, entre otras estructuras cerebrales participan en el inicio y mantenimiento de la CSM (Wood & Newman, 1995; Shughrue *et al.*, 1997, 1998; Portillo *et al.*, 2006). Incluso existen evidencias que sugieren que los RE y RA pueden estar contenidos dentro de las mismas células neuronales de estas estructuras (Enmark & Gustafsson, 2001).

Sin embargo, los RE α se han implicado como los principales encargados de la regulación de la CSM. Se ha demostrado que en ratones en los que se eliminó el gen que codifica para los RE α (Knockout o KO), la ausencia de éste receptor suprime la CSM y afecta a las conductas copulatorias (Wersinger & Rissman, 2000; Domínguez-Salazar *et al.*, 2004; Portillo *et al.*, 2006). Además, se ha observado que también los RE β juegan un papel importante como parte de la regulación, tanto del inicio de la pubertad, como de la conducta eyaculatoria en los ratones a los que se les aplicó esta misma técnica de KO (Temple *et al.*, 2003).

Neurotransmisores que regulan el comportamiento copulatorio

Existe una cascada excitatoria e inhibitoria que se expresa a través de la vía dopaminérgica y su receptor D2 en el **núcleo accumbens (Acc)** y en el **hipocampo (Hip)** que comienza en el HYP liberando **noradrenalina (NA)** y **serotonina (5-HT)**, las cuáles a su vez causan la liberación de encefalinas (opiodes) en el ATV y que inhibe a su vez, la actividad de neuronas que liberan el **ácido gamma aminobutírico (GABA)**, neurotransmisor inhibitorio proveniente de la *substancia nigra* del mesencéfalo. Esta acción, bloquea las neuronas que contienen **dopamina (DA)** en el ATV y en la **amígdala (AMY)**, favoreciendo la liberación de la DA en el Acc y en ciertas partes del Hip. Este complejo de eventos neurales permite la actividad de la vía final común dopaminérgica relacionada con la modulación de la de la CSM (Mitchell & Gratton, 1994)

Algunos estudios con sustancias que bloquean en forma específica a un neurotransmisor, han permitido conocer la participación específica de algunos de ellos en la regulación de la cópula. Respecto a los receptores de adrenalina se sabe que el receptor alfa 2 adrenérgico inhibe la CSM, mientras que el alfa 1 y beta 2 la facilitan, y el beta 1 no tiene ningún efecto (Clark *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1987). La influencia que ejerce la DA sobre la función sexual ha sido estudiada bajo la

administración de antagonistas dopaminérgicos como el haloperidol o el flupentixol, de lo cual se ha observado que se reduce el número de animales que copulan, el número de animales que eyaculan, y se incrementan la latencia de intromisión y el intervalo posteyaculatorio (Paglietti *et al.*, 1978, Pfaus & Phillips, 1989).

Originalmente se pensaba que la función exclusiva de la 5-HT en el cerebro era inhibir la CSM (Malmnas & Meyerson, 1971), sin embargo, después de que se describieran diferentes subclases de receptores para 5-HT éste concepto se ha modificado, pues se sabe que los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₂ ejercen funciones opuestas. Los primeros facilitan la cópula, mientras que los 5-HT₂ la inhiben (Klint & Larsson, 1995). Por otra parte, la participación del GABA sobre la CSM ha sido muy complicada de investigar, pues la manipulación del sistema GABAérgico generalmente se acompaña de alteraciones motoras, por lo tanto, ha resultado difícil distinguir si es la alteración motora la que impide que el macho copule o si realmente no quiera copular. Sin embargo, la administración de antagonistas de GABA A/B directamente sobre el sistema nervioso ejerce un efecto inhibitorio sobre la cópula. Aunque la infusión de agonistas de este neurotransmisor no restauran éste efecto inhibitorio sobre el comportamiento copulatorio (Fernández-Guasti *et al.*, 1986). Finalmente, se ha observado que la acetilcolina regula la actividad de los músculos estriados necesarios para realizar los patrones copulatorios de monta e intromisión, y está involucrada en la erección peneana. Existe evidencia que sugiere que este transmisor sólo influencia mecanismos periféricos (Agmo, 1976; Dail *et al.*, 1986).

Antecedentes

El desarrollo postnatal de la rata macho consiste en una serie de eventos que clásicamente se ha caracterizado por presentar cuatro periodos; los cuales comprenden: 1) Período neonatal, el cual abarca la primera semana después del nacimiento; 2) Período infantil, que se extiende del día 8 postnatal hasta el día 21 ; 3) Período juvenil, que se presenta del día 22 hasta el día 35 de vida postnatal; 4) Período peripuberal, el cual comprende del día 55 al 60 de vida postnatal (Clegg, 1960; Ojeda, 1980). Sin embargo, recientemente, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, se observó que la etapa considerada como peripuberal inicia desde el día 35 hasta el día 56 de vida postnatal, coincidiendo con los picos máximos de T, justo en los días 35 al 49, antes de establecerse la maduración sexual (Arteaga-Silva *et al.*, 2013).

Por otro lado, en cuanto a la regulación hormonal de la maduración sexual, se sabe que las hormonas sexuales implicadas en este fenómeno tienen un efecto organizador sobre el desarrollo anatómico y funcional del SNC. Durante las primeras fases del desarrollo embrionario y después de éste, la acción prenatal de las hormonas gonadales sobre la organización de sustratos neurales, es la que regulara las conductas típicas masculinas y femeninas que se presenta en los individuos durante la madurez sexual. De tal forma, que ya en la edad adulta, estas mismas hormonas activan, modulan o inhiben la función de los circuitos neuronales que participan en la expresión de la conducta sexual (Phoenix *et al.*, 1959).

Factores que afectan la Conducta sexual

La correcta expresión de la conducta copulatoria en los mamíferos depende de múltiples factores neuroendocrinos, sin embargo; puede verse afectada por factores

ambientales. En este contexto, se ha reportado que algunos contaminantes pueden interferir en el desarrollo y maduración sexual de organismos expuestos a estos contaminantes, impidiendo los procesos reproductivos propios de la especie (Frye *et al.*, 2012).

Los contaminantes a los que los organismos están expuestos pueden ser metales pesados, derivados de plásticos o fertilizantes. Dentro de este aspecto, es importante considerar que los niños y adolescentes se pueden encontrar en mayor riesgo al estar en contacto con metales pesados como el **cadmio (Cd)**, que se encuentra en algunos juguetes, accesorios electrónicos, lápices y material de arte como pinturas, entre otros productos. De tal forma, que desde edades muy tempranas los seres humanos se pueden ver expuestos a este metal, que se almacena en el organismo y puede provocar alteraciones gastrointestinales, pulmonares y neurotóxicas (Järup *et al.*, 1998).

La información toxicológica que se tiene sobre la exposición crónica a los productos químicos en los juguetes, en diferentes fases del desarrollo humano, suele ser incompleta, debido a que estos químicos interfieren con las funciones reproductivas en los machos, afectando el sistema neuroendocrino, y dando como resultado alteraciones en los órganos reproductores y en estructuras cerebrales que regulan la expresión de la conducta sexual (Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química, Quinta Reunión-Foro V, 2006).

Dentro de los químicos que se han estudiado como agentes tóxicos, se encuentra los metales pesados, como el **plomo (Pb)**, el **cobre (Cu)**, el **zinc (Zn)** y el Cd. De estos, el Cd es un metal ampliamente utilizado para proteger contra la corrosión al hierro y al acero, se utiliza en la fabricación de pinturas para colorear cerámicas y plásticos, así como en la fabricación de las baterías de hidróxido de Ni-Cd para la industria automotriz. En la agricultura forma parte de fertilizantes fosforados y de pesticidas. De tal forma, que en la actualidad, las cantidades de Cd a las cuales los seres humanos nos vemos expuestos, es el resultado de las

actividades industriales humanas (Instituto Nacional de Ecología y cambio climático, 2009)

El Cd y sus compuestos, son vertidos a las aguas a través de los relaves mineros y desagües de las industrias, depositándose en los ríos y lagos, y llegando a los alimentos a través de las aguas de riego (Wuana & Okieimen, 2011). Adicionalmente, puede ser ingerido a través de los artículos de cerámica utilizados en la cocina, especialmente cuando son usados para contener sustancias ácidas como los jugos cítricos y el vinagre, produciendo una reacción con el vidriado de dichos artículos, extrayéndose cantidades de Cd que contaminan los alimentos y bebidas. De tal forma, que los seres humanos nos encontramos continuamente en contacto con el Cd, el cual es considerado un tóxico público por su impacto sobre el ambiente y por los daños que ocasiona sobre la salud (ATSDR, 1988). Se ha reportado que la exposición al Cd se asocia con cáncer pulmonar y de próstata, insuficiencia renal, enfermedades cardiovasculares, trastornos gastrointestinales y en el hígado (Fowler, 2009).

Además, algunos estudios de exposición a Cd en madres embarazadas muestran una concentración promedio de 1.2 µg/L de Cd en la sangre del cordón umbilical y una concentración de 1.4 µg/L en la sangre materna, mismas que deterioran la función neuropsicológica de los niños (Benítez *et al.*, 2009). En cuanto a los efectos neurotóxicos del Cd en ratas de 13 días de edad se encontró una expresión aumentada de las MTs como respuesta al daño inducido por este metal. Estos resultados sugieren que la exposición ambiental al Cd puede ser un factor que modifique la salud neurológica de los niños en la Ciudad de México (Ríos, 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que la exposición al Cd puede afectar seriamente la salud reproductiva, causando infertilidad tanto en machos como en hembras de diferentes especies (Byrne *et al.*, 2009; Siu *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Mouritsen *et al.*, 2010).

Los reportes de afectaciones a la salud por Cd han ido en aumento, así que se ha tenido que normar tanto a nivel nacional (NOM-009-SSA1-1993) como internacional (OMS, 2006). De estas normas, se sabe que las cantidades de Cd a las que un ser humano puede exponerse van desde 0.25 a 0.50 ppm. Sin embargo, es muy escaso el conocimiento que se tiene sobre los niveles a los que realmente estamos expuestos a nivel nacional, tanto en zonas industrializadas como en rurales. De esto se desprende la necesidad de ampliar la información acerca de los efectos que la exposición a Cd puede ejercer sobre sustratos neurales y órganos reproductivos, a través del estudio de conductas tales como los de la CSM.

Química del cadmio

Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR, 1988), en la actualidad, el Cd es considerado como uno de los metales más tóxicos, razón por la cual se han realizado numerosas investigaciones respecto a los efectos que causa tanto a nivel neurológico como a nivel de los órganos sexuales.

El Cd es un elemento del grupo II-B, con peso atómico de 112.4 y número atómico de 48; es un metal suave, color plata-blanquecino que generalmente no se presenta en el ambiente en forma pura pero forma compuestos con otros elementos como el oxígeno (óxido de Cd), cloro (cloruro de Cd) o azufre (sulfato y sulfuro de Cd). Además, este elemento se asemeja al Zn pero difieren en sus puntos de ebullición, 907 y 767 °C, respectivamente (ATSDR, 1998). Tanto el Cd como el Zn forman una capa completa de electrones, lo que explica la falta de estabilización en los campos del ligando, cuya estereoquímica está determinada casi exclusivamente por consideraciones electrostáticas; la geometría de coordinación de ambos metales es igualmente adaptable (Valle, 1995).

El Cd es uno de los mayores agentes tóxicos asociados a contaminación ambiental e industrial, pues reúne cuatro de las características más distintivas de un tóxico, (Ramírez, 2002) que son:

1. Causa efectos adversos para el hombre y el medio ambiente.
2. Presenta bioacumulación.
3. Persiste en el medio ambiente.
4. Es transportado a grandes distancias por el viento y el agua.

Principales fuentes de contaminación y exposición al cadmio

Las principales fuentes de contaminación de Cd son: la industria minero-metalúrgica de metales no ferrosos, la metalurgia del hierro y acero, la fabricación de fertilizantes fosfatados, la incineración de residuos de madera, carbón o “plásticos”, la combustión de aceite y gasolina, y las aplicaciones industriales de Cd.

La concentración de Cd en aire de áreas industriales varía entre 9,1 y 26,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ frente a un 0,1 a 6 ng/m^3 en el aire de áreas rurales y el tiempo de permanencia del Cd en suelos es de hasta 300 años y el 90% permanece sin transformarse (Ramírez, 2002). El Cd llega al suelo de los terrenos agrícolas por deposición aérea (41%), con los fertilizantes fosfatados (54%), por aplicación de abono de estiércol (5%) y frecuentemente por efluentes que contienen residuos líquidos y sólidos de plantas hidrometalúrgicas de Cd (Ramírez, 2002).

De menor importancia en contaminación ambiental por Cd son las partículas de polvo de caucho provenientes de las ruedas de automóvil, de la galvanización con Zn de tuberías, de plásticos que contienen pigmentos coloreados de Cd y de la industria de cerámica glaseada. Se ha descrito intoxicación por uso doméstico de algunos utensilios bañados en Cd o por usar cubiertos de plata aleada con Cd y

pinturas a base de Cd. Entre la exposición no ocupacional, la alimentación y el tabaco constituyen las dos fuentes principales de exposición a este metal. Los fumadores pueden inhalar 0.1 a 0.2 μg de Cd por cada cigarrillo con una absorción aproximada del 50%. Es por ello que, los fumadores forman un grupo especial, cuando se investigan los efectos tóxicos por exposición a Cd (Ellis *et al.*, 1979; Levy *et al.*, 1998).

Respecto a la exposición al Cd por la alimentación, se sabe que la absorción del Cd se da por el tracto gastrointestinal y es de aproximadamente el 50%. El Cd es un elemento ubicuo que está presente en mayor o menor grado en todos los alimentos. De manera general, la concentración de este metal en los alimentos es relativamente baja, siendo en los alimentos de origen vegetal en los que se encuentran las concentraciones más altas, que no suelen superar los 200 mg/kg de peso fresco. Las carnes y pescados contienen niveles de Cd del orden de 50 mg/kg y en los productos lácteos y huevos la concentración de Cd es mucho menor. Sin embargo, algunos alimentos pueden contener concentraciones excepcionalmente altas de este metal, entre los que se encuentran los órganos internos de los animales de abasto, principalmente el hígado y los riñones, que pueden llegar a contener más de 1 mg/kg (Delfino, *et al.*, 2003). Estos alimentos son generalmente consumidos en forma esporádica y por ello la dosis tolerable de Cd propuesta por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 1989), es de 400 a 500 mg por semana para un adulto normal. Por otra parte, también se sabe que una dieta deficiente en Ca, Fe o proteínas incrementa la velocidad de absorción de este metal (Ramírez, 2002).

En cuanto a la exposición industrial, el Cd ingresa por inhalación de humos y vapores o por ingesta de los polvos de óxido de Cd y de sus compuestos. Los puestos de trabajo de mayor riesgo en exposición laboral se hallan en la industria metalúrgica primaria de Cd y de Pb–Zn, en la producción y uso de pigmentos de Cd, en la producción de estabilizadores de plásticos con Cd y en la fabricación de baterías de Ni-Cd. En el hombre, los efectos por exposición a Cd son: irritación de las

vías respiratorias, toxicidad renal, causa de osteomalacia y ser asociado con cáncer (Ramírez, 2002).

En nuestro país, un estudio realizado por Días-Barriga *et al.*, 1991, en tres poblaciones del estado de San Luis Potosí cercanas a un complejo metalúrgico donde se realiza la fundición de cobre y la refinería electrolítica del zinc, y donde se reporta la capacidad anual de 600 toneladas de Cd (IMMSA, 1999), se encontraron niveles de Cd en muestras de orina y cabello de hasta 1.45 y 0.91 µg/g en niños de entre 3-6 años. Posteriormente, en 1997, un estudio realizado por González, *et al.*, se encontró la presencia de éste metal en muestras de sangre de estudiantes de la UNAM en concentraciones mucho más altas que las reportadas en la literatura (0.25 µg/ dL).

En otro estudio presentado en nuestro país México en el año 2001 (Ríos, 2001), se encontró que existía una correlación de 58% entre las concentraciones de Cd en la sangre de la madre y las del cordón umbilical. Tal como lo narra el Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda, en su investigación se realizaron experimentos con ratas en desarrollo expuestas a concentraciones ambientalmente significativas del metal, los cuales mostraron graves alteraciones neurotóxicas. Estos resultados se compararon con las concentraciones altas de Cd en la sangre del cordón umbilical y la sangre materna de los recién nacidos (1.2 y 1.4 µg/L, respectivamente). Con esto se concluyó que la exposición ambiental al Cd puede ser un factor que modifique la salud neurológica de los niños en la Ciudad de México (Department of Health and Senior Services, 2007). Por todo ello se considera que la población de mayor riesgo son las mujeres, las personas con deficiencias nutricionales, con bajas concentraciones de hierro o trastornos renales, los fetos y los niños con bajas reservas corporales de hierro (Manahan, 2000).

Mecanismos de toxicidad del cadmio

El Cd tiene una gran variedad de órganos blanco donde ejerce sus efectos tóxicos, sin embargo, se ha demostrado que los principales órganos donde se bioacumula y ejerce su toxicidad son el hígado, los riñones, el hueso y el pulmón (ATSDR, 2012).

La presencia de Cd en la célula provoca estrés oxidativo, es decir, un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de la célula para defenderse de ellos mediante la actividad de enzimas antioxidantes (Ver fig. 5), afectando numerosos componentes celulares, tales como ADN, lípidos y proteínas, a través de reacciones de oxidación (Gill *et al.*, 1989b). Dentro de la célula, el Cd disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la **glutación peroxidasa (GPX)** y la **superóxido dismutasa (SOD)**, mecanismo que se ha propuesto para explicar los efectos neurotóxicos y cardiotóxicos del Cd (Jamall & Smith, 1985a).

También se ha demostrado que el Cd altera el metabolismo del Zn, Se, Ca, Fe y Cu (Petering *et al.*, 1979; Jamall & Smith 1985b). Xu *et al.*, (1995) proponen que la toxicidad inducida por el Cd en los testículos se debe a la interferencia de este metal en los procesos donde participa el Zn en el control de la transcripción del DNA y posteriormente conduce a la apoptosis. El secuestro del Cd por MTs impide la interrupción de los procesos transcripcionales dependientes de Zn (Xu *et al.*, 1995).

Se sabe que la administración de Cd aumenta los niveles de especies **reactivas de oxígeno (ROS)** en el testículo de la misma forma que lo hace en otros órganos, como el hígado. Además el Cd se considera un carcinógeno en humanos y se cree que puede interaccionar con otros metales (Cuypers *et al.*, 2010).

Por otro lado, el efecto más estudiado de éste metal es la modificación del balance de óxido reducción (**Red-Ox**; Cuypers *et al.*, 2010), lo que puede favorecer la interrupción del metabolismo de macromoléculas; por ejemplo: la degradación de proteínas o lipoperoxidación (**LPO**). Además, la elevada concentración de ROS puede activar vías de transducción de señales (Thévenod, 2009).

Neurotoxicidad por cadmio

En estudios experimentales con modelos animales, se ha demostrado que el Cd es capaz de inducir neurotoxicidad (Viaene *et al.*, 2000) y cambios en la neuroquímica normal del cerebro (Gutiérrez-Reyes *et al.*, 1998). Además, está reportado induce hemorragia y edema cerebral en ratas recién nacidas (Gabbiani *et al.*, 1967a; Wong & Klaassen, 1982; Méndez-Armenta *et al.*, 2001).

Los posibles mecanismos por los cuales el Cd induce daño a las neuronas son: la interferencia con los procesos dependientes del Ca y del Zn, la inducción de la apoptosis y el estrés oxidativo mediante la producción de ROS, lo que conduce a la ruptura de los potenciales de acción de las membranas mitocondriales y una consecuente reducción de los niveles intracelulares de glutatión, así como el aumento de la actividad de la catalasa (**CAT**) y la SOD (López *et al.*, 2006; Monroe & Halvorsen, 2006; Méndez-Armenta & Ríos, 2007; Nava-Ruíz & Méndez-Armenta, 2011). Este efecto bloquea completamente por factores neurotróficos exógenos, tales como el factor neurotrófico ciliar y el factor inhibidor de la leucemia, lo que con lleva a la inhibición de la transfosforilación de receptor asociado a Janus cinasas (**JAK1** y **JAK2**).

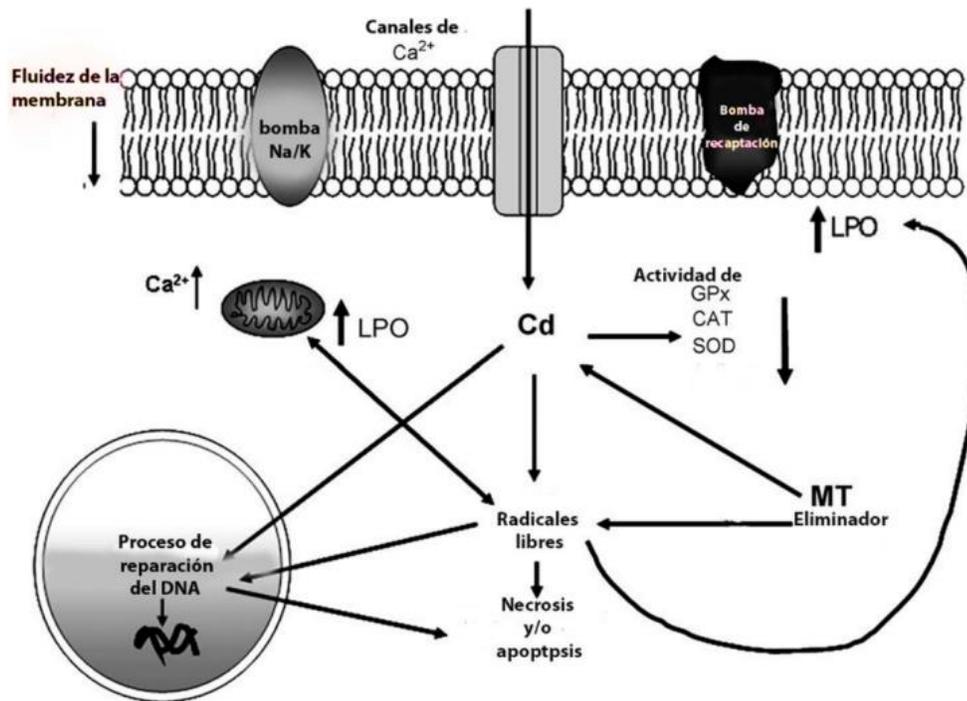


Fig. 5 Esquema que muestra los efectos neurotóxicos del Cd. El ion Cd entra en las células mediante canales de Ca e induce una disminución en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), lo que produce un aumento de radicales libres y aumenta los niveles de LPO con una interrupción de membranas celulares y mitocondriales, e induce apoptosis y/o necrosis. Por otra parte, los radicales libres inducidos por el Cd producen daño al DNA, mientras que la metalotioneína (MT) se activa principalmente como eliminador de los radicales libres y Cd^{2+} . Tomado y modificado de Méndez-Armenta & Ríos, 2007.

La inhibición neuronal de Jak quinasa activada selectivamente en las neuronas mediante el aumento del estrés oxidativo intracelular, puede ser uno de los mecanismos por los que los metales pesados pueden ejercer sus efectos neurotóxicos (Méndez-Armenta & Ríos, 2007).

Efectos neuroendocrinos del cadmio

Además de bioacumularse en el cerebro y producir neurotoxicidad, el Cd también se acumula y causa diversas alteraciones en todos los niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (**HHG**; Lafuente *et al.*, 2001b).

Los disruptores endocrinos son compuestos naturales o sintéticos que interfieren en la síntesis, metabolismo y/o acción de hormonas endógenas. Dentro de este grupo de moléculas, dentro del cual podemos incluir al Cd o más específicamente dentro del subgrupo de los metaloestrógenos (Byrne *et al.*, 2009) cuando se administra en pequeñas cantidades, existe un grupo de compuestos capaces de disparar respuestas celulares normalmente inducidas por estrógenos, además de afectar su señalización (Ronchetti *et al.*, 2013).

Se sabe que El Cd como disruptor endocrino en dosis muy bajas (ppm o ng), puede interrumpir la funcionalidad del eje **HHG** alterando el equilibrio hormonal en estos tres niveles glandulares(Ver Fig. 1), provocando diferentes efectos adversos sobre la salud de las personas, animales o de sus descendientes, como el cáncer, alteraciones del comportamiento y anomalías reproductivas, dependiendo de dónde ejerzan su efecto sobre el eje **HHG** y del momento de la exposición; es decir durante el desarrollo fetal, la infancia, la pubertad o la etapa adulta (Arteaga-Silva *et al.*, 2015).

Se sabe que el Cd en el hipotálamo altera las concentraciones de aminos biogénicas hipotalámicas como la dopamina, la norepinefrina y la serotonina, además de las concentraciones de aminoácidos como el glutamato, el aspartato, la taurina y el Ácido Gama Aminobutírico (**GABA**; Lafuente & Esquifino, 1999), presentándose diferentes efectos dependiendo de la edad de administración del Cd. A pesar de que los mecanismos involucrados en la alteración de la actividad del eje HHG no se han entendido completamente en la actualidad, si es bien sabido que la administración de Cd afecta los mecanismos de secreción de hormonas adenohipofisarias como la PRL, ACTH, GH, TSH y LH (Lafuente, 1999). El Cd atraviesa la BHE (Murphy, 1997) y se acumula en distintas regiones cerebrales (Lafuente *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 2006)]. También puede depositarse en el plexo coroideo que constituye la BHE y destruye la ultraestructura del mismo (Manton & Kirkpatrick, 1984, Zheng, 2001).

Según diversos autores (Wong & Klaassen, 1982; Choudhuri *et al.*, 1996) algunas patologías neurológicas, podrían ser debidas a un aumento en la

permeabilidad de la BHE al Cd y al estrés oxidativo que produce en el SNC (Gutiérrez-Reyes & Albores A, Ríos C (1998). Los efectos tóxicos del Cd en el SNC incluyen alteraciones en la síntesis y metabolismo de las aminas biogénicas y de los aminoácidos neurotransmisores. Chandra *et al.*, (1985) evidenciaron alteraciones en la concentración cerebral de DA, 5-HT y norepinefrina tras la exposición al cadmio. Nation *et al.*, (1989) mostraron también cambios en el contenido de serotonina, ácido 5- hidroxindolacético (ác. 5-HIA), DA y norepinefrina en corteza prefrontal, estriado y Acc, tras la exposición al Cd solo o en combinación con plomo. En esta misma línea, la administración IP de Cd durante 30 días en rata adulta joven inducía un aumento de la concentración de 5-HT y de su metabolito, el ác. 5-HIA en distintas regiones cerebrales (Gupta *et al.*, 1999).

En cuanto a la hipófisis, estudios clásicos sugieren que los gonadotropos (células hipofisarias) de ratas y de monos son altamente sensibles al Cd (Allanson & Deanesly, 1962; Girod, 1964; La fuente, 2013). Más recientemente, se ha demostrado una posible relación entre la exposición al Cd y la actividad hipofisaria, en donde la exposición al Cd en el aire urbano reduce la secreción de la hormona Folículo estimulante (**FSH**) en los trabajadores varones (Ciarrocca *et al.*, 2013). Por otro lado, también se sabe que el Cd podría interactuar con el Pb en el retraso de la aparición y/o progresión de la pubertad, mediante la reducción de las concentraciones séricas de inhibina B en edades peripuberales (Gollenberg *et al.*, 2010). Más aun, se ha observado que en ratas macho adultas tratadas con Cd, se manifestó una disminución en las concentración de la hormona FSH en plasma, lo cual va acompañado de un decremento en el número de espermatozoides y un aumento significativo en la concentración de T en plasma. Por el contrario, las concentración de la hormona luteinizante (**LH**) permanecen inalteradas, lo cual sugiere que existe un control por retroalimentación entre la **T** y la **LH**, que se ve modificado por la presencia de este metal (Cd) (Hachfi & Sakly, 2010). En otros estudios se ha reportado que el Cd es capaz de alterar la frecuencia del pulso y la vida media de la **LH** en ratas machos púberes y adultas (Lafuente *et al.*, 1999b).

A nivel testicular la administración de Cd vía IP en ratas adultas provoca la disminución de la concentración de T en plasma (Lafuente, 2000a). Además, la administración de Cd en una dosis de 4 mg / kg de peso corporal durante 6 días induce, a nivel testicular, una disminución importante de la actividad de las enzimas esteroidogénicas testiculares: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (**3 β -HSD**) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (**17 β -HSD**), que son las enzimas clave para la biosíntesis de T (Yan, 2010), por lo tanto se observa también, una disminución en el recuento de espermatozoides testiculares así como la pérdida en la movilidad espermática, un aumento de la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno, una mayor lipoperoxidación, fragmentación del ADN y disminución en la concentración de enzimas antioxidantes (Manna *et al.*, 2008).

Efectos del cadmio en la conducta sexual masculina

Aunque muy probablemente los efectos agudos del Cd administrado mediante inyecciones que se han observado en animales no se dan en los humanos, se ha observado que la intoxicación aguda en hombres causa daños histológicos en los órganos reproductores, incluyendo los testículos (Elinder, 1985). Además, se ha demostrado que el total de Cd encontrado en los eyaculados de hombres fumadores, es significativamente mayor que en los no fumadores (Oldereid *et al.*, 1994). Por su parte, Keck *et al.*, (1995) determinaron que las concentraciones medias de Cd en el plasma seminal de hombres normozoospermicos es ligeramente superior en los fumadores (0,55 μ g/L) que en los no fumadores (0,42 μ g/L).

En modelos animales los efectos agudos de la inyección de sales de Cd solubles incluyen disminución del peso de los órganos del aparato reproductor y necrosis testicular (Parizek & Zahor, 1956; Parizelt, 1957). Las dosis utilizadas en estos experimentos son por lo general mayores a 1 mg/Kg por inyección. Los efectos del Cd en estas dosis produce una baja concentración de T y esto a su vez puede estar relacionado con la alteración en los órganos genitales (Nordberg, 1972; 1975).

Sin embargo, son muy pocos los estudios en donde se evalúa el efecto del Cd sobre la conducta sexual. Así, se sabe que la administración de este metal por 19 semanas en ratas sexualmente expertas provoca una disminución en el porcentaje de sujetos que copulan. Efecto que se ve revertido por la administración de T (Madafousek *et al.*, 1970). En otro estudio, en ratas macho Wistar realizado por Saygi *et al.*, (1991), se encontró que al administrar Cd en agua potable (10 mg/L) durante 52 semanas, se observó una pérdida en la capacidad reproductiva del 40% de los animales, es decir que sólo el 60% de ratas presentaron cópula.

Couto-Morales *et al.*, 2010 reportan un retardo en el descenso testicular; así como una disminución en la distancia anogenital, ambos parámetros dependientes de T, cuando se expone a ratas Wistar madres y a las crías en gestación a Cd. Cabe señalar que en estos experimentos la administración exógena de T no fue capaz de revertirlos los efectos del Cd.

Un año después Kamel *et al.*, (2011) reportaron en ratas macho Wistar de 140-160 gramos de peso corporal, tratadas con Cd en una dosis tóxica alta y una baja (5 y 50 mg/L de agua potable) durante 12 semanas, un aumento en la latencia de monta y de eyaculación, así como un aumento en el intervalo posteyaculatorio en los animales tratados con la dosis tóxica alta del metal y la disminución en el número de montas y de eyaculaciones de éste grupo, comparados con el grupo control.

Por lo mencionado con anterioridad, queda claro que es necesario ampliar los estudios que se tienen sobre los mecanismos de acción de este metal en la célula, ampliar los conocimientos que se tienen sobre los efectos tóxicos que ejerce en el organismo, la disrupción que ejerce a lo largo de todo el eje reproductivo, así como los efectos que éste metal ejerce en conductas importantes para el bienestar humano, como es el caso de la conducta sexual.

Justificación

La conducta sexual es de gran importancia para la sobrevivencia y perpetuación de las especies. Se sabe que una buena salud sexual en humanos permite un bienestar personal y este a su vez se traduce en un bienestar social. La expresión de la CSM depende de la interacción de factores neurales, endocrinos y sensoriales, que pueden ser modificados por una exposición continua a químicos que se encuentran en el ambiente como los metales pesados, tal es el caso del Cd, el cual se ha demostrado que produce daño testicular y una disminución en la concentración sérica de T , la cual, para ejercer su regulación sobre la conducta sexual, lo hace a través de sus metabolitos y su unión con los RA y RE α y β en estructuras neurales que regulan el inicio y mantenimiento de la CSM, como son el área preóptica medial, la amígdala y el bulbo olfatorio.

En la actualidad se sabe que el Cd reduce el peso corporal de los animales administrados con este metal, así como también el peso de los testículos, vesículas seminales y próstata. También se conocen datos que indican que la administración de Cd reduce la calidad del semen, afectando la fertilidad de los sujetos expuestos a este metal. El Cd altera también algunos parámetros de la CSM que han sido evaluados, como son: las latencias de monta y de eyaculación, el número de montas y de eyaculaciones, y el intervalo posteyaculatorio.

Sin embargo, a la fecha no existe un estudio en donde se analice de manera conjunta y detallada los efectos que éste metal ejerce sobre las fases motivacional y ejecutoria de la CSM así como en la expresión de RA y RE α y β en sustratos neurales que regulan esta conducta.

Hipótesis

La administración de dos diferentes dosis de Cd (0.5 y 1 mg de CdCl₂/Kg de peso corporal) podría inducir una disminución de las concentraciones séricas de T y por lo tanto, alterar la expresión de RA y RE en el cerebro, provocando un deterioro de la conducta sexual en sus fases motivacional y ejecutoria.

Objetivo general

Determinar el efecto de la exposición postnatal al Cd sobre la CSM y su relación con la expresión de RA y RE α y β en el área preóptica medial del hipotálamo, amígdala medial y bulbo olfatorio en ratas macho adultas.

Objetivos específicos

Evaluar en ratas macho adultas con interacción sexual previa, los efectos de la exposición a 0.5 y 1 mg de CdCl₂/Kg de peso corporal desde el nacimiento hasta el período peripuberal, así como en el grupo control sobre:

1. Las fases motivacional y ejecutoria de la conducta sexual.
2. La concentración de T en suero sanguíneo en ratas.
3. La concentración de Cd en sangre, HYP, BO y aparato reproductor.
4. Determinar la expresión de RA y RE α y β en sustratos neurales.

Diseño experimental

Sujetos experimentales:

Se obtuvieron ratas hembra gestantes del bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa las cuales fueron colocadas en cajas de manera individual y mantenidas en ciclo invertido de luz-oscuridad 12: 12 (encendido de luz a las 8:00 pm y apagado a las 8:00 am) a una temperatura constante (24 °C) y libre acceso a comida y agua. El día del nacimiento (día cero), las crías se sexaron y los machos se separaron en camadas de 6 animales por hembra. Las crías hembra se reservaron a lo largo de todo el experimento y se utilizaron hasta el día 120 de vida posnatal, cuando iniciaron las pruebas de CSM. Estas fueron tratadas previamente con benzoato de estradiol (Sigma, Chemical Co. St. Loise. MO, EEUU) 10 µg/0.1 ml 48 horas antes de la prueba de CSM y progesterona 1 mg/0.1 ml 4 horas antes de la prueba (Sigma, Chemical Co. St. Loise. MO, EEUU).

Todos los machos junto con sus respectivas nodrizas fueron divididos en tres grupos, a cada uno de los cuales se le administraron los siguientes tratamientos:

- ☛ **Grupo I Control:** 0.1ml de solución salina por vía IP
- ☛ **Grupo Experimental II:** 0.5 mg/Kg de CdCl₂ (Sigma, Chemical Co. St. Louis. MO, EEUU) disuelto en 0.1ml de solución salina (IP)
- ☛ **Grupo Experimental III:** 1mg/kg CdCl₂ (Sigma, Chemical Co.) disuelto en 0.1ml de solución salina (IP)

Todos los grupos fueron administrados diariamente a partir del día de nacimiento hasta el día 56 de vida postnatal como se muestra en el esquema de administración (Fig. 4). Cuando los sujetos cumplieron 120 días de edad se

sometieron a las correspondientes manipulaciones experimentales para cumplir cada uno de los objetivos.

4

ESQUEMA DE ADMINISTRACIÓN **Registro de peso corporal y administración de tratamientos**



Fig. 4 Esquema de administración de los grupos experimentales. Los animales se administraron diariamente a partir del día del nacimiento hasta el día 56 de vida postnatal. Una vez que cumplieron los 120 días de vida, se iniciaron las pruebas de conducta sexual.

Los sujetos experimentales (**Ss**) se manejaron según los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa, del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Pediatría y del *Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council*.

1. Evaluación de los efectos del cadmio sobre la fase ejecutoria de la conducta sexual

Al día 120 postnatal se realizaron de manera individual tres pruebas de ejecución sexual (iniciando a las 14:00 horas) durante la fase oscura del ciclo y bajo luz roja. El macho se colocó en un redondel de Plexiglas de 50 cm x 42 cm de base y 42 cm de altura con piso de aserrín durante 5 minutos para que se adaptara al mismo. Pasado este tiempo, se introdujo a una hembra receptiva tratada previamente con benzoato

de estradiol (5µg/50µl, 48 horas previas a la prueba) y progesterona (500µg/50µl 4 horas previas a la prueba), con la que se le permitió interactuar libremente.

La sesión tuvo una duración de 30 minutos durante los cuales se registraron los siguientes parámetros:

- **Latencia de monta:** Es el tiempo que transcurre desde que la hembra es introducida a la caja hasta que el macho realiza la primera monta de la serie copulatoria.
- **Latencia de intromisión:** Es el tiempo que transcurre desde el ingreso de la hembra a la caja hasta que se da la primera intromisión de la primera serie copulatoria.
- **Número de Montas:** Es el número total de montas que ocurren antes de la eyaculación.
- **Número de intromisiones:** Es el total de intromisiones que ejecuta la rata macho antes de la eyaculación.
- **Latencia de eyaculación:** Es el tiempo que transcurre desde la primera intromisión hasta la eyaculación de esa serie copulatoria.
- **Intervalo Post-eyaculatorio (o refractario):** Tiempo que transcurre desde la eyaculación hasta la primera intromisión de la segunda serie copulatoria.
- **Hit rate:** Se calcula dividiendo el número total de intromisiones entre la sumatoria del número de montas e intromisiones ($HR = I/M+I$).

2. Evaluación de los efectos del cadmio sobre la fase motivacional de la conducta sexual

Una semana antes de comenzar esta prueba, tanto animales controles como tratados con Cd fueron sometidos a tres pruebas de habituación a la arena de **motivación sexual incentiva (MSI)**. Cada prueba tuvo una duración de 10 minutos con una diferencia de 48 horas entre cada una. Durante estas sesiones, las cajas de incentivos sexual y social se encontraban vacías y entre un animal y otro la caja se limpió cuidadosamente con una solución de etanol al 30%, esperando a que esta se evaporara completamente.

Esta prueba experimental se realizó a las 12:00 horas y consistió de dos sesiones de 10 minutos cada una. Durante la cual se colocaba a un macho del grupo control o tratado con Cd en el centro de la arena. Dicha arena consiste en un campo abierto y dos cajas conectadas a este. En una caja se coloca un macho que funge como incentivo social y la otra caja alberga a una hembra en estro, que desempeña el papel de incentivo sexual (Ver Fig. 8). La conexión entre las cajas pequeñas y la arena principal está dada mediante una malla metálica que permite contacto visual, olfativo y auditivo, pero no físico.

Se calculó la intensidad de la motivación por medio del cociente de preferencia, que se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cociente de preferencia: } \frac{\text{Tiempo con la hembra}}{\text{Tiempo con la hembra} + \text{Tiempo con el macho}}$$

Si el cociente de preferencia es igual a 0.5 significa que el macho pasa igual tiempo con ambos incentivos; si el cociente de preferencia es mayor que 0.5 pero menor o igual a 1, significa que el macho pasa todo el tiempo con el incentivo sexual; y finalmente, si el cociente de preferencia es menor a 0.5 significa que el macho pasa más tiempo con el incentivo social.

Caja de Motivación sexual incentiva (MSI; Ågmo, 2002)

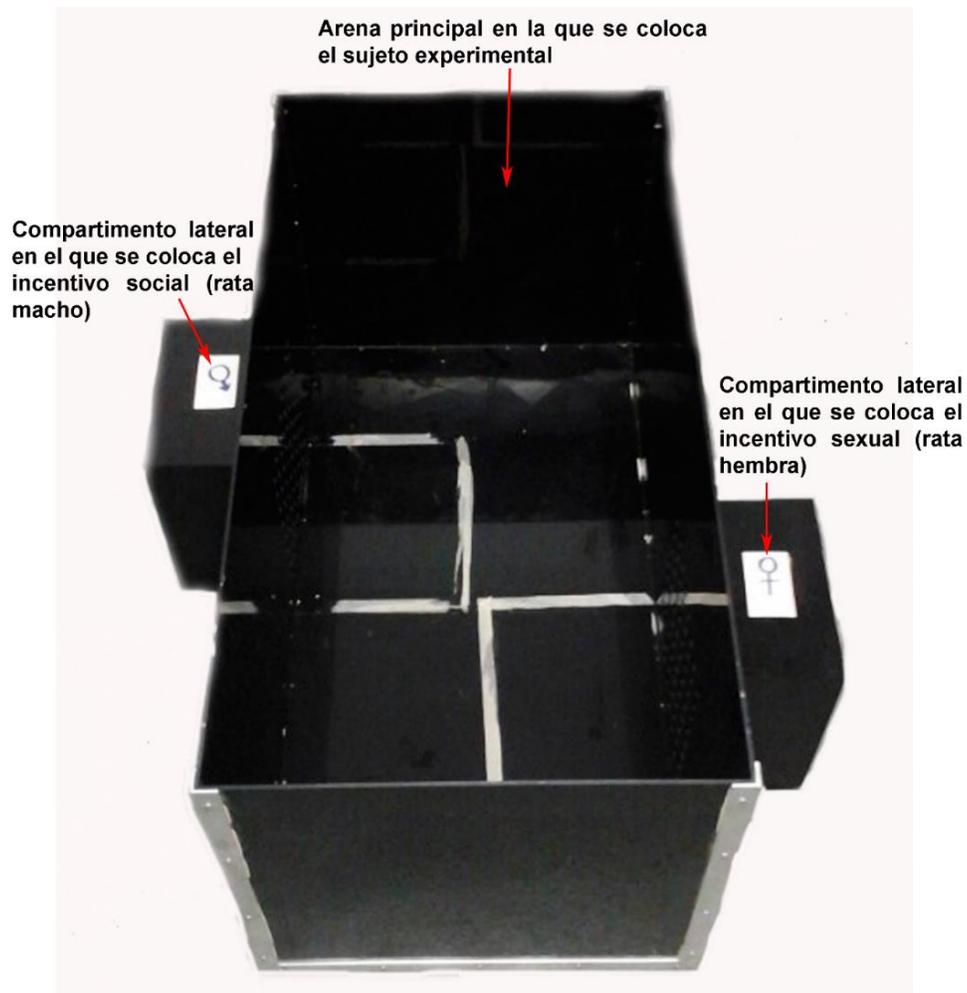


Fig. 6. Fotografía en la que se muestra la caja de motivación sexual utilizada en el laboratorio para realizar las pruebas de motivación sexual incentiva (MSI; Ågmo, 2002).

Al finalizar la segunda prueba de motivación sexual incentiva, se practicó la eutanasia de los animales por decapitación (sin previa insensibilización) empleando una guillotina. Se obtuvieron muestras de sangre y suero sanguíneo y se disecaron los órganos reproductivos, así como bulbos olfatorios y el hipotálamo.

3. Cuantificación de la concentración de testosterona en suero sanguíneo en ratas con interacción sexual previa

La cuantificación de T en suero sanguíneo en los grupos control (n=10), así como los tratados con 0.5 mg/kg (n=10) y 1mg (n=10) de CdCl₂ se realizó mediante la técnica de radioinmunoanálisis (**RIA**). A los animales de los tres grupos experimentales se les realizó eutanasia por decapitación inmediatamente después de la última prueba conductual, esto con la finalidad de obtener las muestras sanguíneas colectando éstas últimas en tubos con anticoagulantes y tapón separador de suero (BD Vacutainer SST, México, D.F). El suero se obtuvo por centrifugación 15 minutos a 1500 rpm.

La T en suero se midió utilizando un kit comercial (TKTT-1, Diagnostic Product Corporation, CA, Estados Unidos). El método consiste en un RIA con ¹²⁵I marcado, diseñado para la determinación cuantitativa de esta hormona. Para ello se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpos anti-T, en donde la hormona marcada con ¹²⁵I compite por los sitios de unión al anticuerpo con la hormona presente en la muestra. Luego de la incubación, los tubos fueron introducidos en el contador gamma (Cobra, Packard, Estados Unidos) donde la cantidad de cuentas leídas están inversamente relacionadas con la cantidad de hormona presente en la muestra, que se determinó comparando las cuentas con una curva de calibración (Martínez-Mota et al. 2008).

4. Cuantificación de la concentración de cadmio en sangre, hipotálamo, bulbo olfatorio y aparato reproductor en ratas con interacción sexual previa

A los 120 días de edad y después de los registros de conducta sexual y MSI, los sujetos de cada uno de los grupos fueron decapitados para la obtención de 1 ml de sangre y la posterior determinación de Cd. Estas muestras fueron colectadas en tubos con EDTA. Los cerebros fueron rápidamente disecados y colocados sobre hielo para la obtención rápida de los BO's y el HYP.

Posteriormente, a cada una de las muestras de sangre como a los tejidos se les agregaron 800 μ l de ácido nítrico al 30% y fueron centrifugados por 15 minutos. Se colectó una alícuota de 100 μ l del sobrenadante y se diluyó 1:5 v/v con agua desionizada.

Para cada análisis, se utilizaron estándares y curvas de calibración. El contenido de Cd se expresó como μ g de Cd/dL de sangre y el contenido de Cd en tejidos cerebrales se expresó como μ g de Cd/g de tejido húmedo. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer, Modelo 3110; Norwalk, CT, USA)

La determinación de Cd en sangre, aparato reproductor y en las regiones cerebrales se realizó por espectrofotometría de absorción atómica con un horno de grafito (HGA-600) y un auto-muestreador (AJS-60, Perkin Elmer). Toda la cristalería, tubos de polipropileno y puntas de micropipeta fueron inmersos por 24 horas en una solución de ácido nítrico concentrado/agua desionizada y finalmente lavados con agua desionizada antes de ser utilizados.

5. Determinación de la expresión de RA y RE α y β en sustratos neurales de ratas con interacción sexual previa

Preparación de los tejidos para inmunohistoquímica por flotación

De cada uno de los grupos experimentales se obtuvieron seis individuos al azar al término de los registros de conducta sexual, los cuales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg; Sedalphorte, México, D.F.) y fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución amortiguadora de lavado vascular (pH 7.4; Ver anexo). Seguida de paraformaldehído (4%) en solución amortiguadora de fosfatos salino (phosphate-buffered saline; PBS) 0.1 M a un pH de 7.4 con una bomba peristáltica (Masterflex, Vernon Hills, IL, Estados Unidos). Al finalizar la perfusión, se disecó el cerebro de cada uno de los individuos, mismos que fueron post-fijados en paraformaldehído por 12 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 30

minutos cada uno en solución PBS 0.1 M para retirar el exceso de paraformaldehído. Una vez libres de fijador, los cerebros se sumergieron en soluciones crecientes de sacarosa al 10, 20 y 30% en PBS 0.1 M, permaneciendo en cada una, al menos 12 horas o bien, hasta que los cerebros descendieran al fondo del contenedor. Inmediatamente los cerebros se colocaron en contenedores circulares de pvc, en donde se orientaron para luego embeberlos en medio de inclusión para cortar tejido en congelación (Tissue Tek CRUO-OCT Compuond, Sakura, Estados Unidos). Una vez terminado este proceso, los contenedores con las muestras de cerebro se almacenaron a -70°C, hasta que se realizó la inmunohistoquímica por flotación.

Tanto para el proceso de inmunohistoquímica, como para la tinción de NISSL con violeta de cresilo, se realizaron cortes coronales seriados de 40µm de grosor en un criostato (CM 1850 UV, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania), los cuales se lavaron en PBS 0.1M para su procesamiento posterior. Se realizaron 8 cortes seriados de cada área, divididos de la siguiente manera (2 cortes para la tinción con violeta de cresilo, 2 cortes para inmunohistoquímica de RE α , 2 cortes para inmunohistoquímica para de RE β y 2 cortes para RA).

Técnica de NISSL

Con la finalidad de analizar si el tratamiento con Cd disminuye la población de neuronas en las regiones cerebrales de interés para este estudio, se montaron cortes seriados en portaobjetos cargados (King-on HIER super charged Slides; Biocare Medical, CA, USA) en medio de montaje con gelatina para cortes en congelación para evitar que se desprendan los tejidos del portaobjetos. Posteriormente se tiñeron con violeta de cresilo (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) durante 20 minutos. Finalmente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Una vez secas las laminillas se aclararon con xilol y se montaron con medio permanente (Entellan OB467707, MERCK, Alemania) colocando un cubreobjetos.

Las áreas para cada región cerebral evaluada se definieron de acuerdo con el Atlas estereotaxico de Paxinos y Watson (2005). Cada área se delimitó de la siguiente forma:

Hipotálamo

Área preóptica medial (APOm)

En la figura 7 se muestra el área definida para la medición del APOm. Esta área se muestra delimitada por color rojo en el diagrama con un área de 850 000 μm^2 . Las estructuras que se incluyeron en la medición de ésta sección fueron: Área preóptica medial (APOm), núcleo preóptico ventrolateral (VLPO), núcleo preóptico ventromedial (VMPO), núcleo periventricular anteroventral (AVPe), núcleo alar (Al), órgano vascular de la lámina terminalis (VOLT) y el núcleo preóptico medial (MnPO). Este corte corresponde a las coordenadas interaural 9.0 y bregma 0.00.

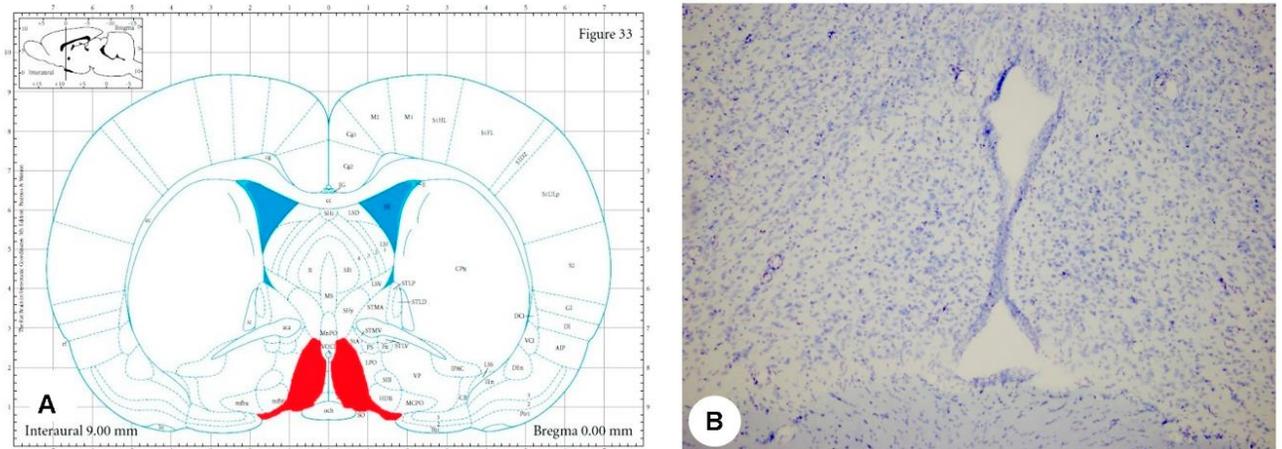


Fig. 7. Límite del área seleccionada para realizar las mediciones del área preóptica media (APOm). Diagrama del Atlas estereotaxico de Paxinos y Watson (2005) donde se muestra definida en color rojo el área que compone el APOm. A) Figura 33, coordenadas bBregma-0.00 y B) Sección del APOm teñida con violeta de cresilo (tinción de NISSL) de sujetos control amplificado a 10x.

Amígdala

Amígdala medial (meA)

En la figura 8 se muestra el área definida para la medición de los diferentes parámetros de la meA. Esta área se muestra delimitada por color rojo en el diagrama con un área de $800\,000\ \mu\text{m}^2$. Coordenadas interaural 5.88 y Bregma -3.12.

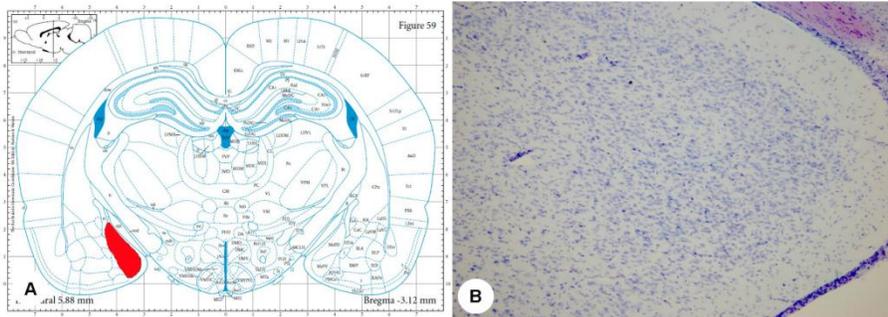


Fig. 8. Límites del área seleccionada para realizar las mediciones del núcleo amigdaloides medial. Diagrama del Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2005) en donde se muestra definida en color rojo el área que comprende éste núcleo. A) Figura 59, Bregma 5.88 y B) Sección del núcleo amigdaloides medial teñido con violeta de cresilo (tinción NISSL) de un sujeto control ampliada a 10x.

Bulbo olfatorio

Capa celular granular del bulbo olfatorio accesorio

En la figura 9 se muestra el área definida para la medición de los diferentes parámetros del bulbo olfatorio. Esta área se muestra delimitada por color rojo en el diagrama con un área de $500\,000\ \mu\text{m}^2$. Coordenadas interaural 16.08 y Bregma -7.08.

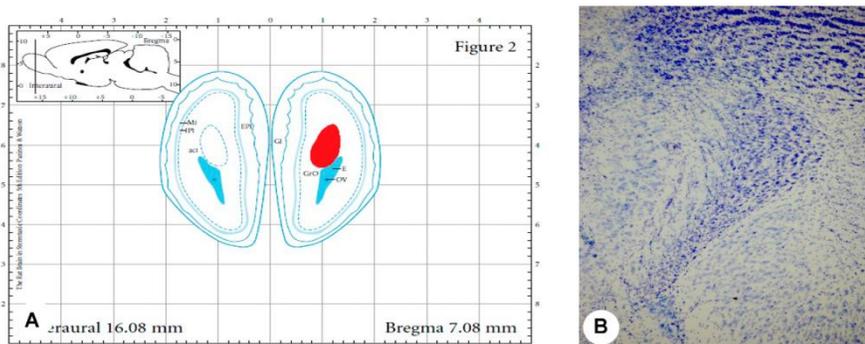


Fig. 9. Límite del área seleccionada para realizar las mediciones del bulbo olfatorio accesorio. Diagrama del Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2005) en donde se muestra definida en color rojo el área que comprende esta estructura. A) Figura 2, coordenadas Bregma 7.08 y B) Sección del bulbo olfatorio teñida con violeta de cresilo (tinción NISSL) de un sujeto control ampliada a 10x.

Inmunohistoquímica por flotación

Una vez lavados los tejidos con PBS 0.1M, se procedió a bloquear la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS 0.1M, posteriormente se realizó un lavado con PBS 0.1M + Twin 20 al 0.1%. Inmediatamente después, los cortes se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, USA) al 5% en PBS 0.1M + Twin 20 al 0.1 %. Posteriormente los cortes fueron incubados a 4°C en BSA+PBS+Twin 20 + el anticuerpo primario (RE α , RE β o RA según sea el caso):

- RE α (anticuerpo policlonal en conejo para RE α ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos). Dilución 1:200
- RE β (anticuerpo policlonal en conejo para RE β ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos): Dilución 1:200
- RA (anticuerpo policlonal en conejo para RA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos): Dilución 1:50

Después de 72 horas se realizaron cinco lavados de PBS 0.1M+Twin 20 al 0.1%, cada uno de 5 minutos. Posteriormente los cortes fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con inmunoglobulinas anti-conejo biotiniladas (Biotinilate linked universal, Dako, CA, Estados Unidos). Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS 0.1M y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el complejo Estreptavidina- peroxidasa del rábano (HRP) biotinilada (Streptavidin-HRP; Dako) después de lo cual se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS 0.1M.

El revelado del marcaje inmunohistoquímico se realizó con diaminobenzidina (DAB, Dako) durante 2 minutos aproximadamente, se detuvo la reacción con agua

destilada y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada para eliminar los restos de DAB. Finalmente los cortes fueron montados en portaobjetos cargados y con medio de montaje de gelatina, y posteriormente con medio permanente (Entellan OB467707, MERCK). Los cortes fueron observados por microscopía de luz en un microscopio (DMLS, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) a un aumento de 10X y se determinó el número de neuronas reactivas.

Determinación morfométrica

Las laminillas fueron observadas con un microscopio de luz acoplado a una cámara digital (DFC 300FX Leica Microsystems, Nussloch, Alemania). El tamaño del área y la densidad óptica (D.O) se evaluaron a través de un programa de análisis de imágenes (Metamorph, versión 4.5; Molecular Devices, Downington, PA, Estados Unidos). El conteo de células totales teñidas con violeta de cresilo (tinción de NISSL) y de las células inmunorreactivas a RE α , RE β y RA fueron expresadas en 100 000 μ^2 (calculado del número de células contadas en relación al área de la cual estas fueron contadas).

Estudios previos han demostrado que las mediciones de D.O reflejan cambios en la expresión de proteínas, paralelos a aquellos utilizando un ensayo bioquímico de medición de proteínas como el Western blot (Mufson *et al.*, 1997). Por lo tanto, en estas mismas células, la D.O fue expresada como unidades arbitrarias de D.O.

Análisis estadístico

Todos los parámetros fueron expresados como la media \pm E.S. Los datos de motivación sexual y cópula, las concentraciones séricas de T y la cuantificación de Cd en sangre y tejido, así como la determinación de la expresión de los RA y RE (α y β) en los cerebros, se analizaron por una ANOVA paramétrica de dos vías, para cada

parámetro, seguida por la prueba *post hoc* de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Cuantificación de cadmio en sangre, hipófisis, algunos sustratos neurales que regulan la conducta sexual y aparato reproductor masculino

Al cuantificar la concentración de Cd sangre, hipófisis, estructuras del SNC y del aparato reproductor, se observó que los sujetos tratados con éste metal presentan concentraciones significativamente mayores ($p < 0.05$) de manera dosis dependiente, excepto en la vesícula seminal y la próstata, donde la mayor concentración de Cd se observó en los animales tratados con la dosis de 0.5 mg/kg de CdCl₂ por Kg de peso corporal.

En estructuras del SNC la mayor bioacumulación de Cd se dio en el BO seguido del HYP (Ver tabla 1). En la hipófisis la media de la acumulación del metal se presentó de la siguiente manera: 0.006 ± 0.006 µg/g para el grupo control, 1.956 ± 0.322 para el grupo experimental tratado con la dosis de 0.5 mg/kg y 2.414 ± 0.544 para el grupo tratado con la dosis tóxica más alta del metal.

En el aparato reproductor encontramos que la mayor cantidad de Cd acumulado se encuentra en la vesícula seminal, seguida del testículo, el epidídimo y la próstata (Ver tabla 1). La mayor bioacumulación de Cd se observó en la sangre, y ésta fue de manera dosis dependiente (Ver tabla 1).

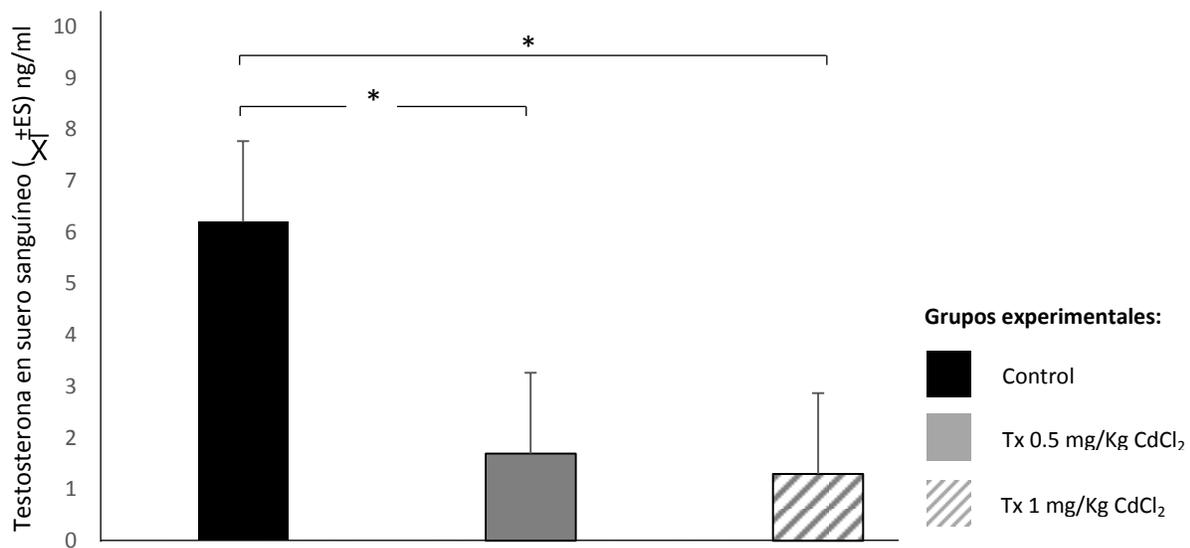
	CTRL	0.5 mg/kg	1 mg/kg
TEJIDO	(X±DS) µg Cd/g de tejido	(X±DS) µg Cd/g de tejido	(X±DS) µg Cd/g de tejido
Bulbo olfatorio	0.010±0.002	0.543±0.059*	1.363±0.983*
Hipófisis	0.006±0.006	1.956±0.322*	2.414±0.544*
Hipotálamo	0.007±0.001	0.247±0.091*	0.712±0.334*
Testículo	0.114±0.130	1.455±0.781*	2.100±1.231*
Epidídimo	0.006±0.0017	1.716±0.974*	2.071±0.840*
Próstata	0.006 ± 0.003	1.253 ± 0.489*	0.702±0.221*
Vesícula seminal	0.008 ± 0.004	2.843±0.384*	2.490±0.849*
Sangre	0.875 ± 0.496	367.75 ± 29.329*	451.5 ± 33.673*

Tabla 1. Resultados de la cuantificación de Cd en sangre, estructuras del sistema nervioso central y órganos reproductores masculinos (n=18 animales por cada grupo). *diferencias significativas comparado con el grupo control.

Testosterona en suero sanguíneo

Respecto a los resultados correspondientes a la cuantificación de T en el grupo de los animales control, así como en los animales tratados con Cd, encontramos que la T disminuye de manera significativa en los animales tratados con Cd comparado con el grupo control. Los promedios de la cuantificación de ésta hormona fueron 6.22 ng/ml para el grupo control, y 1.69 ng/ml y 1.28 ng/ml para los animales tratados con las dosis tóxicas baja y alta de Cd, respectivamente.

No encontramos diferencias significativas en la cuantificación de T en suero sanguíneo entre los animales tratados con las diferentes dosis de Cd (0.5 y 1 mg/kg de CdCl₂) (Ver gráfica 1).



Gráfica 1. Se muestran los resultados de la cuantificación de testosterona (T) en suero sanguíneo (n=18 animales por cada grupo). *diferencias significativas comparado con el grupo control.

Motivación sexual incentiva (MSI)

Respecto a los resultados correspondientes a las pruebas de MSI observamos que el número de visitas que realizaron los sujetos experimentales a la hembra receptiva, que fungía como incentivo sexual, fue significativamente menor en los animales tratados con la dosis baja del metal (0.5 mg/kg CdCl₂) comparado con el grupo de los animales controles, pero no así en el grupo experimental que fue administrado con 1mg/kg de CdCl₂, donde no encontramos diferencias significativas (Ver tabla 2).

El número de visitas al macho (incentivo social) que realizaron los sujetos experimentales fue significativamente menor en los animales tratados con las dos dosis tóxicas (0.5 y 1 mg/kg de CdCl₂) comparado con el grupo control. El grupo que realizó el menor número de visitas al incentivo social fue el tratado con la dosis tóxica baja del metal (0.5mg/kg de CdCl₂).

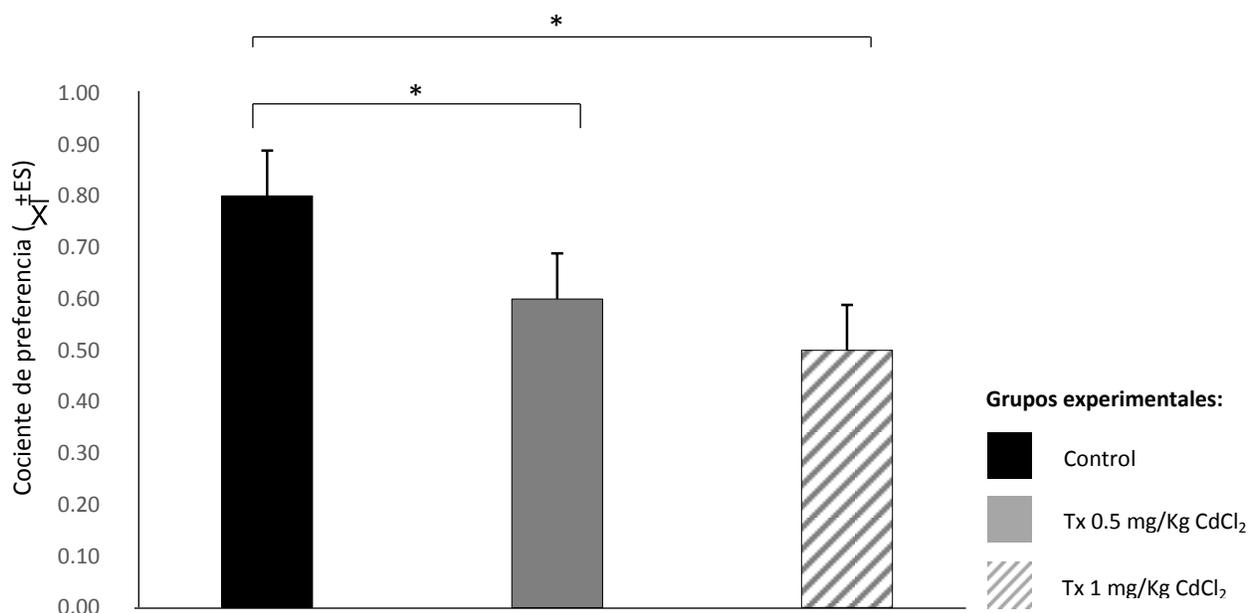
Respecto al tiempo que permanecieron los sujetos experimentales dentro de la zona donde se encontraba el incentivo sexual (una hembra en estro), éste valor resultó significativamente menor en los animales tratados con la dosis tóxica de 1 mg/kg de CdCl₂). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con 0.5mg/kg de CdCl₂ y el grupo control.

Parámetro de la MSI	Control ($\bar{X}\pm ES$)	0,5 mg/kg CdCl ₂ ($\bar{X}\pm ES$)	1 mg/kg CdCl ₂ ($\bar{X}\pm ES$)
Número de visitas a la hembra	15±0,36	12±0,36*	16±0,36
Número de visitas al macho	13±0,29	10±0,29*	11±0,29*
Tiempo total con la hembra	236±7,52	223±7,52	172±7,52*
Tiempo total con el macho	81±4,30	115±4,30*	116±4,30*

Tabla 2. Se muestran los resultados obtenidos durante la prueba de Motivación sexual incentiva (MSI, n=18 animales por cada grupo). *diferencias significativas comparado con el grupo control.

Los sujetos experimentales tratados con Cd (0.5 y 1 mg/kg de CdCl₂) permanecieron mayor tiempo en la zona del incentivo social comparado con el grupo control, pero no se presentaron diferencias significativas entre los animales tratados con Cd (Ver tabla 2). Todos los sujetos experimentales pasaron mayor cantidad de tiempo con el incentivo sexual comparado con el incentivo social).

Respecto al cociente de preferencia de lugar, que como ya mencionamos con anterioridad, es un índice que estima la intensidad de la motivación sexual en los individuos, éste valor resultó menor en los animales tratados con Cd de manera dosis dependiente (Ver gráfica 2). El promedio del cociente de preferencia de lugar del grupo control fue de 0.77 comparado con 0.63 y 0.57 que fueron los promedio de los grupos tratados con 0.5 y 1 mg/kg de CdCl₂ respectivamente. Sin embargo, todos los animales presentaron motivación sexual.



Gráfica 2. Se muestran los resultados correspondientes al cociente de preferencia de lugar de la MSI (n=18 animales por cada grupo). *diferencias significativas comparado con el grupo control.

Ejecución sexual

Respecto a los resultados correspondientes a la fase ejecutoria de la conducta sexual, encontramos que el número de montas que realizaron los sujetos experimentales resultó significativamente mayor en los animales tratados con Cd comparado con el grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos tratados con dosis tóxicas de Cd (0.5 y 1 mg/kg de CdCl₂).

El número de intromisiones resultó mayor en los grupos experimentales tratados con ambas dosis del Cd (0.5 y 1 mg/kg de CdCl₂) comparado con el grupo control (Ver tabla 3). No encontramos diferencias significativas entre los grupos tratados con Cd.

Las latencias de monta y de intromisión, que como se explicó con anterioridad, son parámetros de la cópula que han sido utilizado como índices de motivación sexual, resultaron significativamente mayores en los sujetos experimentales tratados con Cd, esto de manera dosis dependiente, comparado con los sujetos del grupo control (Ver tabla 3).

Parámetros de la cópula	CTRL	0.5 mg/kg	1 mg/kg
	(X±ES)	(X±ES)	(X±ES)
Número de montas	(6.9±0.36)	(11.8 ± 0.36)*	(11.8±0.36)*
Número de intromisiones	(12.3±0.28)	(15.5 ± 0.28)*	(16.3±0.28)*
Latencia de monta (seg)	(51±6.57)	(88.7± 6.57)*	(131±6.57)**
Latencia de intromisión (seg)	(70.11±13.7)	(155.05±13.7)*	(281.83±13.7)**
Latencia de eyaculación (seg)	(549.2± 36.16)	(872.8±36.16)*	(824±36.16)*

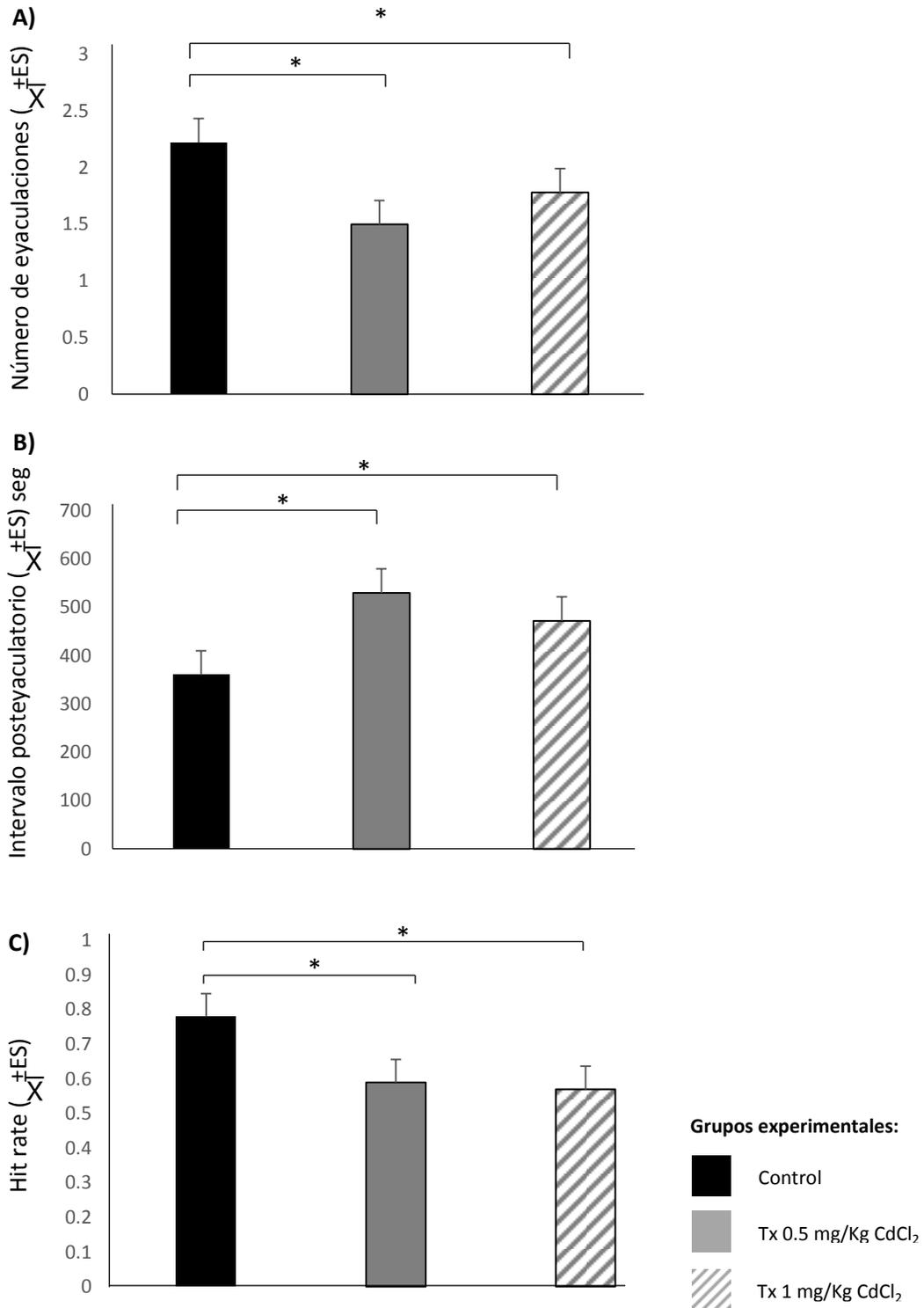
Tabla 3. Se muestran los resultados correspondientes a los parámetros de la cópula: Número de montas y de intromisiones, y las latencias de monta, intromisión y de eyaculación (n=18 animales por cada grupo). *diferencias significativas comparado con el grupo control.

La latencia de eyaculación resultó significativamente mayor en los animales tratados con las dos dosis de Cd empleadas en éste experimento. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales tratados con las dosis tóxicas baja y alta del metal (0.5 y 1 mg/kg de CdCl₂).

Así mismo se encontraron diferencias significativas en el número de eyaculaciones entre los sujetos del grupo control y los tratados con las dosis tóxicas baja y alta de Cd, pero no hubo diferencias significativas entre estos dos últimos grupo. El promedio del número de eyaculaciones del grupo control fue 2.22 (\pm 0.09) y 1.37 (\pm 0.09) y 1.7 (\pm 0.09) de los animales tratados con 0.5 y 1 mg/kg CdCl₂ respectivamente (Ver panel 1A). Sin embargo, es importante mencionar que en el grupo experimental tratado con 1 mg/kg de CdCl₂ únicamente 4 de los 18 animales utilizados en el experimento, tuvieron una eyaculación; es decir, sólo el 22% de los animales tratados con la dosis tóxica alta del metal presentaron eyaculaciones.

Respecto al intervalo posteyaculatorio, encontramos diferencias significativas entre el grupo control y los animales tratados con Cd, resultando mayor en los animales tratados con las dos dosis tóxicas del metal. Los promedios de este parámetro de la cópula fueron los siguientes en los tres grupos experimentales: Animales controles (360.22 \pm 18.87), grupo experimental tratado con 0.5 mg/kg CdCl₂ (529.61 \pm 18.87) y grupo experimental tratado con 1 mg/kg CdCl₂ (471.89 \pm 18.87) (Ver panel 1B).

Al comparar los resultados del Hit rate o tasa de aciertos en este experimento, se observan diferencias significativas entre los animales del grupo control y los tratados con Cd, resultando significativamente menor en los animales tratados el metal. Por lo tanto, la eficiencia copulatoria resultó menor en los animales tratados con Cd comparado con los animales del grupo control. No encontramos diferencias significativas entre las dos dosis de Cd (Panel 1 C).



Panel 1. Se muestran los resultados de la cópula correspondientes al número de eyaculaciones (A), intervalo posteyaculatorio (B) y Hit rate o tasa de aciertos (C). Grupos Ctrl y Tx 0.5 mg/kg de CdCl₂, n=18 animales por cada grupo, Tx 1 mg/kg CdCl₂, n=4). *diferencias significativas comparado con el grupo control.

Inmunohistoquímica por flotación

Para la medición del número de células inmunorreactivas (IR) y la intensidad de la expresión de la proteína, densidad óptica (DO) para RE α y β , así como para el RA en HYP, AMY y BO, se tomó en cuenta un área de 100, 000 μ^2 . A continuación se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación.

En el número de células IR en el HYP para RE α no encontramos diferencias significativas entre el grupo control y los sujetos tratados con Cd ($p=0.37$), ni entre los animales tratados con las dosis tóxicas baja y alta del metal; y respecto a la DO en la misma área y para el mismo receptor, tampoco encontramos diferencias significativas entre el grupo control y los animales tratados con Cd ($p= 0,45$; ver tabla 3).

No encontramos diferencias significativas en el número de células IR en el HYP para el RE β entre el grupo control y los sujetos tratados con Cd ($p=0.98$). No hubo diferencias significativas en la DO del HYP para el RE β entre el grupo control y los sujetos tratados con Cd ($p= 0.17$).

Respecto a los resultados del número de células IR ($p=0.27$) y DO (0.33) en el HYP para el RA, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los animales tratados con Cd.

En la AMY, no encontramos diferencias en la DO ($p=0.88$) y el número de células IR ($p=0.64$) para el RE α , ni en la DO para el RE β ($p=0.44$). Para el expresión del RA, no encontramos diferencias en la DO ($p=0.74$) y el número de células IR ($p= 0.33$) entre los animales tratados con Cd comparado con el grupo control (Ver tabla 3).

Encontramos diferencias significativas ($p= 0.006$) en el número de células IR en la AMY para el RE β entre el grupo experimental tratado con la dosis de 1 mg/kg de CdCl₂ comparado con el grupo control, resultando mayor en los animales tratados con Cd (ver tabla 3).

Respecto a los resultados correspondientes a la DO ($p= 0.61$) y número de células IR ($p= 0.14$) en el BO para RE α , no encontramos diferencias significativas entre los sujetos tratados con Cd y el grupo control. Tampoco se presentaron diferencias entre los sujetos tratados con Cd y los del grupo control en la DO para los RE β . Sin embargo, encontramos diferencias significativas en el número de células IR ($p= 0.04$) entre los animales tratados con 0.5 mg/kg de Cd y el grupo control, resultando menor en los animales expuesto al metal. También se encontraron diferencias en el número de células IR en el BO en la expresión del RA ($p=0.01$) entre los animales tratados con Cd, comparado con el grupo control (Ver tabla 3).

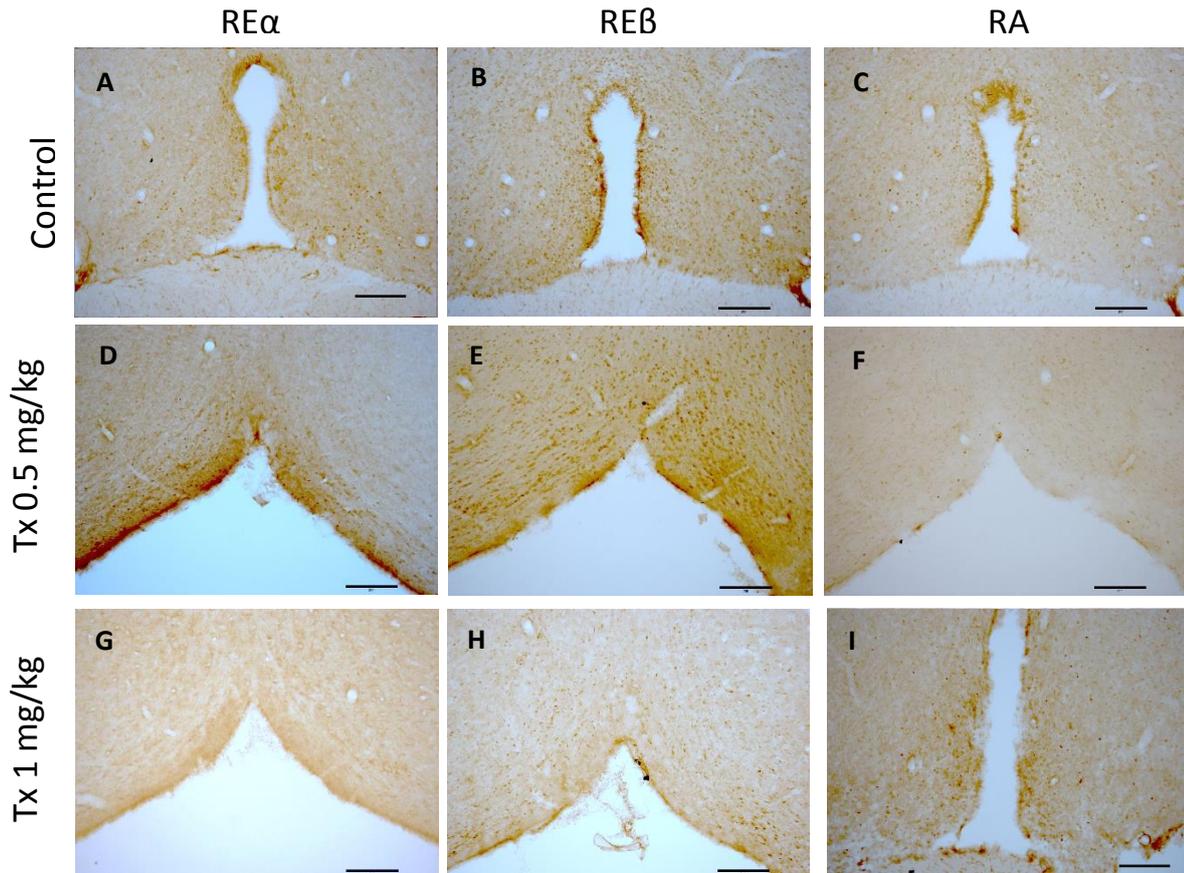
Finalmente, no encontramos diferencias significativas entre los animales tratados con Cd y los animales del grupo control, respecto a la DO para RA en el BO ($p= 0.20$; ver tabla 3)

Estructura del SNC	Receptor	Células de células IR (100,000 μ^2 ; $\bar{X} \pm ES$)			DO de la inmunorreacción (100,000 μ^2 ; $\bar{X} \pm ES$)		
		Control	Tx 0.5 mg/Kg	Tx 1 mg/Kg	Control	Tx 0.5 mg/Kg	Tx 1 mg/Kg
APOm	RE α	182 \pm 19.97	141 \pm 23.63	148 \pm 23.63	0.099 \pm 0.038	0.087 \pm 0.046	0.164 \pm 0.042
	RE β	236 \pm 33.24	236 \pm 42.04	227 \pm 42.04	0.087 \pm 0.039	0.129 \pm 0.055	0.251 \pm 0.055
	RA	179 \pm 24.86	128 \pm 29.45	97 \pm 26.88	0.051 \pm 0.032	0.066 \pm 0.038	0.126 \pm 0.034
meA	RE α	148 \pm 16.12	130 \pm 17.41	128 \pm 19.07	0.086 \pm 0.039	0.108 \pm 0.038	0.062 \pm 0.042
	RE β	166 \pm 7.62	138 \pm 9.02	125 \pm8.23*	0.083 \pm 0.019	0.045 \pm 0.023	0.064 \pm 0.020
	RA	132 \pm 10.59	98 \pm 11.43	103 \pm 11.43	0.120 \pm 0.033	0.088 \pm 0.035	0.060 \pm 0.035
BO	RE α	205 \pm 15.75	161 \pm 17.01	163 \pm 20.84	0.112 \pm 0.035	0.129 \pm 0.038	0.098 \pm 0.047
	RE β	190 \pm 19.19	113 \pm22.71*	186 \pm 22.70	0.124 \pm 0.041	0.091 \pm 0.049	0.181 \pm 0.050
	RA	189 \pm 17.82	151 \pm17.82*	104 \pm16.27*	0.072 \pm 0.031	0.128 \pm 0.031	0.150 \pm 0.029

Tabla 3. Se muestran los resultados del número de células inmunorreactivas (IR) así como la densidad óptica (DO) de la inmunorreacción de los animales tratados con Cd, así como de los animales controles, para la expresión de los RE α y β y RA. APOm (Área preóptica medial del hipotálamo), meA (Amígdala medial) y BO (Bulbo olfatorio). N=6 animales por cada grupo experimental. (* $p<0.05$, diferencias significativas comparado con el grupo control).

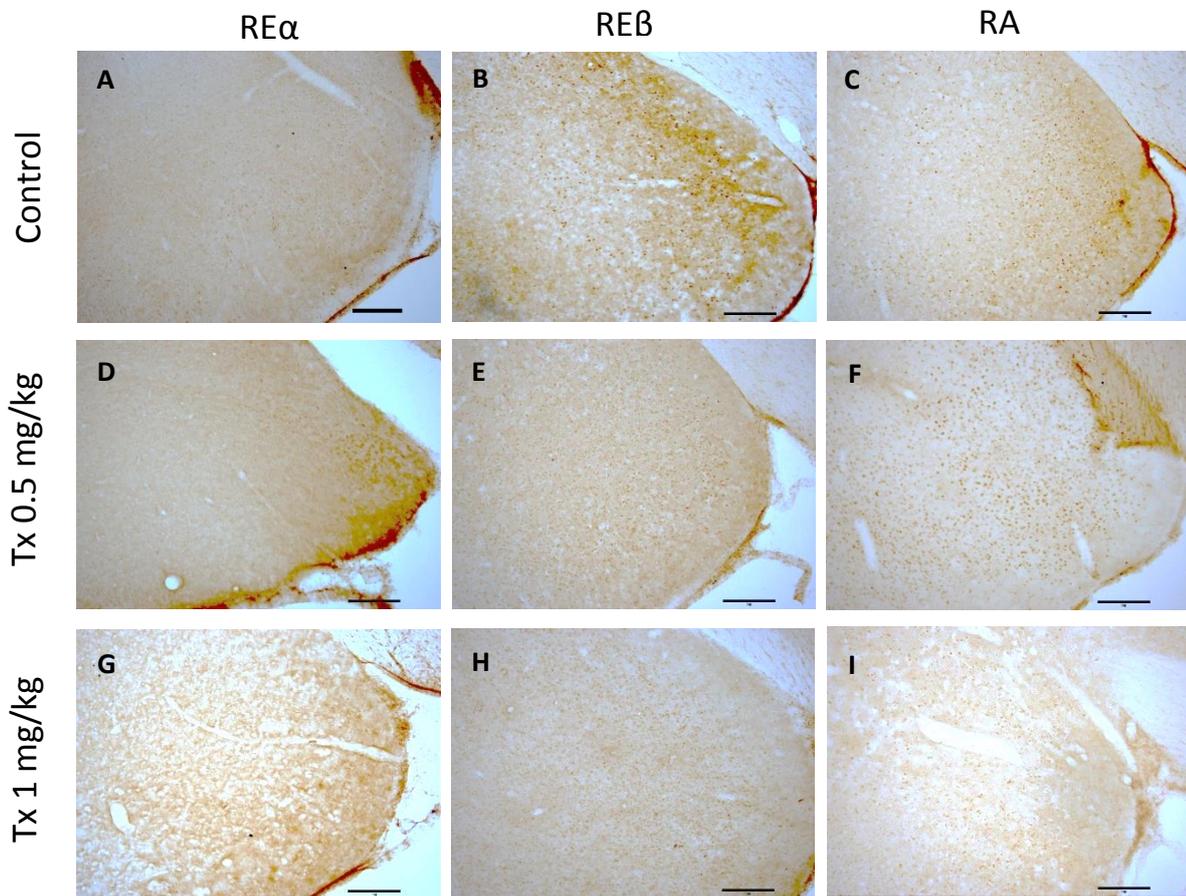
A continuación, se muestran fotomicrográficas representativas de los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación:

Hipotálamo



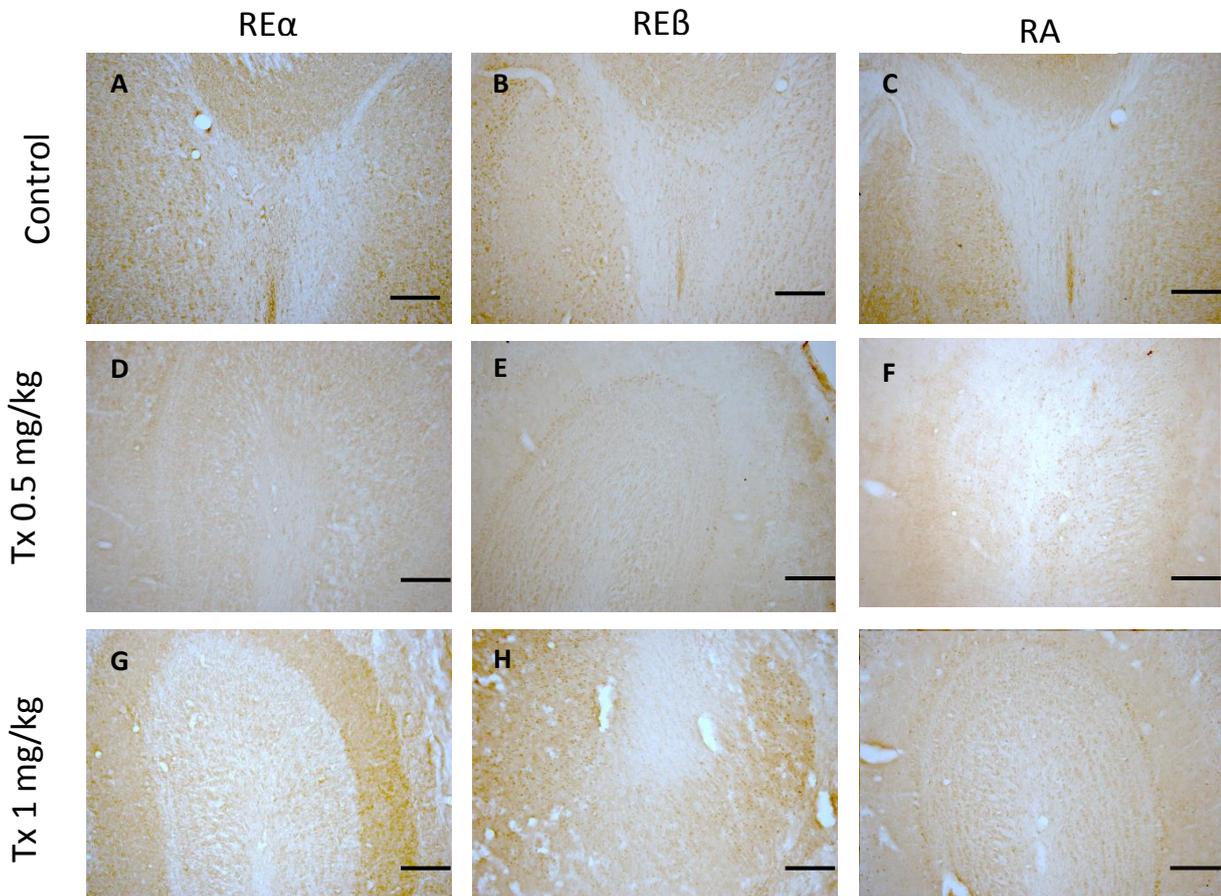
Panel 3. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región del hipotálamo. Inmunorreacción a RE α (receptores de estrógenos alfa), RE β (receptores de estrógenos beta) y RA (receptores de andrógenos en un sujetos controles (A, B y C respectivamente). Inmunorreacción a RE α , RE β y RA en animales tratados con 0.5 mg/kg de CdCl₂ (D, E y F respectivamente) y finalmente, inmunorreacción a RE α , RE β y RA en animales tratados con 1mg/kg de CdCl₂ (G, H, I respectivamente) n=6 animales por cada grupo. Fotografías tomadas en 10X. Escala de barra= 200 μ m.

Amígdala



Panel 4. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región de la amígdala. Inmunorreacción a RE α (receptores de estrógenos alfa), RE β (receptores de estrógenos beta) y RA (receptores de andrógenos en un sujetos controles (A, B y C respectivamente). Inmunorreacción a RE α , RE β y RA en animales tratados con 0.5 mg/kg de CdCl₂ (D, E y F respectivamente) y finalmente, inmunorreacción a RE α , RE β y RA en animales tratados con 1mg/kg de CdCl₂ (G, H, I respectivamente). n=6 animales por cada grupo. Escala de barra= 200 μ m.

Bulbo olfatorio



Panel 5. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región del bulbo olfatorio. Inmunorreacción a RE α (receptores de estrógenos alfa), RE β (receptores de estrógenos beta) y RA (receptores de andrógenos en un sujetos controles (A, B y C respectivamente). Inmunorreacción a RE α , RE β y RA en animales tratados con 0.5 mg/kg de CdCl₂ (D, E y F respectivamente) y finalmente, inmunorreacción a RE α , RE β y RA en animales tratados con 1mg/kg de CdCl₂ (G, H, I respectivamente). n=6 animales por cada grupo. Escala de barra= 200 μ m.

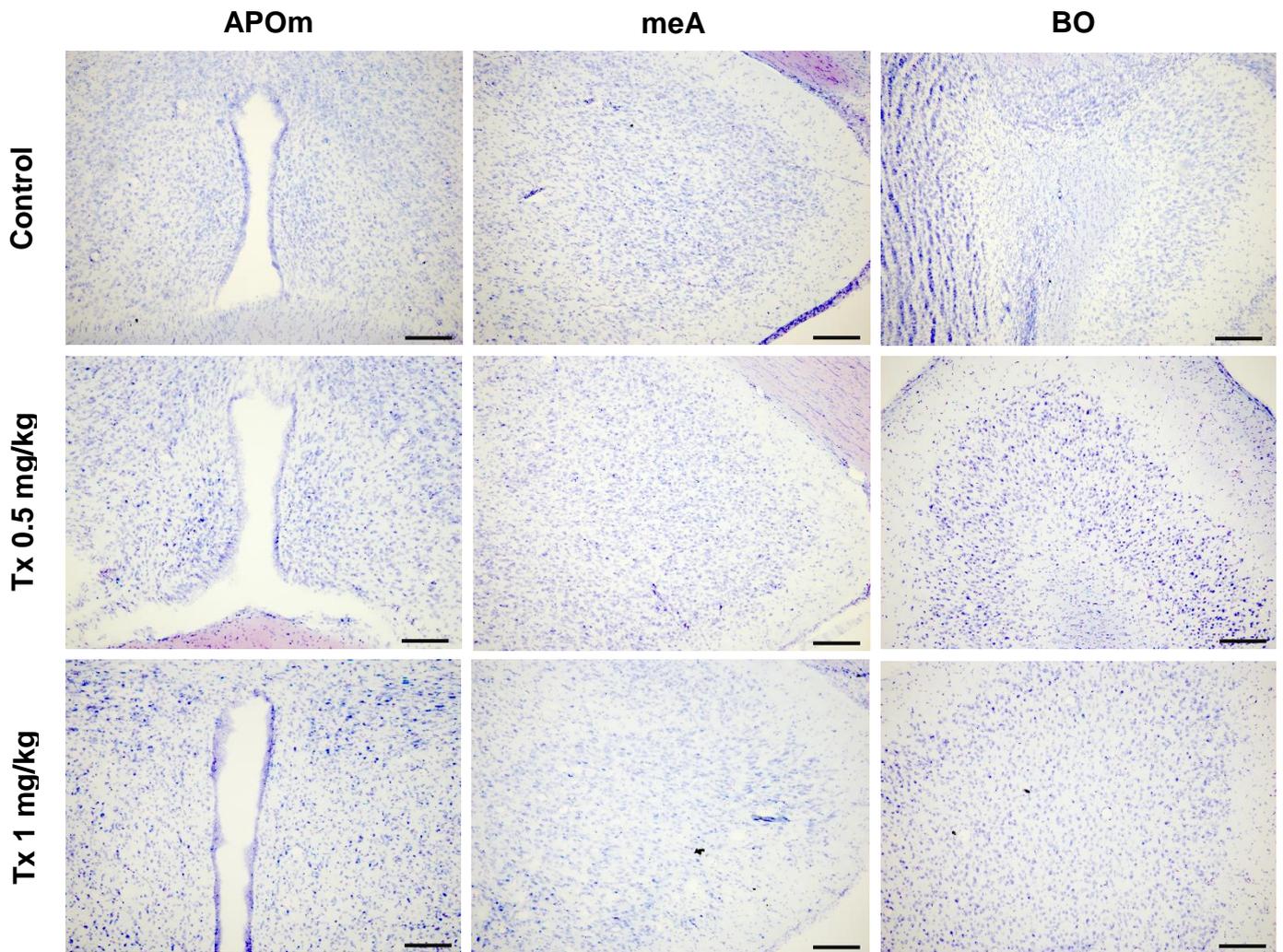
Evaluación de la población neuronal

Los resultados correspondientes a la población neuronal evaluada mediante la tinción de NISSL se muestran en la tabla 4 y en el panel 6. No encontramos diferencias significativas en el número de neuronas en el APOm entre los animales tratados con Cd y el grupo control ($p=0.21$).

En el meA y BO, encontramos diferencias significativas entre los animales tratados con Cd y el grupo control ($p=0.0003$ y $p=0.016$ para meA y BO respectivamente), pero no hubo diferencias entre los animales tratados con 0.5 y 1 mg de CdCl_2/Kg .

Región	Población neuronal (100,000 μ^2)		
	Control	Tx 0.5 mg CdCl_2/Kg	Tx 1 mg CdCl_2/Kg
APOm	380 \pm 39.49	289 \pm 43.26	289 \pm 39.49
meA	392 \pm 26.4	252 \pm 31.3*	189 \pm 28.5*
BO	657 \pm 76.11	368 \pm 76.11*	319 \pm 69.47*

Tabla 4. Se muestran los resultados de la población neuronal del APOm (Área preóptica medial), AMY (Amígdala) y BO (Bulbo olfatorio) de los animales tratados con Cd, así como de los animales controles. N=6 animales por cada grupo experimental. (* $p<0.05$, diferencias significativas comparado con el grupo control).



Panel 6. Se muestran los resultados correspondientes a la población neuronal en el APOm (Área preóptica medial), meA (Amígdala medial) y BO (Bulbo olfatorio) en los animales tratados con Cd, así como en el grupo control. n=6 animales por cada grupo. Escala de barra= 200µm. (*p<0.05, diferencias significativas comparado con el grupo control)

Discusión

El Cd es un metal tóxico presente en la corteza terrestre en una cantidad promedio de 0.5mg/g (Lafuente, 2013). Los desechos industriales de este metal contaminan las aguas y los suelos, y como consecuencia, los vegetales, las carnes, los granos y los alimentos marinos (Copes *et al.*, 2008; Perilli *et al.*, 2010), por lo que en mayor o menor grado, el Cd está presente en todos los alimentos. La dosis tolerable de Cd propuesta por la OMS es de 400 a 500 µg de Cd por semana para un adulto (Delfino *et al.*, 2003).

Una vez que el Cd penetra en el organismo, se fija en todos los tejidos, pero se almacena principalmente en el hígado y los riñones, combinándose de forma selectiva con las MTs, que son pequeñas proteínas compuestas por un alto número de residuos de cisteína. Cuando la capacidad de estos órganos para sintetizar MTs es sobrepasada, el Cd puede ejercer su efecto tóxico (Delfino *et al.*, 2003).

A pesar de que la principal fuente de exposición al Cd en la población en general está constituida por la ingesta de agua y alimentos contaminados, el hábito de fumar ejerce un gran efecto sobre las concentraciones de Cd en sangre. Stoeppler & Brant (1980) encontraron una media de 1.83 µg/L de Cd en sangre en fumadores (n=353) contra 1.02 µg/L en no fumadores (n=602). Las concentraciones de referencia para el Cd en sangre aún no están bien definidas debido a que la demanda de análisis de Cd en los laboratorios ha sido muy baja. Sin embargo, el análisis por activación neutrónica, la absorción atómica electrotérmica y la voltimetría de disolución anódica con pulso diferencial son considerados un método de referencia para evaluar las concentraciones de Cd de referencia en muestras biológicas, cuyo promedio está por debajo de los 10 µg/L (Delfino *et al.*, 2003). Sin embargo, desde la década de los 90's, la espectrofotometría de absorción atómica ha resultado un método muy fiable para cuantificar las muestras de Cd en exposiciones tanto crónicas como agudas (Saygi *et al.* 1991).

Los efectos tóxicos de este metal dependen de la vía de acceso, la cantidad y el tiempo de exposición (agudo o crónico). Una vez dentro del organismo, el Cd se elimina lentamente, alcanzando una vida media de 20 años dentro del organismo (Duvilanski, 2014).

En el presente estudio se cuantificó la concentración de Cd en sangre, hipófisis, órganos del aparato reproductor y algunas estructuras del SNC importantes para la activación y mantenimiento de la conducta sexual, por espectrofotometría de absorción atómica. Normalmente, para acceder al encéfalo, las sustancias deben cruzar la BHE, pero el plexo coroideo es capaz de secuestrar los metales pesados tales como Cd, Pb y Hg para actuar como un sumidero tóxico y proteger el cerebro de la acumulación de metales (Zheng *et al.*, 1991). Debido a que las especies metálicas (el metal libre o un complejo metálico como la transferrina) son muy hidrofílicas, es muy difícil que sean capaces de distribuirse a través de la BHE a una velocidad suficiente para cubrir las necesidades del cerebro. Las propiedades de la BHE limitan en gran medida la difusión de moléculas no lipofílicas dentro y fuera del cerebro (Pardridge, 2003). La entrada de especies metálicas en el cerebro a través de las membranas de las células endoteliales de la BHE intacta podría estar mediada por un proceso de difusión limitada a través de la vía paracelular (Yokel, 2006).

Respecto a los efectos del Cd a nivel neuroendocrino, y en especial sobre la glándula adenohipófisis, las evidencias iniciales indican que este metal modifica la liberación de neurotransmisores hipotalámicos y la secreción hormonal adenohipofisaria (Lafuente, 2013). En este trabajo, y de acuerdo con estudios realizados por Poliandri *et al.* 2003 y Lafuente, 2013, el Cd se acumula tanto en el hipotálamo como en la glándula hipofisaria, así como también en el hígado y las gónadas, ocurriendo la mayor acumulación de este metal en la adenohipófisis que en el hipotálamo.

En el presente trabajo encontramos que el Cd es un metal capaz de almacenarse también en el BO de manera dosis dependiente. Hasta el momento no se había registrado la cuantificación de Cd en el BO de ratas tratadas con Cd por vía IP, esto quizá se deba a que las principales vías de exposición al Cd en

los humanos son la ingesta de agua y alimentos contaminados con una dosis promedio de 20-50µg por día (Dawar-Husain, 2013; Duvilanski & Cabilla, 2014) en los sujetos expuestos al metal dentro del rubro no ocupacional, y la inhalación de partículas de Cd, en fumadores en los que se ha detectado hasta 5 veces más Cd, comparado con no fumadores (Benedetti *et al.*, 1999, Satarug *et al.*, 2003) y sujetos expuestos ocupacionalmente al Cd, principalmente en la fabricación de baterías, en el sector minero y en soldadores (Bernhoft, 2013; Duvilanski & Cabilla, 2014), siendo los órganos con mayor toxicidad reportada el hígado y el riñón (Dawar-Husain, 2013).

En el presente estudio, tomando en cuenta nuestros resultados que demuestran que el Cd se almacena en el BO, apoya los datos obtenidos por Dawar-Huisain (2013) quien demostró los efectos tóxicos de este metal en el BO, sin realizar cuantificaciones del metal, en una dosis superior a la más tóxica utilizada en el presente trabajo (2mg/kg de peso corporal), pero en un tiempo más breve (30 días). El encontró en secciones histológicas de animales tratados con este metal, que se presentaban cambios histopatológicos, principalmente edema y necrosis, en las capas mitral, fibrosa y glomerular del BO. También se sabe que los daños ocasionados por la exposición crónica a este metal en trabajadores de fábricas en baterías de Ni-Cd pueden incluir pérdida completa o parcial de la olfacción (anosmia e hiposmia), falso sentido de la olfacción (disosmia) y fanstosmia (olfacción alucinada) (Sunderman, 2001). Sin embargo, los efectos tóxicos del Cd no quedan restringidos a la capacidad de almacenarse en el cerebro, y particularmente en estructuras muy importantes para la activación y regulación de la conducta sexual como son el HYP, la hipófisis, y en el caso de la rata, el BO. Diversos estudios han reportado los efectos dañinos de este metal en el aparato reproductor masculino y la disminución en la secreción del principal andrógeno producido en el testículo, la T, el cual fue uno de los objetivos del presente trabajo (Kamel *et al.*, 2011; Lafuente, 2013).

La T juega un papel crucial en la cópula. Es bien sabido que la remoción quirúrgica de los testículos en la rata macho produce la interrupción total del comportamiento copulatorio. A pesar de que este efecto es permanente, la

administración de T exógena restaura la actividad sexual (Parkes, 1966; Beach, 1970).

Contrario a los resultados que obtuvimos respecto a la cuantificación de Cd en testículos de ratas expuestas a Cd, Saygi *et al.*, (1991) no encontraron cantidades apreciables de este metal en el testículo. Esto puede deberse a las diferencias que existen entre el presente trabajo y el realizado por este grupo de investigadores. Ellos administraron una dosis diferente de Cd (10 mg/L de agua), el tiempo de exposición al metal (52 semanas), la vía de administración (oral) o el esquema de administración (ratas de 5 semanas de edad). Además, el límite de detección de Cd utilizado en su procedimiento fue de 0.1 µg/ml.

Nuestros resultados correspondientes a la cuantificación de T en suero sanguíneo, apoyan los resultados obtenidos en estudios anteriores que demuestran la disminución de este andrógeno por la administración del metal *in vivo* en ratas Wistar (Amara *et al.*, 2008; Kamel *et al.*, 2011; Jahan *et al.*, 2014).

Respecto a los efectos del Cd sobre la cópula, cabe mencionar que a la fecha son muy pocos los trabajos que se han realizado al respecto. El estudio más antiguo data del año 1971 y fue realizado por Madlafousek *et al.* Este grupo de investigadores realizó dos experimentos. El primero de estos consistió en evaluar los efectos de éste metal sobre algunos parámetros de la cópula y el segundo consistió en comprobar si la administración de propionato de T era capaz de revertir los efectos sobre la cópula producidos por la administración del metal. Reportando que a partir del noveno día de la administración del metal, el porcentaje de animales que copulaban se reducía a solo 30%, efecto que se revertía si administraban el andrógeno; este hecho lo correlacionaban también a un aumento en el peso de las vesículas seminales y próstata después de la administración de la hormona, restituyendo la función endocrina en el testículo. Estos autores encontraron diferencias en el intervalo posteyaculatorio de las ratas antes y después de la inyección del metal, siendo mayor este parámetro después de la administración del metal, pero no en las latencias de intromisión y eyaculación ni en las frecuencias de monta e intromisión.

Los estudios de motivación sexual son de suma importancia para determinar los efectos que tienen sobre la conducta sexual ciertas hormonas, medicamentos y/o lesiones en diferentes partes de la corteza cerebral (Agmo, 1997). A la fecha el método más utilizado para medir la motivación sexual en la rata macho, es la caja de MSI creada por Agmo en el 2010, sin embargo también existen otras formas de medir la MSI como es la caja de Preferencia de lugar (Meyerson *et al.*, 1973). El uso de este tipo de metodología en conjunto con los parámetros para medir la conducta sexual han permitido obtener datos fiables como lo demuestran los estudios de Matuszczyk & Larsson, 1993; Agmo, 1997. Adicionalmente, se han utilizado algunas conductas precopulatorias y postcopulatorias para observar la importancia de algunas estructuras cerebrales como el APOm en la ejecución de estas conductas (Paredes *et al.*, 1993).

Los estudios de los efectos del Cd se han centrado principalmente en los efectos que este ion causa a nivel testicular. Así pues existen reportes de necrosis e incluso esterilización de ratas macho de diversas cepas por la administración de Cd vía IP (Parisek, 1957; 1960). Contrario a lo que se ha reportado en la literatura previamente, en el presente estudio se encontró que todas las ratas; tanto las tratadas con dosis tóxicas bajas como las tratadas con dosis tóxicas altas fueron capaces de copular, aunque en la dosis de 1mg/kg solo 4 de 18 sujetos tuvieron la capacidad de copular, observándose, sin embargo, una disminución en la capacidad de copular de las ratas de manera dosis dependiente. Las diferencias entre los resultados obtenidos y los reportados previamente en la literatura (Parisek, 1957; 1960) podrían deberse a diferencias en el esquema de administración, adicionalmente otros factores que pudieron haber influido en los resultados reportados en el presente trabajo fueron la forma de administración, así como las concentraciones de Cd que se administraron.

Nuestros estudios corroboran que el Cd afecta la conducta sexual de las ratas macho como se ha reportado en trabajos previos (Parisek, 1957; 1960) para el caso de las ratas macho Wistar. Se aporta nueva información en lo que se refiera a los efectos del Cd sobre la motivación sexualincentiva; así como la ejecución sexual ya que en ningún otro trabajo se toman en cuenta todos los parámetros copulatorios (número de montas, números de eyaculaciones, latencia

de monta, latencia de intromisión y latencia de eyaculación). Consideramos que nuestras aportaciones son de utilidad y pueden contribuir con la información de los estudios reportados para seres humanos, en cuyo caso se podría decir que el Cd puede ser una causa de disminución de la fertilidad como se ha reportado previamente (Akinloye *et al.*, 2006).

En relación a los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la relación que existe entre la administración de Cd y el almacenamiento de este metal en el cerebro, así como el efecto que ejerce sobre la concentración de T; uno de los objetivos del presente trabajo fue investigar los efectos que este metal podría ejercer sobre la expresión de los RA y RE α y RE β en el cerebro de ratas expuestas al Cd desde el nacimiento hasta el periodo peripuberal. Como se mencionó con anterioridad en los resultados, en el presente trabajo no encontramos diferencias significativas en la determinación de la expresión de los receptores para estrógenos y andrógenos en las estructuras neurales que regulan la conducta sexual. Sin embargo, cabe aclarar que estos datos se dejan a reserva para estudios posteriores, debido a que se presentaron algunas inconsistencias en las secciones evaluadas, y también se encontraron perforaciones en los tejidos. Cabe mencionar que estos datos son novedosos, pues no existe un estudio donde se evalúe los efectos que el Cd puede ejercer sobre la expresión de los RE y RA. Sin embargo, diversos estudios han demostrado claramente la toxicidad del Cd en el eje HHG. El primer estudio lo realizó Lafuente *et al.*, 2013. Estos autores administraron Cd durante un mes a ratas peripuberales y adultas de la cepa Sprague-Dawley en dosis de 50ng/ml en agua potable (una dosis muy pequeña) y 2mg/kg de peso corporal, ésta última, una dosis muy tóxica, pues es 40 veces más alta que el límite de ingesta de Cd considerado como seguro para humanos en muchos países (Piscator, 1985; López-Artíguez *et al.*, 1993) y encontraron que los efectos tóxicos del Cd, con respecto a la regulación de gonadotropinas, son dependientes de la edad en la que se expone al animal a éste metal. El aumento de FSH en los animales adultos tratados con Cd puede explicarse debido a la acumulación de Cd en el testículo afecta a la actividad de las células de Sertoli, disminuyendo la síntesis de inhibina (señal inhibitoria de la secreción de FSH; Ultee-van Gessel *et al.*, 1985). Sin embargo, los efectos que

produce la administración del Cd pueden variar mucho dependiendo de la dosis en que éste se administre. Muchos estudios han demostrado la capacidad del Cd para mimetizar los efectos biológicos de los estrógenos en cantidades muy pequeñas, actuando como un disruptor endocrino.

El estradiol (E_2) es una hormona clave en diversos procesos celulares que ocurren en la glándula adenohipofisaria, como son la liberación hormonal, la proliferación y muerte celular a través de vías de señalización genómicas y no genómicas mediante la unión específica a dos receptores intracelulares: $RE\alpha$ y $RE\beta$ (Spady *et al.*, 1999; Zárate *et al.*, 2009). Algunos estudios muestran que el Cd posee actividad tipo estrogénica e incluso androgénica, uniéndose directamente a receptores para estrógenos y andrógenos respectivamente (García-Morales *et al.*, 1994; Aquino *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2003; Byrne *et al.*, 2009). Estos efectos del Cd que mimetizan a los estrógenos ha sido relacionada con algunos cánceres hormonodependientes. Existen evidencias de que los efectos de Cd son bloqueados por un antiestrógeno lo que sugiere que los efectos del Cd están mediados por la vía genómica de los $RE\alpha$. Los efectos androgénicos del Cd también han sido estudiados con el cáncer de próstata. El primer estudio que sugiere una relación entre el Cd y este padecimiento mostró que el riesgo de padecer esta enfermedad se incrementaba en trabajadores ocupacionalmente expuestos en fábricas de baterías de Ni-Cd (Potts, 1965). En la actualidad, los mecanismos precisos por los cuales los andrógenos podrían causar carcinogénesis prostática aún son desconocidos. Estos datos sugieren que el Cd es también un metaloandrógeno y podría explicar, en parte, el riesgo a padecer cáncer de próstata asociado con la exposición al metal (Byrne *et al.*, 2009)

Conclusión

Los resultados del presente trabajo muestran que la exposición crónica a Cd en ratas macho, desde el nacimiento hasta la pubertad, produce una reducción en las concentraciones de T en suero sanguíneo. Se encontró Cd en la sangre de los animales tratados este metal, y se observó que se bioacumula en el aparato reproductor, así como en estructuras neurales que regulan la conducta sexual, como son el hipotálamo, la hipófisis y el bulbo olfatorio. Respecto a los efectos que produce la exposición a Cd sobre la motivación sexual, podemos concluir que este metal no suprime la motivación sexual incentiva, pero si disminuye la intensidad de la motivación de manera dosis dependiente. El Cd es un metal que también altera los patrones de la cópula, aumentando el número de montas e intromisiones, las latencias de monta, intromisión y de eyaculación, así como el intervalo posteyaculatorio y disminuyendo el número de eyaculaciones, y disminuyendo la eficiencia reproductiva. De tal forma que nos queda claro que agentes nocivos, como es el caso de Cd, que se encuentran en el ambiente pueden influir en la regulación neuroendocrina, generando un déficit en el desarrollo conductual de la función reproductiva.

Perspectivas

Conocer en los animales con exposición crónica a Cd:

- Los efectos que este metal produce bajo la dosis tolerable recomendada por la OMS (400 a 500 μg por semana) con las principales vías de exposición (respiratorio e ingesta)
- Los efectos que este metal produce en dosis muy pequeñas para evaluar sus efectos como un disruptor endocrino, y correlacionarlo con sus efectos sobre la conducta sexual
- Los efectos que este metal ejerce en diferentes esquemas de administración. Por ejemplo, desde la gestación hasta la etapa infantil, o desde el nacimiento hasta la edad adulta.
- Los efectos que este metal ejerce sobre las concentraciones plasmáticas de estrógenos y $5\alpha\text{-DHT}$
- Los efectos que este metal ejerce sobre otras conductas, como son: el aprendizaje, sueño-vigilia, depresión, ansiedad, agresión, estrés, y conducta maternal
- Los daños histopatológicos que produce este metal en tejidos como el testículo, próstata, pene, vesícula seminal, así como sus principales órganos diana (hígado, riñón, pulmón, hueso)
- Investigar posibles tratamientos como antioxidantes y una dieta alta en Zn

Bibliografía

- Abdelgadir, S.E., Roselli, C.E., Choate, J.V., Resko, J.A. (1999). Androgen receptor messenger ribonucleic acid in brains and pituitaries of male rhesus monkeys: studies on distribution, hormonal control, and relationship to luteinizing hormone secretion. *Biology of Reproduction*. (60): 1251-1256.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1998). U.S. Public Health Service. Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, GA. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp5.pdf>
- Ágmo, A. (2005). La conducta sexual desde un punto de vista epicúreo: Reforzamiento, recompensa e incentivos sexuales. In M.A. Guevara Pérez, L. Chacón, M. Hernández González & J.A. Barradas Bribiesca (Eds.), *Aproximaciones al Estudio de la Motivación y Ejecución Sexual*. (pp. 13 – 51). Guanajuato, Mexico: Universidad de Guanajuato.
- Ágmo, A. (1976). Cholinergic mechanisms and sexual behavior in the male rabbit, *Psychopharmacology* 51: 43- 45
- Ágmo, A. (1999). Sexual motivation. An inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioral Brain Research*, 105. pp. 129-150.
- Ágmo, A. (2002) Copulation-contingent aversive conditioning and sexual incentive motivation in male rats: evidence for a two-stage process of sexual behavior. *Physiology and Behavior*. (77): 425-435.
- Ágmo, A. (2003b). Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*. (117): 3-14.
- Ágmo, A. (2010). La conducta sexual desde el punto de vista epicúreo: Reforzamiento, recompensa e incentivos sexuales. En: *Aproximaciones al estudio de la motivación y la ejecución sexual*. Guevara-Pérez, M. A., Hernández-González, M., Chacón Gutiérrez, L. & Barradas-Bribiesca, J. A. (Eds). Universidad de Guanajuato y Grupo Bioseñales México. pp. 15-61.
- Allanson, M. & Deanesly, R. (1962) Observations on cadmium damage and repair in rat testes and the effects on the pituitary gonadotrophs. *Journal of Endocrinology*. (24), 453

- Amado, J.A. & Flórez, J. (2003). "Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales". En: Flórez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A. *Farmacología humana*, 4ª edición. Editorial Masson, Barcelona. pp. 887-912.
- Arrington, R., Cofrancesco, J. y Wu, A. W. (2004). Questionnaires to measure sexual quality of life. *Quality of Life Research: An International Journal of Quality of Life Aspects of Treatment, Care y Rehabilitation*, 13(10), 1643-1658.
- Arteaga-Silva, M., Marquez-Villanueva, Y., Martinez-Garcia, R., Hernandez-Gonzalez, M., Bonilla-Jaime, H. & Retana-Marquez, S. (2005) Effects of hormonal replacement with androgens and estrogens on male sexual behavior and plasma levels of these steroids in gonadectomized golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) *Physiology & behavior*.(85):571–580.
- Arteaga-Silva, M., Viguera-Villaseñor, R.M., Retana-Márquez, S., Hernández González, M., Bonilla-Jaime, H., Guzmán García, X. & Contreras-Montiel, J. L. (2013). Testosterone Levels and Development of the Penile Spines and Testicular Tissue during the Postnatal Growth in Wistar Rats. *Advances in Sexual Medicine*. (3): 1-9.
- Baggaley, M. (2008). Sexual dysfunction in schizophrenia: focus on recent evidence. *Human Psychopharmacology*. (23):201-9.
- Bancroft, J. (1993). Impact of environment, stress, occupational, and other hazards on sexuality and sexual behavior. *Environment Health Perspective*, (101): 101–197.
- Bantman, B. (1998). Breve historia del sexo. Barcelona: Editorial Paidós Ibérica.p.42-47.
- Baxter, M.G. & Murray E.A. (2002). The amygdala and reward. *Nature Reviews Neuroscience*. (3): 563-573.
- Beach, F. A. & Holz, M. A. (1946). Mating behaviour in male rats castrated at various ages and injected with androgen. *Journal of Experimental Zoology*. 101, 91-142.

- Beauregard, M., Levesque, J. y Bourogouin, P. (2001). Neuronal Correlates of conscious self-regulation of emotion. *Journal of Neuroscience*, (21):1-6.
- Benitez, M. A., Mendez-Armenta, M., Montes, S., Rembao, D., Sanin, L.H. & Rios, C. (2009). Mother-fetus transference of lead and cadmium in rats: involvement of metallothionein. *Histology and Histopathology*. (24): 1523-1530
- Beyer, C., Contreras, G., Morali, G. & Larsson K. (1981). Effects of castration and sex steroid treatment on the motor copulatory pattern in the rat. *Physiology and Behavior*. (27):727-730.
- Bianco, F. (1990): Sexología. Definición y Bases Conceptuales. Propuesta de una Teoría. Editorial CIPV. Caracas.
- Bianco, F. (1993). Manual diagnóstico de las enfermedades en Sexología. Caracas: Ediciones CIPV; 1988
- Camacho, F.J., Portillo, W., Quintero-Enriquez, O. & Paredes, R. G. (2009). Reward value of intromissions and morphine in male rats evaluated by conditioned place preference. *Physiology and Behavior*, (98):602-607.
- Chandra, S.V., Kalia, K. & Hussain, T. (1985) Biogenic amines and some metals in brain of cadmium-exposed diabetic rats. *J Appl Toxicol* 5: 378-381.
- Choudhuri, S., Liu, W.L., Berman, N.E. & Klaassen, C.D. (1996) Cadmium accumulation and metallothionein expression in brain of mice at different stages of development. *Toxicol Lett* 84: 127- 133
- Ciarrocca, M., Capozzella, A., Tomei, F., Tiziana, G., Caciari, T. (2013). Exposure to cadmium in male urban and rural workers and effects on FSH, LH and testosterone. *Chemosphere* (90):2077-2084
- Clark, J. T., Smith, E.R. & Davidson, J.M. (1985). Evidence for the modulation of sexual behavior by adrenoreceptors in male rats. *Neuroendocrinology* 41: 36-43.
- Clegg, E. J. (1960). The age at which male rat become fertile. *Journal of reproduction and fertility*. (1): 119-120.

- Dail, W. G., Hamill, R.W. & Minorski, N. (1986). Further evidence of a cholinergic mechanism in the function of the corpora cavernosa penis. *Soc. Neurosci. Abstr.* 12: 900.
- Davidson, J. M. (1966). Activation of the male rat's sexual behavior by intracerebral implantation of androgen. *Endocrinology* (79): 783–794.
- Davidson, J. M. (1969). Effects of estrogen on the sexual behavior of male rats. *Endocrinology*, (84):1365-1372.
- Davis, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*. (15): 353–375.
- Dehm SM, Tindall DJ: Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 2007, 21:2855-2863.
- Department of Health and Senior Services (Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores). Hoja informativa sobre sustancias peligrosas. Derecho a saber 2007; 0305:2-6.
- Dewsbury, D.A. (1979). Description of sexual behavior in research on hormone behavior interactions. En: *Endocrine control of sexual behavior* (pp 3-32). New York. Raven Press.
- Domínguez-Salazar, E., Bateman, H.L., & Rissman, E.F. (2004). Background matters: the effects of estrogen receptor alpha gene disruption on male sexual behavior are modified by background strain. *Hormones and behavior*. (46): 482-490
- Eliasson, M. & Meyerson, B. (1981). Gregariousness in rats as a function of familiarity of environment. *Journal of Personality and social physiology*. (11): 107-114.
- Elinder, C. G. (1985) Cadmium: Uses, occurrence, and intake. In: Friberg, L, Elinder, C. G., Kjellstrom, T., Nordberg G. F. (eds) *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, vol 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, 23-63
- Ellingsen, E. & Agmo, A. (2004). Sexual incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. (77): 431-445

- Ellis, K. J., Vartsky, D., Zanzi, I., Cohn, S. H., and Yasumura, S. (1979). Cadmium: In vivo measurement in smokers and nonsmokers. *Science*. (205):323–325.
- Enmark, E. & Gustafsson, J. A. (2001). Oestrogen receptors – an overview. *Journal of internal medicine*. (246): 133-138
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240 (4854), 889-95
- Everitt, B.J. & Stacey P. (1987). Studies of instrumental behavior with sexual reinforcement in male rats (*Rattus norvegicus*): II. Effects of preoptic area lesions, castration, and testosterone. *Journal of Comparative Psychology*: (101):407–419
- Feder, I.I. (1971). The comparative actions of testosterone propionate on the reproductive behavior, physiology and morphology of male rats. *Journal of Endocrinology*. (51): 241-252
- Fernández-Guasti, A., Swaab, D & Rodríguez-Manzo G. (2003). Sexual behaviour reduces hypothalamic androgen receptor immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 28:501-512
- Fernández- Guasti A., K. Larsson & C. Beyer, C. (1986). GABAergic control of masculine sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1065- 1070
- Fowler, B.A. (2009). Monitoring human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. (238):294–300
- Frohlich, P. & Meston, C. (2002). Sexual functioning and self-reported depressive symptoms among college women. *Journal of Sex Research*, 39(4), 321- 325.
- Frye, C. A., París, J. J., Walf, A. A., & Rusconi, J. C. (2012). Efectos y mecanismos de 3α , 5α , -THP en funciones emoción, la motivación y la recompensa que involucran receptor xenobióticos pregnane. *Neuroscience* 5: 136.
- Gabbiani, G., Basic, D., Deziel, C. (1967a). Toxicity of cadmium for the central nervous system. *Experimental Neurology*. (18): 154–160.

- Gallagher, M. & Holland PC (1994). The amygdala complex: multiple roles in associative learning and attention. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:11771–11776.
- Gelmann, E.P. (2002): Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol*, 20:3001-3015
- Genazzani, A.R, Petraglia F, Purdy RH, eds. (1996). *The Brain: Source and Target for Sex Steroid Hormones*. London, United Kingdom; The Parthenon Publishing Group. Gill K.D., Pal R., & Sandhir R. 1989b. Effect of chronic cadmium exposure on lipid composition and peroxidation in liver and kidneys in rats. *Med Sci Res* 17:921-924.
- Girod, C. (1964). Apropos of the influence of cadmium chloride on the testicle: research in the monkey (*Macacus irus f. Cuv*). *C R Seances Soc Biol Fil* (9): 158:297. González, M., Banderas, J.A., Raya, C., Báez, A. & Belmont, R. (1997). Cuantificación de plomo, cadmio y cromo mediante sialoquímica. *Salud pública de México* / vol.39, no.3.
- Gollenberg, A. L. Hediger, M. L. & Lee L. A. (2010). Association between lead and cadmium and reproductive hormones in peripubertal U.S. girls. *Environmental Health Perspectives*, 118(12):1782–1787
- Guevara-Pérez, M. A. & Hernández-González, M. (2006) Registro y análisis automatizado de señales bioeléctricas cerebrales durante la ejecución sexual. Universidad de Guadalajara, México. pp 131. Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Thakur SR, Dubey MP, Chandra SV (1990) Comparative neurotoxicity of cadmium in growing and adult rats after repeated administration. *Biochem Int* 21: 97- 105.
- Gutierrez-Reyes, E.Y., Albores, A., Ríos, C., 1998. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology* 131, 145–154.
- Hachfi, L. & Sakly, R. (2010). Effect of Cd transferred via food product on spermatogenesis in the rat. *Andrologia*: (42): 62-64 Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F: The hinge region regulates DNA

- binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res* 2007, 67:4514- 4523
- He, L., Girijashanker, K., Dalton, T.P., Reed, J., Li, H., Soleimani, M. & Nebert, D.W. (2006). ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol. Pharmacol*: 70:171–180.
- Heinlein, C.A. & Chang, C: Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 2002, 23:175- 200.
- Hernández-González, M. & Prieto-Beracochea, C.A. (2002). Un acercamiento a la Motivación. En. Hernández –González ed. Motivación animal y humana. 1a ed. Manual moderno. pp. 3-17.
- Hess, R. A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:52
- Hetta, J. & Meyerson, B. J. (1978). Sexual motivation in the male rat. A methodological study of sex-specific orientation and the effects of gonadal hormones. *Acta Physiologica Scandinavica*, Suppl. (453): 1-67
- Hull, E. M., Meisel R. L. & Sachs B. D. (2002). Male sexual behavior. In: Pfaff D. W., et al., editors. *Hormones, Brain, and Behavior*. Vol. 1. Academic Press; New York. pp. 1–137.
- Hull, E., Wood, R. I. & McKenna, K. E. (2006). Neurobiology of male sexual behavior. In: Neill J. D., et al., editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third edition. New York. pp. 1729–1824.
- Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A. & Korach, K. S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: EGF action involves the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89 (10), 4658-4662
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Metales pesados (2012). Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>

- Jamall, I.S. & Smith, J.C. (1985a). Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: A possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 80:33-42
- Järup, L., Berglund, M., Elinder, C.G., Nordberg, G. & Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure: a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*: (24) suppl 1:1-51
- Kaplan, H. (1979). *Disorders of Sexual Desire*. Brunner/Mazel, New York.
- Keck, C., Bramkamp, G., Behre, H.M. (1995). Lack of correlation between cadmium in seminal plasma and fertility status of nonexposed individuals and two cadmium-exposed patients. *Reprod. Toxicol.* 9: 35-40
- Klint T. & Larsson, K. (1995). Clozapine acts as a 5-HT₂ antagonist by attenuating DOI-induced inhibition of male rat sexual behavior. *Psvchopharmacology* 119: 291 - 294.
- Kollack-Walker S. & Newman S. W. (1995). Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience*: (66):721–736.
- Kondo, Y. & Arai, Y. (1995). Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiol Behav.* (57):69–73
- Kuiper, G.G., Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-A (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript distribution of estrogen receptors a and b. *Endocrinol* 138:863–870.
- Lafuente, A., González-Carracedo A, Romero A, Esquifino AI (2003a). Effect of cadmium on 24-h variations in hypothalamic dopamine and serotonin metabolism in adult male rats. *Exp Brain Res* 149: 200-206.
- Lafuente, A. (2013). The hypothalamic–pituitary–gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology* 59: 395–404

- Lafuente, A., Marquez, N., Perez-Lorenzo, M., Pazo, D. and Esquifino, A. I. (2000). Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic pituitary-testicular axis function in the rat. *Food Chem Toxicol.* 38: 913–923.
- Larsson, K. (1979). Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In C. Beyer (Ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior*, pp. 77–163. Raven Press, New York.
- Larsson, K., Sodersten, P., Beyer, C. (1973). Induction of male sexual behaviour by oestradiol benzoate in combination with dihydrotestosterone. *J. Endocrinol.* 57, 563–564
- LeDoux, J.E., 1995. Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology* 46, 209]235.
- Levy BS, Wegman DH, Eds. *Occupational Health, Recognising and Preventing Work Related Diseases*. 2nd Edition. Boston,USA:Little, Brown and Co. 1998
- Li L, Heindel J. Sertoli cell toxicants. In: Korach K, editor. *Reproductive and Developmental Toxicology*. Marcel Dekker; New York: 1998
- López, E., Arce, C., Oset-Gasque, M.J., Cañadas, S., González, M.P., 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 940–951.
- Lucio, R.A., Tlachi-López, J.L. 2008. Análisis de la cópula y el eyaculado en la rata albina (*Rattus norvegicus*). *Manual de Laboratorio*. Góngora Ediciones. Tlaxcala, México. pp. 1-48.
- Malmnas y Meyerson, 1971. p- Clorphenylalanine and copulatory behavior in the male rat. *Nature* 232: 398- 400
- Manahan S. *Environmental chemistry*. 7^a ed. Boca Raton Florida: Lewis Publishers, 2000.
- Manna P, Sinha M, Sill PC (2008). Arsenic-induced oxidative myocardial injury: protective role of arjunolic acid. *Arch. Toxicol.* 82:137-149

- Maras P. M. & Petrulis A. (2006). Chemosensory and steroid-responsive regions of the medial amygdala regulate distinct aspects of opposite-sex odor preference in male Syrian hamsters. *Eur J Neurosci*; 24:3541–3552.
- Masters, W. H. & Johnson, V. E., (1966). *Human sexual response*. First Edition. Published by Little, Brown and Company Boston.
- Matsumoto T, Takeyama K, Sato, T. & Kato S: Study of androgen receptor functions by genetic models. *J Biochem* 2005, 138:105-110
- McCabe, M. P. y Cummins, R. A. (1998). Sexuality and quality of life among young people. *Adolescence*, 33(132), 761-773.
- Meisel R. L. & Sachs, B. D. (1994). The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Physiology of Reproduction*. Raven Press; New York. pp. 3–106
- Méndez-Armenta M, Ríos C. (2007) Cadmium neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*: (23): 350-358.
- Méndez-Armenta, M., Barroso-Moguel, R., Villeda-Hernández, J., Nava-Ruíz, C., Ríos, C., 2001. Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology* 161, 189–199.
- Meyerson, B.J., Eliasson, M. & Hetta, J. (1979). Sex-specific orientation in female and male rats: development and effects of early endocrine manipulation. *Advances in Biosciences*. (25): 451-460.
- Michaell RP, Rees HD, Bonsall RW. 1989. Sites in the male primate brain at which testosterone acts as an androgen. *Brain Res* 502:11 -20.
- Mitchell J. B. P. A. Gratton. (1994). "Involvement of mesolimbic dopamine neurons in sexual behaviors: Implications for the neurobiology of motivation". *Reviews in the neurosciences* 5(4): 317-330 Published by Freud Publishing House LTD London.

- Monroe, K.R., Halvorsen, W.S., 2006. Cadmium blocks receptor mediated Jak/STAT signaling in neurons by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 493–502.
- Murphy VA (1997) Cadmium: acute and chronic neurological disorders. En: Yasui M, Strong MJ, Ota K (eds) *Mineral and metal: neurotoxicology*. Boca Raton: CRC. 229-240.
- Nation JK, Frye GD, Von Stulz J, Bratton GR (1989) Effects of combined lead and cadmium exposure changes in schedule-controlled responding and in dopamine, serotonin and their metabolites. *Behav Neurosci* 103: 1108-1114.
- Nilsson S. & Gustafsson J. A. Estrogen receptor action. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2002; 12:237–57.
- Nordberg GF, Nishiyama K (1972). Whole-body and hair retention of cadmium in mice including an autoradiographic study on organ distribution. *Arch Environ Health* 24(3):209-14
- Nordberg, G.F., 1975. Effects on long-term cadmium exposure on the seminal vesicles of mice. *J. Reprod. Fertil.* 45, 165–167
- Noriega-Reyes, M. Y. & Elizabeth Langley-McCarron, E. (2004). Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología* 3 (2008): 29-40
- Norma Oficial Mexicana. NOM-010-SSA1-1993. Salud Ambiental. Artículos de cerámica vidriados. Límites de plomo y Cd solubles. Disponible en: www.cofepris.gob.mx/Marco%20Juridico/noms/009ssa1.pdf
- Ojeda, S. R., Andrews, W. W., Advis, J. P. & White, S.S. (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine reviews*, 1 (3): 363-397.
- Oldereid, N. B. Thomassen, Y. & Purvis, K. (1994). Seminal plasma lead, cadmium and zinc in relation to tobacco consumption. *Int. J. Androl.* (17): 24-28.
- OMS (2006). Organización Mundial de la Salud. Evaluation of certain food contaminants. WHO Technical Report. Series 930. World Health Organization, Geneva.

- Ong WY, He X, Chua LH, Ong CN (2006) Increased uptake of divalent metals lead and cadmium into the brain after kainite-induced neuronal injury. *Exp Brain Res* 173: 468-474
- Paglietti, E., B. Pellegrini Quarantotti, G. Mereu, G. L. Gessa. (1978). Apomorfine and L- DOPA lower ejaculation threshold in the male rat. *Physiol. Behav.* 20: 559-562.
- Parizek J. (1965). Vascular changes at sites of oestrogen biosynthesis produced by parenteral injections of cadmium salts. *J. Reprod. Fertil.* 1965; 7:263–265
- Parizek, J. (1957). Kastrace cadmium. (The castrating effect of cadmium). *Statni zdravotnicke nakladatelstvi, Prague.*
- Parizek, J. (1957). The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrin.* 15: 56-66
- Parizek, J., Zahor, Z. (1956). Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 177, 1036
- Paxinos, G. & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. San Diego, C. A. Elsevier.
- Perfiles de salud reproductiva. República Mexicana. Consejo Nacional de Población. 2011. Disponible en: http://www.conapo.gob.mx/en/CONAPO/Republica_Mexicana_Perfiles_de_Salud_Reproductiva#
- Petering HG, Choudhury H, Stemmer KL. 1979. Some effects of oral ingestion of cadmium on zinc, copper and iron metabolism. *Environ Health Perspect* 28:97-106
- Pfaff, D. W. & Ågmo, A. Reproductive motivation. In H. Pashler & R. Gallistel (Eds.), *Steven's Handbook of Experimental Psychology*. Volume 3, Learning, Motivation, and Emotion. (pp. 709-736). New York: Wiley, 2002.
- Pfaus, J. G. A. G. Phillips. 1989. Differential effects of dopamine receptor antagonists on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology*. 98: 363-368.

- Pfaus, J. G., Kippin, T. E., & Coria-Avila, G. (2003). What can animal models tell us about human sexual response? *Annual Review of Sex Research*, 14(1), 1-63.
- Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A., Young, W.C., 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65, 369–382.
- Portillo, W., Diaz, N.F., Cabrera, E.A., Fernandez-Guasti, A., Paredes, R.G., 2006. Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen receptors and oestrogen receptor alpha in copulating and non-copulating male rats. *J. Neuroendocrinol.* 18, 168–176.
- Ramírez, A. Toxicología del Cd conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú; 2002: 63(1).*
- Real R.M (2010). Estudio epidemiológico de la Disfunción Sexual Femenina. Asociación con otras enfermedades y factores de riesgo. Tesis presentada en opción del grado Científico de Doctor en Ciencias Médicas, Universidad de Ciencias Médicas de la Habana, Ciudad de la Habana.
- Rios L. Exposición humana y efectos neurológicos del cadmio. Primer taller nacional sobre la salud del niño y el ambiente. Ciudad de México 21 y 22 de junio del 2001.
- Roselli C. E. (1991). Sex-differences in androgen receptors and aromatase-activity in microdissected regions of the rat-brain. *Endocrinology*; 128:1310–1316.
- Roselli CE, Salisbury RL, Resko JA. (1987). Genetic evidence for androgen-dependent and independent control of aromatase activity in the rat brain. *Endocrinology*; 121:2205–10. [PubMed: 3678147]
- Sachs, B. D., and Meisel, R. L. (1988). The physiology of male sexual behavior. In E. Knobil and J. D. Neill (Eds.) *The Physiology of Reproduction*, Vol. 2, pp. 1393–1482. Raven Press, New York.

- Salud ambiental. Cerámica vidriada. Métodos de prueba para la determinación de plomo y Cd solubles. Norma oficial mexicana NOM-009-SSA1-1993. Diario oficial de la federación. 5 de septiembre de 1994.
- See R. E., Fuchs R. A., Ledford C. C., & Mclaughlin J. (2003). Drug Addiction, Relapse, and the Amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 985, 294–307.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388, 507–525.
- Siu, E.R. Mruk D.D., Porto C.S. & Cheng C.Y. (2009). Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol*: 238(3): 240–24.
- Smith E. R., R. L. Lee, S. L. Schnur, J. M. Davidson. 1987. Alpha- adrenoceptor antagonists and male sexual behavior: I. Mating behavior. *Phvsiol. Behav* 41: 7 -72
- Sodersten, P. 1973. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 4:247–256
- Stoker, T. E., Parks, L. G., Gray, L. E. & Cooper, R. L. (2000). Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical reviews in toxicology.* 30 (2): 197-252.
- Taleporos, G. y McCabe, M. P. (2002). The impact of sexual esteem, body esteem, and sexual satisfaction on psychological well-being in people with physical disability. *Sexuality and Disability*, 20(3), 177-183.
- Temple, J. L., Scordalakes, E. M., Bodo, C., Gustafsson, J. A. & Rissmanb. (2003). Lack of functional estrogen receptor β gene disrupts pubertal male sexual behavior. *Hormones and Behavior* 44 (2003) 427–434.
- Thévenod, F. (2009) Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol Appl Pharm* 238(3):221–239

- Valle, B.L., 1995. The function of metallothionein. *Neurochem. Int.* 27, 23–33
- Ventegodt, S. (1998). Sex and the quality of life in Denmark. *Archives of Sexual Behavior*, 27(3): 295-307.
- Viaene, M.K., Masschelein, R., Leenders, J., Groof, M.De., Swerts, L.J.V.C., Roels, H.A., 2000. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occup. Environ. Med.* 57, 19–27.
- Wersinger, S.R., & Rissman, E.F. (2000). Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 12, 103-110.
- Wong, K.L., Klaassen, D.C., 1982. Neurotoxic effects of cadmium in Young rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 330–337.
- Wood, R. & Newman, S. W. (1995). Integration of Chemosensory and hormonal cues is essential for mating in the male syrian hamster. *The Journal of Neuroscience*. 15 (11): 7261-7269
- Wood, R. (1998). Integration of chemosensory and hormonal input in the male Syrian hamster brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 855, olfaction and taste xii: an international symposium p. 362–372, November 1998
- Wuana, R.A & Okieimen, F.E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*. Vol. 2011, ID: 402647, Pp 20.
- Xing N, Chen Y, Mitchell SH, Young CY: Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2001, 22:409-414
- Xu C, Holscher MA, Jones MM, et al. 1995. Effect of monoisoamyl meso-2,3-dimercaptosuccinate on the pathology of acute cadmium intoxication. *J Toxicol Environ Health* 45:261-277
- Zhu ML, Kyprianou N: Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2008, 15:841- 849.

ANEXO

SOLUCIONES PARA PERFUSIÓN DE TEJIDOS E INMUNOHISTOQUÍMICA

1. Preparación de PBS 0.2M (Solución Buffer Fosfato Salino): 1.1 L para soluciones 2, 3 y 4.

Se disolvieron por separado las siguientes soluciones:

- A) 6.05 gramos de fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4) en 220 ml de agua destilada
- B) 25.4 gramos de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) en 900 ml de agua destilada

Se tomaron 209 ml de la solución A y 891 ml de la solución B.

Se ajustó el pH a 7.4 y se almacenó la solución de PBS en refrigeración a 4°C

2. Solución de lavado vascular para perfusión, 1 L.

Se disolvieron por agitación en 950 ml de agua destilada los siguientes solutos:

- A) 0.5 gramos de carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- B) 0.25 gramos de cloruro de potasio (KCl)
- C) 8.50 gramos de cloruro de sodio (NaCl)

Se adicionaron 50 ml de PBS 0.2 M. Ajustar el pH a 7.4. Se almacenó la solución de lavado vascular en refrigeración a 4°C.

3. Preparación de Paraformaldehído al 4%, 1 L.

Se calentaron 500 ml de agua destilada a 50-60°C y se conservaron a la misma temperatura, se agregaron 40 grs de paraformaldehído más 8 gotas de NaOH con el propósito de facilitar la dosilución. En caso de ser necesario se pueden agregar más gotas de NaOH. Se enfrió la solución hasta los 15°C y se agregaron 500 ml de PBS 0.2 M. Se ajustó la solución a un pH=7.4 y se refrigeró a 4°C.

4. Preparación de PBS 0.1 M, 1L.

Se disolvieron 8.5 grs de cloruro de sodio (NaCl) en 500 ml de agua destilada. Se añadieron 500 ml de PBS 0.2 M. Se ajustó la solución a un pH= 7.4 y se almacenó a 4°C

5. Peróxido de hidrógeno al 3%

Se diluyeron 300µL de peróxido de hidrógeno en 10 ml de agua destilada

6. PBS-Twin 20 al 0.1%

Se diluyeron 100µL de Twin 20 en 100 ml de PBS

7. BSA al 5%

Se diluyeron 0.5 grs de BSA en 10 ml de PBS-Twin 20 al 0.1%

8. Medio de montaje con gelatina para cortes en congelación

Se mezclaron 500 ml de agua destilada y 500 ml de etanol al 80% y se calentaron posteriormente a 55°C. Se añadió 1 gr de gelatina y se mezcló con agitación continua. Se dejó enfriar la solución y se almacenó a 4°C.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00019

Matrícula: 2123801205

EVALUACION DE LA CONDUCTA SEXUAL Y EXPRESION DE RECEPTORES PARA ANDROGENOS Y ESTROGENOS EN CEREBROS DE RATAS MACHO WISTAR TRATADAS CON CADMIO

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 29 del mes de junio del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH ARENAS RIOS
DR. JULIO CESAR ROJAS CASTAÑEDA
DR. FRANCISCO JAVIER JIMENEZ TREJO
DR. SERGIO MONTES LOPEZ




TABATA NELVA MENDOZA MENDOZA
ALUMNA

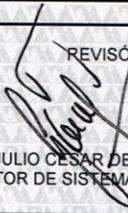
Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: TABATA NELVA MENDOZA MENDOZA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

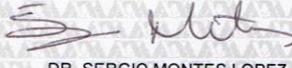
DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DR. JULIO CESAR ROJAS CASTAÑEDA

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER JIMENEZ TREJO

SECRETARIO

DR. SERGIO MONTES LOPEZ