



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS SEXUALES EN PLASMA Y HECES
FECALES: EFECTOS SOBRE LA CONDUCTA REPRODUCTIVA EN EL
HÁMSTER MACHO DORADO
(*Mesocricetus auratus*)**

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Biología

P R E S E N T A

Biól. TANIA ARELLANO LEZAMA

DIRECTORA DE TESIS: Dra. MARCELA ARTEAGA SILVA.

Noviembre 2009

Este trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa en:

- El Laboratorio de Biología Conductual y Reproductiva. Depto. de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
- El Bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
- El Laboratorio de Ecología Animal. Depto. de Biología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
- El Laboratorio de Peces. Depto. de Biología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio P.N.P.C. 0-901-0.

**El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis que presentó**

TANIA ARELLANO LEZAMA

El día 3 de Diciembre del año 2009

Comité Tutorial:

Presidente: Dr. Miguel Ángel Armella Villalpando

Secretario: Dr. Manuel Arnoldo Castillo Rivera

Vocal: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Vocal: Dra. Marisela Hernández González

A mi esposo Fabian, por tu amor, apoyo y comprensión, gracias por ser mi compañero en este largo recorrido por la vida.

A mis Padres, porque los quiero y les agradezco más de lo que las palabras puedan expresar, son ustedes una presencia eterna en mi corazón y mi memoria.

A mis Hermanas, porque tal vez el azar nos hizo hermanas, pero desde la infancia, el corazón nos hizo amigas, gracias por ayudarme a levantar cuando he tropezado y por fortalecerme cuando estoy de pie.

A mi abuelita, gracias por la ternura y el cariño que siempre me ha brindado.

A Evelyn, gracias amiga, por darme ánimo y por estar conmigo cuando más te he necesitado.

A mis amigos, por regalarme su calidez, confianza y lealtad.

AGRADECIMIENTOS

A la DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA, por sus enseñanzas brindadas en estos dos años, por ayudarme a enfrentar mis errores y a madurar como persona y alumna, Dios la bendiga en todos los proyectos que emprenda.

Al DR. MANUEL A. CASTILLO RIVERA, por el tiempo, la paciencia y la amabilidad para asesorarme, gracias Maestro, es usted uno de los profesores que mas aprecio y admiro en la UAM-I.

A la M. en C. MA. ASUNCIÓN SOTO ÁLVAREZ y DRA. Ma. SOCORRO RETANA MÁRQUEZ, por su colaboración para la realización de esta tesis.

A la DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR, le agradezco el interés que demostró a lo largo de la realización de esta tesis, es usted un ejemplo de valor, sabiduría y fortaleza, espero que continúe guiando en la investigación a muchas generaciones más.

Al DR. MIGUEL ÁNGEL ARMELLA y DRA. MARISELA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ, por sus comentarios, sugerencias y aportaciones tan útiles para la realización de esta tesis.

Al Biól. Exp. MIGUEL A. ALCÁNTARA RAMÍREZ y al Biól. LUIS ANTONIO MARTÍNEZ MÉNDEZ, por su valiosa e indispensable ayuda en el trabajo de laboratorio.

A mi revisora de tesis y miembro del Comité Académico de la Maestría en Biología, la DRA. ROCÍO TORRES ALVARADO, gracias por las correcciones, sugerencias y críticas en mis exámenes tutorales, así como para la realización de esta tesis.

A la UAM-I, por permitirme ser parte de la generación 2007-2009 de la Maestría en Biología, y de la cual estoy orgullosa de haber egresado.

Al CONACyT, gracias por la beca otorgada, la cual me ayudó a concluir mis estudios de Maestría.

*Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar
Descansar, es empezar a morir.*

Gregorio Marañón

RESUMEN

A pesar de la vasta información que existe acerca del efecto que ejercen las hormonas gonadales sobre la regulación de la conducta reproductiva, particularmente en roedores, y que múltiples estudios han sido dirigidos a evaluar los niveles de Testosterona en plasma y correlacionarlo con los diferentes procesos reproductivos. No existen estudios dirigidos a establecer la relación entre las hormonas sexuales (Testosterona y Androstendiona) excretadas en heces fecales y las que se encuentran en el plasma. De tal manera, que en este estudio se analizó esta relación, pues la administración de tratamientos exógenos de hormonas en modelos *in vivo*, particularmente en roedores, para el estudio del comportamiento sexual utiliza concentraciones muy altas (del orden de mg) que sobre pasan por mucho las concentraciones plasmáticas (expresadas en ng). Además, esta relación cobra importancia para el estudio de la capacidad reproductiva en especies en peligro de extinción o en cautiverio, en donde se requieren de evaluaciones hormonales no invasivas. Hoy en día, esto ha sido posible gracias a la utilización de técnicas como el inmunoensayo enzimático (EIA), el cual ha sido utilizado con gran éxito y con la posibilidad de dar seguimientos a largo plazo sin la necesidad de sacrificar a las especies en estudio. Para ello, se utilizaron 36 hamsters intactos, que posteriormente se castraron y se dividieron de manera aleatoria en 4 grupos de 9 individuos, administrándoles Androstendiona y Testosterona con dosis de 500 y 1000 µg/día/21 días, se realizaron pruebas de conducta sexual masculina para cada condición experimental, posteriormente se realizaron los muestreos de heces fecales y se sacrificaron para obtener las muestras de plasma, cuantificándose la concentración de estas hormonas en heces fecales por EIA y de plasma por HPLC. De acuerdo a los resultados obtenidos, es la Androstendiona la hormona que se encuentra en mayor concentración plasmática, y también la más efectiva para restituir todos los parámetros copulatorios en el hámster castrado. Respecto a la Testosterona, se ésta se encuentra en mayor concentración en las heces fecales, encontrándose un aumento significativo en la excreción de este andrógeno, en los grupos de hamsters castrados y tratados con el reemplazo hormonal de Testosterona, comparados con los sujetos intactos y castrados, lo que sugiere una interconversión de Androstendiona a Testosterona, y de ésta forma se excreta vía heces fecales. Al analizar los promedios de los datos obtenidos de EIA y HPLC, en cada una de las etapas, se pudo hacer una estimación de la concentración de hormonas que se encuentran en plasma, a partir de lo excretado en heces fecales, mediante un modelo matemático predictivo o bien, a través del factor de estimación, para predecir la cantidad de Testosterona y Androstendiona en plasma, sin la necesidad de sacrificar a los sujetos.

ABSTRACT

Despite the vast amount of information available on the effects of gonadal hormones on the regulation of reproductive behavior, especially in rodents, and the many studies that have been designed to assess the levels of Testosterone in plasma and correlate them with various reproductive processes, no studies have yet attempted to establish the relationship between the sex hormones (Testosterone and Androstenedione) that are excreted in feces and those found in plasma. Thus, the present study analyzed precisely this correlation, as the administration of exogenous hormone treatments in *in vivo* models, particularly with rodents, for the study of sexual behavior uses very high concentrations (on the order of mg) that greatly exceed plasma concentrations (expressed in ng). This correlation is also important for the study of the reproductive capacity of endangered species and those in captivity, where noninvasive hormonal assessments are required. Today, this has been made possible through the use of techniques such as the Enzymatic Immunoassay method (EIA), which has been utilized with great success and offers the possibility of long-term follow-up with no need to sacrifice the species under study. This experiment used 36 intact hamsters that were subsequently castrated and then divided randomly into 4 groups of 9 individuals each. Androstenedione and Testosterone were administered in doses of 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{day}$ for 21 days, and tests of male sexual behavior were conducted for each experimental condition. The samples of feces were taken and the animals were then sacrificed in order to obtain the plasma samples. Concentrations of the sexual hormones were quantified using EIA for the fecal samples and HPLC for plasma. According to the results obtained, the hormone Androstenedione is found in higher concentrations in the plasma, and is also most effective for restoring all the copulatory parameters in the castrated hamsters. With respect to Testosterone, the highest concentrations were found in the fecal samples, which revealed a significant increase in the excretion of this androgen in the groups of hamsters that were castrated and then treated with Testosterone replacement therapy, compared to the intact and castrated subjects. These data suggest an interconversion of Androstenedione in Testosterone, which is then excreted via the feces. Upon analyzing the averages of the data from the EIA and HPLC analyses in each experimental condition, it was possible to estimate the concentration of the hormones in the plasma on the basis of what was excreted in the feces, using either a predictive mathematical model or an estimating factor to predict the amount of Testosterone and Androstenedione in the plasma, without having to sacrifice the subjects.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. DESCRIPCIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN EL HÁMSTER MACHO DORADO.....	15
III. REGULACIÓN NEURAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN MAMÍFEROS.....	19
IV. REGULACIÓN NEURAL DE LA CONDUCTA SEXUAL EN EL HÁMSTER MACHO.....	21
V. HORMONAS ESTEROIDES.....	24
a) Biosíntesis de hormonas esteroideas.....	25
b) Mecanismo de acción.....	30
VI. METABOLISMO EXTRAGLANDULAR DE ANDRÓGENOS.....	35
VII. EFECTOS CENTRALES DE LAS HORMONAS GONADALES: ACCIÓN QUE EJERCEN SOBRE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN EL HÁMSTER.....	36
VIII. EXCRECIÓN DE ESTEROIDES Y SUS METABOLITOS.....	37
IX. VENTAJAS DE LA DETERMINACION DE HORMONAS ESTEROIDES EN HECES FECALES.....	39
X. CARACTERISTICAS DEL INMUNO ENSAYO ENZIMÁTICO (EIA) PARA LA MEDICIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES.....	42
a) Control de calidad de EIA.....	42
b) Criterios de confiabilidad.....	43
XI. JUSTIFICACIÓN.....	44
XII. OBJETIVO GENERAL.....	45
XIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
XIV. HIPÓTESIS.....	46

XV. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	47
a) Selección de sujetos.....	47
b) Distribución de los sujetos seleccionados.....	48
c) Determinación de hormonas sexuales en heces fecales por EIA.....	49
i) Muestreo de heces fecales.....	49
ii) Extracción de esteroides en heces fecales.....	49
iii) Cuantificación de Testosterona y Androstendiona por EIA.....	50
d) Registros de Conducta Sexual Masculina.....	52
i) Gonadectomía	53
ii) Administración del Tratamiento hormonal.....	54
iii) Evaluación de los registros de Conducta Sexual.....	54
iv) Cuantificación de Hormonas gonadales en plasma.....	55
XVI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
XVII. RESULTADOS	56
a) Cuantificación de Androstendiona y Testosterona por EIA en hamsters.....	56
b) Factor de estimación de la concentración que se encuentra en Plasma.....	57
c) Ecuación del Modelo Potencial.....	65
d) Análisis de los Registros de Conducta Sexual.....	66
XVIII. DISCUSIÓN.....	74
XIX. CONCLUSIÓN.....	80
XX. REFERENCIAS.....	81

I. INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso característico de cada especie animal, la cual, tiene como objetivo incrementar la recombinación genética y crear nuevos individuos a través del intercambio de material genético. Además es el resultado de la interacción compleja de diversos procesos neuroendocrinos, fisiológicos y anatómicos; su realización implica la ejecución de un repertorio conductual complejo característico de cada especie el cual es denominado comportamiento sexual.

El comportamiento sexual resulta de la interacción continua entre el macho y la hembra, y se presenta en secuencias de respuestas ordenadas que varían dependiendo de la especie e involucra actividades de cortejo, apareamiento y conductas posteyaculatorias.

En los mamíferos el cortejo incluye la realización de las conductas específicas como son la emisión de vocalizaciones audibles o ultrasónicas, el olfateo y la exploración anogenital, el acicalamiento dirigido a la pareja y la persecución hacia la hembra por parte del macho. Si estas conductas son las adecuadas, entonces se presentará la cópula o apareamiento.

Las conductas de apareamiento en los mamíferos, están representadas por la ejecución de respuestas estereotipadas, cuya secuencia característica es particular a cada especie (Dewsbury, 1979), pero en general involucran 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.

Por otro lado, se ha demostrado en diversas especies como la rata (Beach, 1944, 1946, 1970; Feder, 1971), el ratón (Mc Gill y Haynes, 1973), el hámster (Warren y

Aronson, 1957), el cobayo (Grunt y Young, 1953), el conejo (Valenstein y Goy, 1957), el gato (Rosenblatt y Aronson, 1958) el perro (Beach, 1970) y el mono (Phoenix, 1973; Michael y Wilson, 1974), que las hormonas gonadales regulan el inicio y el mantenimiento de la conducta sexual masculina. Sin embargo, aún a pesar de la vasta información que existe sobre la regulación hormonal de la conducta sexual, particularmente en roedores, existen pocos estudios dirigidos a establecer las diferencias de la regulación hormonal entre algunas especies. Tal vez, por que la mayor parte de los estudios están reportados principalmente en rata (Beach, 1944, 1946, 1970; Feder, 1971) y hemos dado por hecho que es así como la regulación de la conducta sexual se presenta, por lo menos, en todos los roedores. Sin embargo, aunque el hámster no se encuentra tan alejado filogenéticamente de la rata, su conducta copulatoria presenta marcadas diferencias, las cuales consisten: en la realización de varias series copulatorias en un lapso corto de tiempo (30 min) y como característica particular de esta especie, realiza intromisiones largas. La conducta de intromisión larga en el hámster, se presenta conforme el macho se acerca a la extenuación sexual, aproximadamente después de 10 eyaculaciones, presentándose un cambio en las intromisiones; donde se prolonga la inserción peneana intravaginal por varios segundos (4 a 20 seg) (Bunnell y cols, 1976; Arteaga y Morali, 1997; Arteaga y cols, 2000). Estas conductas han sido poco analizadas y se sugiere que son importantes para desencadenar los eventos neuroendocrinos correspondientes a la gestación en las hembras.

Las diferencias encontradas en estos roedores pueden deberse a los cambios que el hámster ha tenido que adaptar ante las condiciones ambientales en

un contexto evolutivo y que estas adaptaciones le hayan permitido asegurar la reproducción y perpetuación de su especie.

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la regulación hormonal que presenta el hámster es diferente a la de la rata, pues en esta se sabe que es la Testosterona (T) y sus metabolitos: Dihidrotestosterona (DHT) y Estradiol (E_2), quienes regulan la conducta sexual masculina (CSM), mientras que en el hámster es la Androstendiona (A), principalmente, y no la Testosterona (T) quién regula la expresión de la CSM, además de que hemos demostrado que la Androstendiona, se presenta en mayor concentración (4.08 ± 0.23 ng/ml) en el plasma que la Testosterona (2.04 ± 0.17 ng/ml), (Arteaga-Silva y cols., 2005). Pero no sólo la Androstendiona regula la expresión de la CSM, en esta especie, si no que también mantiene la estructura y función de los órganos sexuales accesorios como la vesícula seminal, la próstata y el pene, aunque de manera menos eficiente que la Dihidrotestosterona, al encontrar este hallazgo, observamos que la administración del tratamiento hormonal con Androstendiona requerido para la adecuada expresión de la conducta sexual es mucho mayor que la dosis efectiva para mantener la estructura y función de los órganos sexuales accesorios (Arteaga-Silva y cols., 2008).

Sin embargo las técnicas utilizadas para la determinación de hormonas en estos estudios, han sido técnicas en donde las muestras son colectadas de un amplio número de animales y por métodos invasivos, que producen un alto nivel de estrés en los sujetos experimentales, por lo que es de nuestro interés en este estudio utilizar métodos alternativos como el Inmunoensayo enzimático (EIA), el cual es un método no invasivo y provee resultados precisos, además de que permite una mayor

frecuencia de muestreo y por tanto realizar estudios longitudinales en los que se pueden obtener muestras de heces fecales o de orina de los mismos individuos durante un lapso de tiempo prolongado. Así, esta técnica nos permitirá determinar la cantidad de Testosterona y Androstendiona excretada en heces fecales en los hamsters tratados bajo los diferentes tratamientos hormonales, buscando la relación entre la que se administra, la cantidad de hormonas en plasma y lo que se depura de estas hormonas en las heces fecales. Además de contribuir al conocimiento de la regulación hormonal en la Biología reproductiva en mamíferos y considerar de manera importante que no sólo la Testosterona es la hormona implicada en la reproducción, ya que la mayoría de los estudios que se han publicado sobre la biología reproductiva de mamíferos se han enfocado en la participación de esta hormona, dejando de lado la posibilidad de que otros andrógenos como la Androstendiona puedan ser responsables de regular el comportamiento reproductivo en diferentes especies de mamíferos.

II. DESCRIPCIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN EL HÁMSTER MACHO DORADO

El comportamiento sexual en el hámster comprende: conductas precopulatorias, conducta copulatorias y conductas posteyaculatorias. En las conductas precopulatorias, el hámster emite vocalizaciones ultrasónicas (Floody y Pfaff, 1977), olfatea la cabeza y explora la región anogenital de la hembra, además de realizar un acicalamiento dirigido a la pareja y movimientos que tienden a

estimular en la hembra la adopción de una adecuada postura de lordosis (Kow y cols., 1976).

En la conducta copulatoria, se observan conductas motoras estereotipadas como son: la monta, la intromisión, la eyaculación y la intromisión larga (Bunnell y cols., 1976). Fig.1

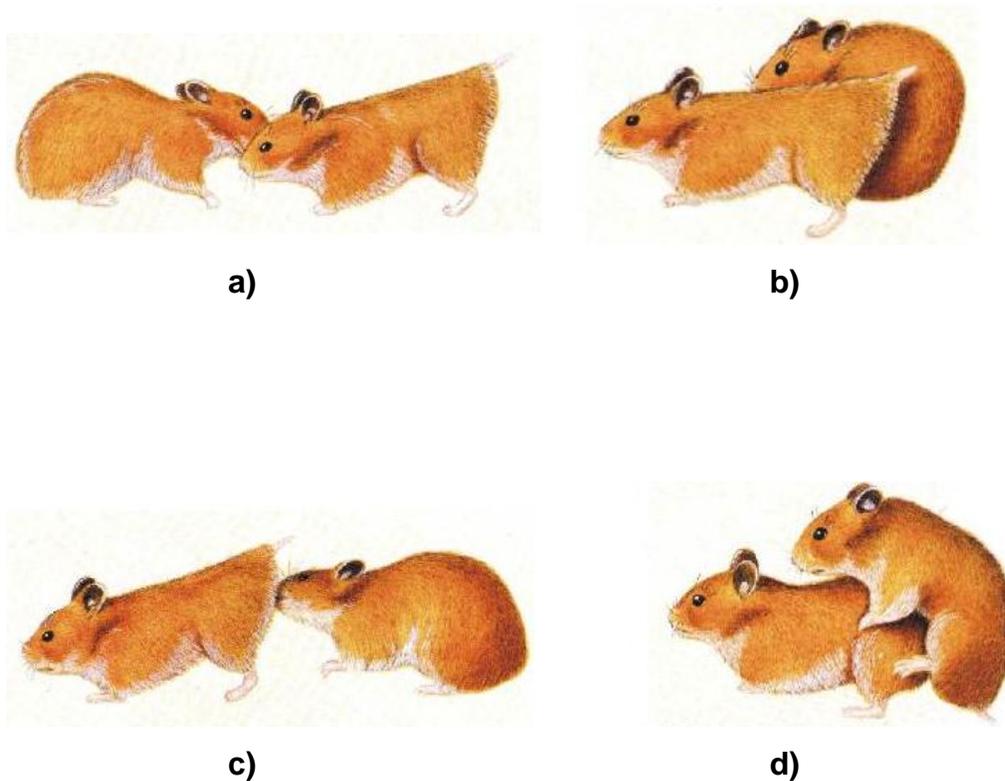


Fig. 1. Esquema que representa las conductas precopulatorias (a, b y c) y la conducta copulatoria de intromisión (d) realizadas por el hámster macho y la conducta de lordosis que la hembra despliega durante la conducta de apareamiento. Tomada y modificada de <http://www.sinnesphysiologie.de/hvsinne/phero/hem.htm>.

La monta consiste en el acercamiento del macho hacia la hembra por la parte de atrás, y la ejecución de movimientos pélvicos repetitivos sobre la grupa de la hembra, seguidos por una desmonta lenta. Por otro lado, durante las montas la hembra en posición de lordosis realiza movimientos de orientación de su región

perineal hacia los genitales masculinos (Noble, 1979 a); sin estos movimientos, la posibilidad del macho para llevar a cabo la intromisión se reduce de forma considerable (Noble, 1979 b). La intromisión se inicia como la monta, pero la serie de movimientos pélvicos extravaginales termina con un movimiento profundo hacia adelante que se mantiene durante 2.3 seg aproximadamente. La primera intromisión después de la eyaculación, presenta valores menores en la duración del contacto genital, que se reducen aproximadamente a 1.9 seg (Arteaga y Morali, 1997). La eyaculación es una monta con inserción peneana intravaginal, que se mantiene durante un periodo de tiempo más largo, de aproximadamente 3.0 seg y que en general culmina con la expulsión seminal. Una vez que el macho logra la inserción peneana, se presenta un incremento en la frecuencia de los movimientos pélvicos (Bunnell y cols, 1976; Arteaga y Morali, 1997).

El hámster puede presentar varias series eyaculatorias sucesivas. La primera serie se caracteriza por presentar un número variable de montas, pero mayor que en las series eyaculatorias sucesivas. En forma similar, el número de intromisiones es mayor en la primera serie que en las siguientes, presentándose a intervalos de aproximadamente 10 seg entre una intromisión y otra, hasta culminar con una eyaculación. Esta es seguida por una serie de conductas posteyaculatorias, en donde el hámster, presenta acicalamiento de su región genital y emite vocalizaciones ultrasónicas (Arteaga y Morali, 1997) y en aproximadamente 30 seg reanuda la actividad copulatoria. A este periodo se le ha denominado intervalo posteyaculatorio y termina cuando el macho realiza una respuesta de intromisión de la segunda serie copulatoria, la duración del IPE es de aproximadamente 30 seg, valor que tiende a

incrementarse conforme transcurren las series copulatorias. En las siguientes series eyaculatorias se presenta una disminución en el número de montas, intromisiones así como una disminución en la latencia de eyaculación. Fig 2.

PATRÓN COPULATORIO DEL HÁMSTER MACHO DORADO

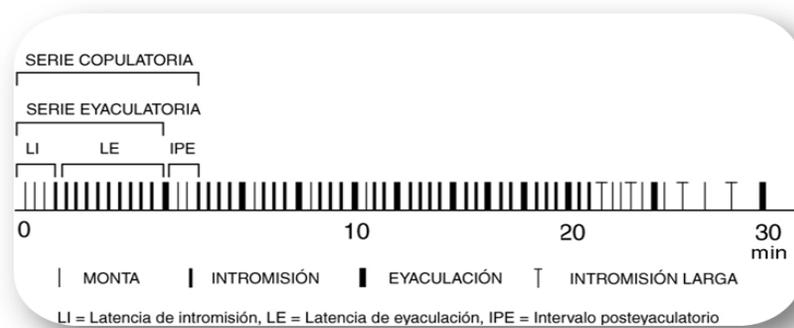


Fig. 2. Esquema que muestra las respuestas copulatorias y el curso temporal en que se presentan éstas durante un registro de conducta sexual masculina en el hámster (Arteaga-Silva, 1995).

Conforme el macho realiza varias eyaculaciones y se acerca a la extenuación sexual, se presenta un cambio en el patrón de intromisión, prolongándose la inserción peneana intravaginal por un periodo mayor que en las otras respuestas de intromisión, alcanzando valores de hasta 20 seg, estudios realizados mediante poligrafía demuestran que durante este evento, el macho realiza movimientos pélvicos intravaginales con un frecuencia menor que la de los movimientos pélvicos previos a la inserción. Este patrón de intromisión se ha denominado intromisión larga (IL) (Arteaga y Morali, 1997).

III. REGULACIÓN NEURAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN MAMÍFEROS

La participación de diversas estructuras cerebrales en los mecanismos neurales del comportamiento sexual masculino ha sido analizada mediante técnicas de lesión (Beach, 1940; Heimer y Larsson, 1966; Kling, 1968; Murphy Schneider, 1970) o de estimulación eléctrica (Malsbury, 1971; Caggiula y Szetchman, 1972) de dichas estructuras cerebrales. Además de técnicas de autorradiografía para la identificación de la captación de hormonas gonadales por estructuras específicas del sistema nervioso central (Pfaff y Keiner, 1973; Sar y Stumpf, 1973), también se han realizado estudios histológicos e inmunohistoquímicos de las conexiones entre diversas estructuras cerebrales involucradas en la integración del comportamiento sexual, así como estudios *in vitro* acerca de fenómenos celulares cuya modificación por hormonas puede correlacionarse con diversos aspectos de la conducta sexual (Lehman y Winans, 1983; Wood y Newman, 1995).

De esta manera, se ha determinado en un gran número de especies de mamíferos, la participación de estructuras cerebrales como el bulbo olfatorio principal y accesorio, la amígdala corticomedia, el área preóptica media, el hipotálamo anterior, la *stria terminalis* y el núcleo de la base de la *stria terminalis* en la integración de la actividad sexual masculina (Meisel y Sachs, 1994; Wood y Newman, 1995). Además, se ha propuesto la existencia de un mecanismo neural doble para el control de la conducta sexual (Beach, 1956; citado en Beach, 1967): por una parte, un mecanismo motivacional, en el cual a través del funcionamiento de las estructuras antes mencionadas se da lugar al inicio de la actividad sexual,

permitiendo el reconocimiento de la pareja a través de olfateo e investigación anogenital y por otra parte, un mecanismo copulatorio, el cual involucra en parte estructuras espinales y encefálicas que controlan la ejecución de los fenómenos copulatorios; la ejecución de la cópula incluye las respuestas de erección y movimientos penianos, movimientos pélvicos y diversos ajustes posturales.

En estudios posteriores, (Mogenson y cols, 1980) han postulado para otras conductas motivadas, que la información sensorial exteroceptiva y propioceptiva necesaria para la ejecución de las conductas motoras se integra en las estructuras del cerebro anterior y de ahí es transmitida la información por vías nerviosas hasta los ganglios basales mediante conexiones que hacen relevo en el núcleo *accumbens*, el cual recibe conexiones directas provenientes de estructuras límbicas, como la amígdala, el hipocampo y conexiones indirectas de otras zonas a través del área tegmental ventral, siendo estas interacciones importantes para la transición de la motivación hacia la ejecución de respuestas motoras de la conducta (Mogenson y cols, 1980). El núcleo *accumbens* proyecta hacia el área subpálida y el núcleo pálido ventral, de donde se proyectan fibras hacia el tallo cerebral a una región denominada región locomotora mesencefálica y en particular al núcleo pedúnculo pontino. La región locomotora mesencefálica está involucrada en la ejecución de los movimientos rítmicos de las extremidades durante la locomoción (Shik y cols, 1966). El núcleo pedúnculo pontino parece ser la vía final común de las señales que descienden del cerebro anterior, para el movimiento; aunque las proyecciones corticales y límbicas hacia este núcleo determinan la respuesta motora, las

características temporales de la misma son integradas a este nivel y posteriormente la información desciende a los circuitos espinales motores para su ejecución (Mogenson y Yong, 1991). Fig.3

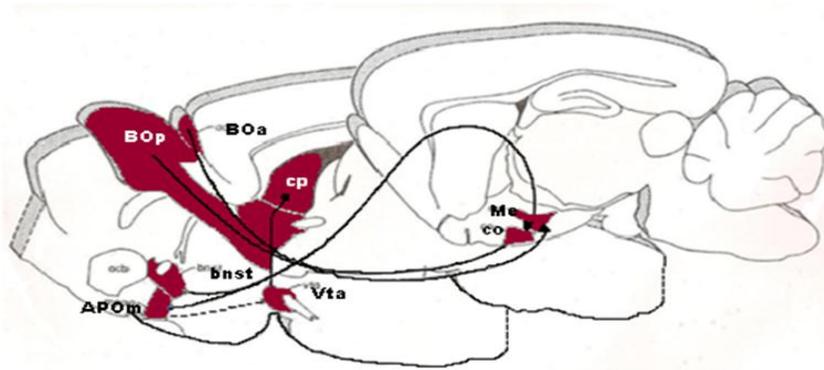


Fig. 3. Representación esquemática de algunas estructuras y conexiones neurales que forman parte del circuito que regula la Conducta Sexual Masculina, en roedores, descritas en tres secciones parasagitales de un cerebro de rata. Únicamente algunas de las entradas relevantes al área preóptica media han sido indicadas, la entrada de información quimiosensorial es percibida por el Bulbo Olfatorio principal (BOp) y después por el Bulbo Olfatorio accesorio (BOa), hacia la amígdala media (Me) y amígdala cortical (co), de ahí la información pasa a través del núcleo de la cama de la stria terminalis (bnst) y el área preóptica media (APOm), de ahí hacia el área tegmental ventral (Vta) y el putamen caudado (cp). Tomado y modificado de Meisel y Sachs, 1994.

IV. REGULACIÓN NEURAL DE LA CONDUCTA SEXUAL EN EL HÁMSTER MACHO

En el hámster macho, se ha observado que el bulbo olfatorio principal y el accesorio participan de manera importante en la regulación neural de la conducta sexual; la lesión o remoción de estos produce cambios drásticos en la actividad copulatoria o incluso la pérdida de ésta (Doty y cols, 1971; Devor, 1973).

Estas estructuras proyectan hacia la amígdala corticomedia y se ha observado que lesiones del área rostral corticomedia de la amígdala eliminan la cópula (Lehman y cols, 1980); por otra parte, las lesiones del área caudal de la amígdala corticomedia

reducen el número de machos que copulan, observándose en ellos mayores latencias de monta y de eyaculación, así como un aumento en los intervalos interintromisión. Las lesiones de la región basolateral de la amígdala provocan efectos más sutiles (Lehman y Winans, 1983).

En el hámster, la porción caudal corticomedial de la amígdala proyecta a través de la *stria terminalis* hacia el área preóptica (Kevetter y Winans, 1981), mientras que la región rostral corticomedial de la amígdala proyecta por medio de fibras ventrales hacia el núcleo de la base de la *stria terminalis* (Lehman y Winans, 1983). La sección de la *stria terminalis* incrementa la latencia de monta, la latencia de eyaculación y el intervalo interintromisión dos semanas después de la cirugía y una semana después, la latencia de eyaculación es aún mayor y el número de intromisiones antes de la eyaculación aumenta significativamente (Lehman y cols., 1983). En cambio, la disección de las fibras ventrales produce alteraciones menos severas en la conducta copulatoria. Sin embargo, la sección de ambas vías elimina completamente la conducta copulatoria (Lehman y Winans, 1983).

Por otro lado, las lesiones del área preóptica media en el hámster disminuyen drásticamente la conducta copulatoria (Powers y cols, 1987). De tal forma, que las lesiones en áreas específicas a lo largo de estas vías apoyan el concepto de circuitos neurales regulados por las hormonas gonadales, denominado circuito hormonal, y la entrada de los estímulos sensoriales, denominado circuito quimiosensorial (Wood y Newman, 1995). Así, las lesiones de las vías olfatorias y vomeronasales a la amígdala media, o de sus proyecciones a través del núcleo de la cama de la *stria*

Fig. 4. Esquema que ilustra el circuito neural que regula la expresión de la Conducta Sexual en el Hámster, ésta depende de señales quimio sensoriales que son percibidas por la mucosa olfatoria y el órgano vomeronasal, así como de las hormonas esteroides gonadales. Las vías olfativas y hormonales se interrelacionan tanto funcional como anatómicamente en el cerebro y la interacción de las señales quimiosensoriales y hormonales son esenciales para la cópula en esta especie. Las señales quimiosensoriales son transmitidas a través del Bulbo Olfatorio Principal (BOP) y el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA), y posteriormente, la información pasa a núcleos o estructuras en el sistema límbico que contienen gran cantidad de receptores hormonales. Las regiones límbicas que transmiten la información quimiosensorial a las vías olfativas y que poseen un substancial número de receptores son la Amígdala media (NAM), el núcleo de la cama de la stria terminalis (NST) y el área preóptica media (APOm). Tomado de Wood y Coolen, 1997.

V. HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides son moléculas lipídicas cuya estructura comprende un complejo formado por 3 anillos ciclohexanos (A,B,C) y un anillo ciclopentano (D), el cual se denomina núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, o núcleo esteroide, mismo que presenta componentes adicionales que varían de acuerdo a la clase de esteroide que se trate (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

El colestano, comprende el núcleo esteroide con grupos metilo en las uniones entre los anillos A y B y entre los anillos C y D, con una cadena lateral de ocho miembros unida al carbono 17, este es el compuesto de donde se deriva el colesterol, el cual a su vez es el precursor de todos los esteroides. La separación de la cadena lateral entre el carbono 20 y el carbono 22 da lugar a la formación de los esteroides C21, o pregnanos, serie a la que pertenecen las progestinas. La segmentación de la cadena lateral entre el carbono 17 y el carbono 20, produce a los esteroides C19, serie de los androstanos, a la cual pertenecen los andrógenos. Y finalmente, la salida del grupo metilo angular unido al carbono 10 origina a los esteroides C18, serie de los estranos, en la que se encuentran los estrógenos

Los esteroides son transportados por la circulación para llevar a cabo su acción sobre una variedad de órganos y tejidos blanco, que comprenden no sólo el

sistema reproductivo, sino también otros órganos y sistemas, incluyendo los sistemas nervioso central, músculo esquelético, cardiovascular, inmune, hepático, adiposo y cutáneo, entre otros. Estas acciones a diferentes niveles contribuyen al éxito del proceso reproductivo en las diferentes especies de mamíferos (Gore-Langton y Armstrong 1994).

a) Biosíntesis de hormonas esteroides

La biosíntesis de *novo* de los andrógenos, como la de todas las hormonas esteroides, se inicia a partir de acetato y utiliza invariablemente el colesterol como intermediario, aunque también, los órganos esteroideogénicos, que son los sustratos anatómicos en la biosíntesis de andrógenos, tienen la capacidad de utilizar el colesterol circulante como precursor en la formación de hormonas con actividad androgénica (Loza y Lemus, 1988).

Por tanto, el colesterol, precursor de las hormonas sexuales, forma parte de las membranas celulares, y se sintetiza en el hígado de los mamíferos a partir de precursores simples, éste tiene una estructura compuesta por 27 carbonos y todos sus átomos de carbono son proporcionados por un simple precursor de dos átomos de carbono, el acetato (acetil-CoA), el colesterol es esencial para la actividad biológica, y se forma a partir de acetil-coA, mediante una compleja serie de reacciones que involucran diversos intermediarios, como β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), el mevalonato y dos isoprenos activados: el pirofosfato de dimetilalilo y pirofosfato de isopentenilo. Entre esta serie de reacciones se encuentra la condensación de unidades de isopreno para producir escualeno no cíclico, el cual se cicla para formar un anillo esteroide y su cadena lateral, que después de varias

reacciones, se convertirá en colesterol. El colesterol y sus ésteres se transportan en la sangre por lipoproteínas plasmáticas. Por tanto, las lipoproteínas de muy baja densidad (LDL) acarrean colesterol y sus ésteres, además de triacilgliceroles desde el hígado a otros tejidos. El colesterol y sus ésteres, son capturadas por endocitosis mediada por receptor, en la que la apoproteína B-100 de la LDL es reconocida por receptores específicos, ubicados en la membrana plasmática. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) sirven para remover el colesterol de la sangre, el cual es transportado hacia el hígado (Loza y Lemus, 1988).

La biosíntesis de colesterol a partir de acetato, ocurre en cuatro etapas:

ETAPAS DE LA BIOÍNTESIS DE COLESTEROL A PARTIR DE ACETATO

1.- Tres unidades de acetato se condensan para formar un intermediario de seis átomos de carbono, mediante las enzimas tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa, para producirse 3R-mevalonato.

2.- El mevalonato se convierte en unidades activadas de isopreno a través de la enzima mevalonatocinasa, fosfomevalonatocinasa, pirofosfomevalonatocinasa o carboxilasa y pirofosfato isomerasa, que convierte en pirofosfato de isopentenilo al pirofosfato de dimetilalilo por medio de una reacción concertada de protonación-desprotonación.

3.- Se polimerizan seis unidades de isopreno (cinco átomos de carbono) para formar una estructura lineal de 30 átomos de carbono, que se denomina escualeno, a través de las enzimas, preniltransferasa, y escualeno sintasa.

4.- El escualeno se cicla para la formación de cuatro anillos unidos (A, B, C y D), que forman el núcleo de los esteroides, y después de una serie de cambios (oxidaciones, remoción o migración de grupos metilo) se obtiene el producto final, que es el colesterol.

Posteriormente en la ruta de biosíntesis de los andrógenos, iniciada a nivel mitocondrial, a partir del colesterol a pregnenolona, que tiene como paso limitante la hidroxilación enzimática en C-20, es selectivamente activado en el testículo del adulto por la hormona luteinizante (LH) de la adenohipófisis, mientras que durante la vida embrionaria es activado por la hormona gonadotropina corionica (GCH) de origen trofoblástico. Aunque diferentes desde el punto de vista químico e inmunológico, ambas hormonas glicoprotéicas tienen un modo idéntico de acción, el cual es mediado por un receptor con gran afinidad para LH y/o GCH, localizado en la membrana plasmática de las células productoras de andrógenos (Loza y Lemus, 1988).

La biotransformación de pregnenolona a Androstendiona y Testosterona en los mamíferos, puede proceder a través de diferentes rutas o vías metabólicas dependiendo del órgano endocrino y/o de la especie. Estas vías se han designado como " Δ^5 " y " Δ^4 " según la localización del punto de insaturación (doble enlace) de los compuestos intermediarios (Loza y Lemus, 1988).

Por medio de una serie de estudios metabólicos con esteroides isotópicamente marcados con tritio (^3H) y/o carbono 14 (^{14}C), se ha podido establecer que la biosíntesis de Testosterona, a partir de pregnenolona en las células de Leydig del testículo humano y del perro, opera fundamentalmente, aunque no en forma

exclusiva, por la vía de los Δ^5 . El primer paso en esta secuencia biosintética es la 17α -hidroxilación de la pregnenolona que es inmediatamente seguida de la ruptura de su cadena lateral, un hecho que es mediado por la acción de la $17,20$ esteroide liasa.

La acción secuencial de estas dos enzimas microsomales dependientes de NADPH y oxígeno condiciona la formación de Dehidroepiandrosterona (DHA), un compuesto de 19 átomos de carbono (por la pérdida de la cadena lateral) que aún conserva el doble enlace entre los carbonos 5 y 6 (Δ^5) y el grupo hidroxilo en el carbono-3, presentes en la molécula de pregnenolona.

La reducción en C-17 de la cetona de la dehidroepiandrosterona por acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, localizada en el citosol y dependiente de NADP, da lugar a la formación del Δ^5 -androstendiol. Esta reacción enzimática es reversible y su dirección está determinada por el pH. Tanto la DHA como el Δ^5 -androstendiol a Testosterona, que es catalizada por el sistema enzimático Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3-cetoesteroide Δ^4 - Δ^5 -isomerasa, que se localiza en la fracción microsomal.

La primera secuencia metabólica a partir de pregnenolona es su biotransformación a progesterona por acción de la Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa. Posteriormente, la 17α -hidroxilación de progesterona y la subsecuente ruptura de su cadena lateral, conducen a la formación de Androstendiona, un compuesto de 19 átomos de carbono, cuya molécula ya exhibe actividad androgénica intrínseca. Finalmente, por acción de la 17β -hidroxiesteroide

deshidrogenasa, la Androstendiona es bio-convertida a Testosterona (Loza y Lemus, 1988). Fig 5.

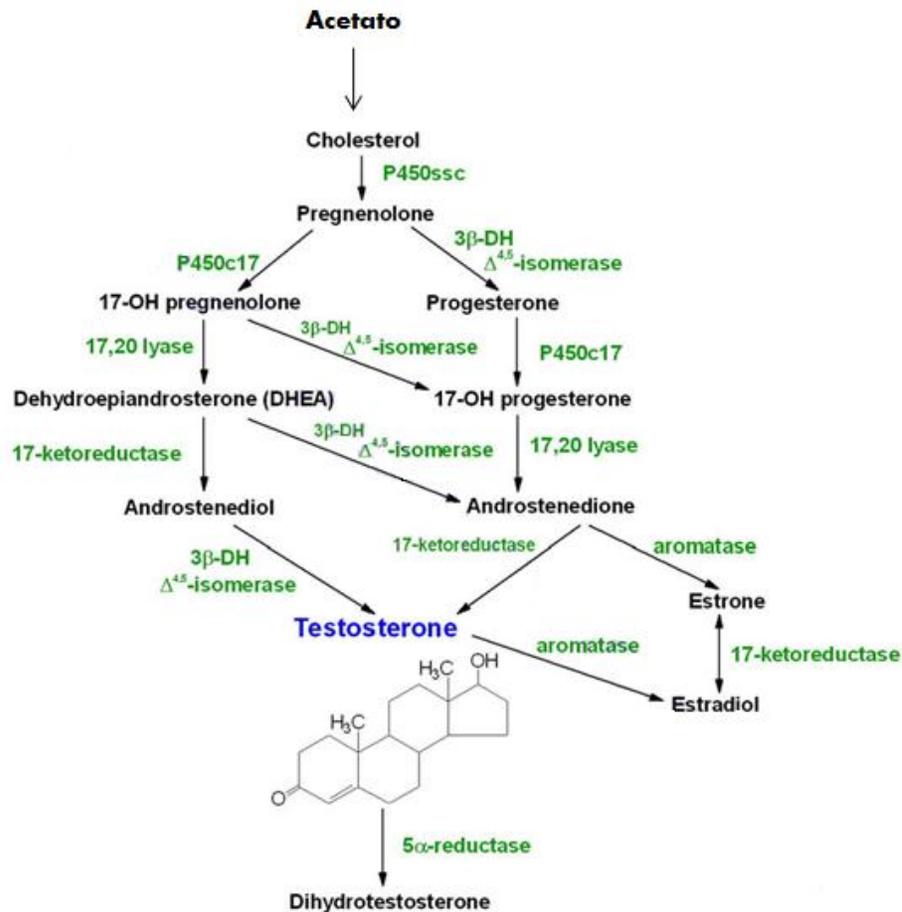


Fig. 5. Biosíntesis de hormonas esteroideas, el acetato es precursor en la síntesis de novo, el colesterol es un intermediario, sin embargo todas las hormonas esteroideas son derivadas del colesterol. La vía biosintética que produce las hormonas sexuales en los tejidos gonadales incluyen la producción de los andrógenos, Androstenediona y Dehidroepiandrosterona. Testículos y ovarios contienen una enzima adicional, una 17β-hidroxiesteroide dehidrogenasa, que permite que los andrógenos se conviertan a Testosterona, ésta es secretada al plasma y transportada a las células de Sertoli por una proteína ligadora de andrógenos (ABP). En las células de Sertoli la unión doble Δ⁴ de la Testosterona es reducida, produciendo Dihidrotestosterona. La Testosterona y la Dihidrotestosterona son transportadas en el plasma y llevadas a su tejido blanco a través de una globulina específica ligadora de esteroides gonadales (GBG). En varios tejidos blancos, la Testosterona puede ser convertida a Dihidrotestosterona (DHT), y por tanto se considera una prohormona para la formación de DHT y estrógenos. Tomado y modificado de <http://www.themedicalbiochemistrypage.org>

b) Mecanismo de acción

Se conocen 2 mecanismos de acción de las hormonas esteroides:

- 1) El mecanismo genómico
- 2) El mecanismo no genómico

1) Mecanismo genómico

Los esteroides están involucrados en varias respuestas celulares a través de su acción genómica. De acuerdo a la teoría clásica de acción, las hormonas esteroides se unen a sus receptores específicos, que son factores de transcripción intracelulares que al unirse con su ligando modulan la expresión de genes blanco regulados por esteroides ejerciendo un efecto positivo o negativo en estos genes (Beato y cols., 1996; Beato y Klug 2000).

El esteroide libre se difunde pasivamente dentro de su célula blanco hasta llegar al núcleo, en este sitio se une con su receptor específico. La unión del esteroide con su receptor genera cambios conformacionales en este último, permitiendo que el complejo hormona-receptor se una con alta afinidad a los elementos de respuesta a hormona (ERH). Estos ERH reguladores son secuencias palindrómicas de DNA de 15-20 pares de bases localizadas en el extremo 5' (o incluso dentro del gen) de genes regulados por hormonas. Se han caracterizado cuatro clases de ERH: 1) El elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE); 2) El elemento de respuesta a andrógenos (ERA); 3) El elemento de respuesta a progesterona (ERP) y 4) El elemento de respuesta a mineralocorticoides (ERM), todos tienen una secuencia consenso común, por medio de la cual actúan. La

secuencia consenso del elemento de respuesta a estrógenos (ERE), es muy parecida al elemento de respuesta a hormonas tiroideas (ERHT), solamente que esta no tiene los nucleótidos separadores. La unión del complejo hormona-receptor al ERH activa la transcripción de genes regulados por hormonas, generando la síntesis del ARNm, que posteriormente se traducirá en una proteína y esta ejercerá su efecto en su propia célula o fuera de ella (Fuller,1991).

Los receptores a hormonas esteroides actúan como factores de la transcripción para regular la expresión génica por el reconocimiento palindrómico de ERE en el DNA después de la homo o heterodimerización del complejo ligando-receptor. Subsecuentemente, la transcripción es iniciada en conjunción con el complejo de la transcripción basal, diferentes coactivadores, represores y reguladores (Beato y Klug, 2000). La modulación de la transcripción depende de la unión del complejo ligando-receptor y se le ha denominado “genómico” y es sensible a inhibidores de la transcripción y la traducción (Verrey, 1998), Fig 6.

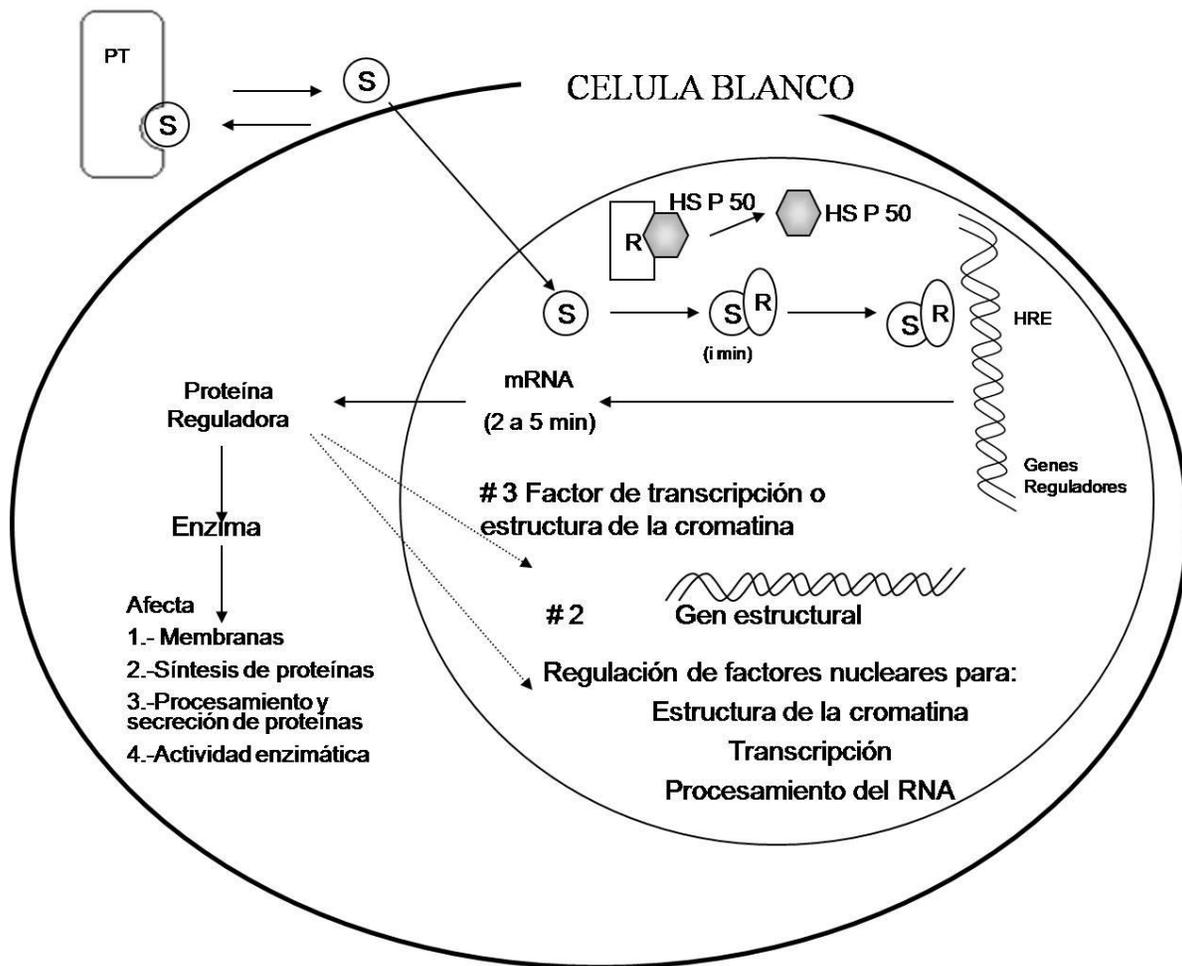


Fig. 6. Mecanismo general de acción de las hormonas esteroides. El receptor activado por la hormona esteroide se une a un elemento de respuesta localizado en el extremo 5' de un gen regulador (también llamado gen temprano). Esta región regula la transcripción del gen regulador minutos después de que la hormona entra a la célula. Dentro de la célula blanco pueden existir varios genes reguladores que responden a una hormona en particular, y cuya proteína participa en una multitud de sucesos en varios sitios dentro de la célula. El tiempo indicado representa el tiempo estimado para que ocurra el suceso después de la entrada de la hormona a la célula. PT= proteína transportadora; R= receptor; S= esteroide; S-R= receptor activado; HRE= elementos de respuesta a hormonas esteroides; HSP90= proteína de choque térmico. Tomado de Arteaga-Silva y cols., 2009.

2) Mecanismo no genómico

En contraste al mecanismo de acción genómico, los efectos no-genómicos por esteroides son principalmente caracterizados por la insensibilidad a inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas representando la más obvia evidencia experimental por la cual su acción comienza rápidamente (en cuestión de segundos

o minutos). Estos rápidos efectos están mediados a través de receptores con propiedades farmacológicas distintas a la de los receptores intracelulares (Falkenstein y cols., 2000)

Distinto a los receptores esteroides intracelulares, los receptores de interacción en la membrana (tales como péptidos agonistas, catecolaminas o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas) afectan la función celular por modulación de los niveles intracelulares de un segundo mensajero. En adición a estos efectos directos de los segundos mensajeros, los cambios inducidos por agonistas de mensajeros intracelulares modulan la transcripción por esteroides a través de un entrecruzamiento de señales intracelulares “*cross-talk*”. Por ello, la activación de células por péptidos agonistas puede modular la transcripción nuclear inducida por esteroides a través de la activación de segundos mensajeros con una capacidad intrínseca para regular la transcripción nuclear (Nordeen y cols., 1994).

Además, el “*cross-talk*” intracelular puede ocurrir a la par en ausencia del esteroide, por ejemplo, se ha demostrado que el factor de crecimiento epidermal activa al receptor de estrógenos alfa (RE α) por señalización a través de la vía metabólica de la MAP cinasa (MAPK), sugiriendo que la MAPK directamente fosforila al RE α (Bunone y cols., 1996).

Los efectos no-genómicos de los esteroides sobre la función celular involucra convencionalmente cascadas de segundos mensajeros, algunas de estas incluyen a la fosfolipasa C (PCL) (Civitelli y cols., 1990), al pH intracelular (Jenis y cols., 1993; Wehling y cols., 1996), al calcio libre intracelular ([Ca⁺²]) (De Boland y Norman, 1990; Wehling y cols., 1990) y a la proteína cinasa C (PKC) (Sylvia y cols., 1993). La

respuesta no-genómica específica parece depender del tipo de esteroide, tipo celular, tejido o especie utilizado. Sin embargo, las cascadas de señalización comparten grandes homologías con $[Ca^{2+}]_i$, PKC, PLC, cAMP, pH, MAP cinasa y otros tradicionales segundos mensajeros actuando por vías distintas, pero con similar resultado (Falkenstein y cols., 2000) Fig. 7.

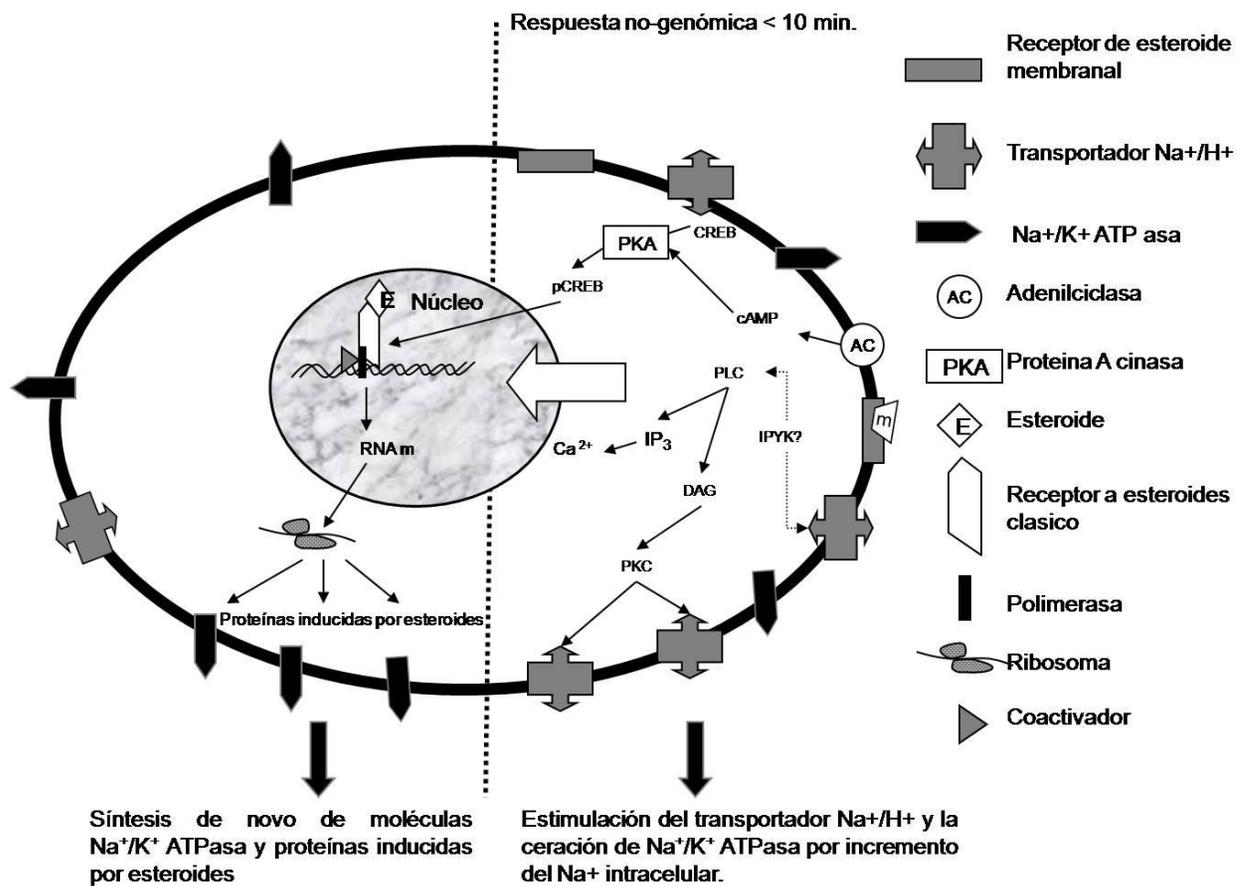


Fig. 7. Diagrama del efecto no-genómico. En el diagrama se aprecian algunas vías metabólicas que estarían involucradas en esta acción. Además de representarse la existencia de un receptor a esteroides membranar. Tomado de Arteaga-Silva y cols., 2009.

VI. METABOLISMO EXTRAGLANDULAR DE ANDRÓGENOS

La Testosterona es un precursor ó prohormona para la formación de dos tipos de metabolitos activos, los cuales medían muchas acciones androgénicas.

Por otra parte, la Testosterona puede experimentar una 5α -reducción de esteroides dando lugar a la Dihidrotestosterona (DHT) la cual en gran parte, es responsable del desarrollo sexual del macho y la virilización.

La Dihidrotestosterona puede metabolizarse a 17α -cetoesteroides y derivados polares excretados en la orina. De manera alternativa, los andrógenos circulantes contienen una Δ^4 , 3-ceto configuración que puede ser convertida a estrógenos en los tejidos extraglandulares de ambos sexos.

Los Estrógenos también pueden influenciar procesos fisiológicos y otros efectos que son independientes de los andrógenos, por tanto, la acción fisiológica de la Testosterona es el resultado de los efectos combinados de Testosterona y de sus metabolitos: la Dihidrotestosterona y Estrógenos, particularmente Estradiol (E_2).

La Dihidrotestosterona, se forma principalmente en tejidos blanco para andrógenos, pues en ellos se encuentra la enzima 5 alfa reductasa, la cual, convierte la Testosterona en Dihidrotestosterona. En cuanto al metabolismo de Testosterona a Estradiol, se sabe que la aromatización toma lugar en muchos tejidos, el más importante de los cuales es probablemente el tejido adiposo, sin embargo, también existe una aromatización importante en el sistema nervioso central (Loza y Lemus, 1988).

El rango total de aromatización extraglandular se incrementa con la edad y talla corporal. Los metabolitos de Testosterona son excretados en la orina (90%),

aproximadamente la mitad del porcentaje se excreta como 17-cetoesteroides y la otra mitad como una serie de componentes polares, que incluyen metabolitos hidroxilados y conjugados. Estos metabolitos excretados se piensa que son inactivos (Loza y Lemus, 1988).

VII. EFECTOS CENTRALES DE LAS HORMONAS GONADALES: ACCIÓN QUE EJERCEN SOBRE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN EL HÁMSTER

La expresión de la CSM del hámster es estimulada por la acción de las hormonas esteroides gonadales sobre el sistema nervioso central (SNC) (Wood, 1996). De tal forma que en el hámster, es necesaria la influencia de los andrógenos solos o en combinación con estrógenos para mantener la CSM. Así, se ha demostrado que la Testosterona es capaz de restituir la CSM en los machos castrados (Christensen y cols., 1973; Whalen y Luttge, 1971), mientras que los resultados de la administración de Dihidrotestosterona, son contradictorios. Algunos estudios en el hámster, muestran que la administración de Dihidrotestosterona facilita la CSM tan efectivamente como la Testosterona en hamsters adultos (Whalen y DeBold, 1974) pero no en hamsters juveniles (Romeo y cols., 2001). Contrariamente, en otros estudios se ha demostrado que la administración ya sea periférica o intrahipotalámica de Dihidrotestosterona es incapaz de revertir los efectos de la castración (Christensen y cols., 1973). Referente a la administración periférica, intrahipotalámica de E_2 en estructuras del sistema nervioso central como el área preóptica y en la amígdala media, se observa que facilita conductas de monta en el hámster castrado, sin restablecer el resto de los parámetros de la conducta sexual

(Lisk y Bezier, 1980; Lisk y Greenwald, 1983; Wood, 1996; Arteaga Silva y cols., 2005).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que en el hámster, la Androstendiona se encuentra en cantidades importantes en plasma (4.08 ± 0.24) y que es un andrógeno capaz de restituir la expresión de la CSM, incluyendo las intromisiones largas, de manera aún más eficiente que la propia Testosterona o sus metabolitos en el hámster castrado (Arteaga-Silva y cols., 2008).

VIII. EXCRECIÓN DE ESTEROIDES Y SUS METABOLITOS

Una vez que han llegado a las células “blanco” y afectado la fisiología y el comportamiento de un organismo, los esteroides pierden su capacidad de acción notablemente (Gower 1979, Aranyi 1983; McNabb 2004; Landsman y Waxman 2005). Sin embargo el órgano principal de desactivación y catabolismo de los esteroides (al igual que otras hormonas) es el hígado (Siiteri, 1981). Los esteroides parentales o metabolizados (hidroxilados, reducidos, sulfatados o glucorónidos), libres y/o unidos a proteínas acarreadoras, pasan entonces al intestino emulsificados en los ácidos biliares, lo cual permite que sean eliminados en la materia fecal (Norman y Litwack, 1987; Cockrem y Rounce, 1994). En el caso particular de los andrógenos, la degradación catabólica de los andrógenos requiere cambios estructurales en su molécula, que induzcan una pérdida o disminución de su potencia biológica y además, que los conviertan en compuestos hidrosolubles para facilitar su excreción, así las reacciones son mediadas por enzimas hepáticas, incluyendo la reducción en el anillo A (3α , 3β , 5α y 5β). Los estudios de correlación entre la

estructura molecular y la actividad biológica de los andrógenos han demostrado que la presencia del hidroxilo en el carbono 17 (con orientación β) es fundamental para la expresión de sus efectos fisiológicos. Por tanto la oxidación de este alcohol disminuye muy importantemente la actividad androgénica de la Testosterona. Además, la reducción del anillo A, particularmente en la posición 5β , elimina virtualmente la actividad androgénica.

Por otro lado, otras porciones de esteroides son eliminadas en la orina después de ser filtradas en los riñones (Sturkie, 1968). Las hormonas esteroides se eliminan como tales o como metabolitos y su tasa de excreción y metabolismo varía de acuerdo con la fisiología de cada especie (Adlercreutz y Martín, 1980). Son justo estas rutas fisiológicas, las que permiten determinar el funcionamiento gonádico y adrenal de un organismo por métodos no invasivos.

Obteniendo excretas de los organismos de interés y evaluando en ellas las concentraciones de esteroides parentales o metabolitos, es posible conocer el estado de un organismo sin necesidad de capturarlo para tomar de él una muestra de sangre (Heistermann y cols, 1995; Von der Ohe y Servheen, 2002). De hecho, en la actualidad, existen suficientes datos de numerosas especies, en apoyo a la posibilidad de generalizar los perfiles hormonales obtenidos de la evaluación en los esteroides fecales y de esta manera reflejar la actividad gonádica y adrenal dándonos información del estado endocrino de un individuo (Lasley y Kirkpatrick, 1991).

IX. VENTAJAS DE LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN HECES FECALES

La obtención de heces fecales ha sido utilizada para el estudio de tamaños poblacionales, espacios y usos de hábitats de especies que ocupan una determinada región (Davis y Winstead, 1980; Ezcurra y Gallina, 1981; Mandujano y Gallina, 1995; Lancia y cols., 1996; Litvaitis y cols., 1996; Sánchez-Rojas y Gallina, 2000; Pérez-Mejía y cols., 2004, Ortiz-Martínez y cols., 2005). También han sido útiles para conocer la distribución y estructura de comunidades de mamíferos (Ray y Sunquist, 2001), análisis de hábitos alimenticios y de la calidad de la dieta que se ingiere (Korschgen, 1980; Cooperrider, 1986; Mills, 1996; Buenrostro y cols., 2004). Todos estos estudios han sido ampliamente aceptados y es por estas razones que las excretas producidas por las especies de interés son un recurso que permite incrementar y profundizar el conocimiento en diferentes especies (Bookhout 1996).

Un uso más de las excretas, que durante mucho tiempo estuvo limitado a las rutinas de manejo en parques zoológicos, principalmente de origen estadounidense y europeos (Loskutoff y cols., 1983; Lasley, 1985), es la determinación del estado reproductivo de un individuo, realizado mediante la medición de hormonas sexuales en las heces fecales (Lasley y Kirkpatrick, 1991; Heistermann y cols., 1995; Peter y cols., 1996) además de que también se puede valorar el estrés fisiológico que podrían experimentar estas especies debido al manejo y prácticas de mantenimiento y analizar su repercusión en el estado reproductivo de estas especies (Carlstead y cols., 1993; Wielebnowski y cols., 2000). Hoy en día, estas metodologías han sido ampliamente utilizadas e implementadas en la Biología reproductiva de los

programas de reproducción en cautiverio en los zoológicos y en Laboratorios que estudian la fauna silvestre. Estas herramientas, también son útiles para determinar el acomodo de los animales dentro de los albergues y los intercambios con otras instituciones que dependen, en gran medida, de la capacidad reproductiva de los animales con que se cuentan. También son importantes para la determinación de la madurez sexual y de la fertilidad, ambos aspectos son necesarios en la planeación del establecimiento de parejas reproductoras y en la separación de individuos que ya no son activos (si es necesario) o bien, para la reducción en la reproducción cuando hace falta espacio (Asa, 1996; Ballou y Foose, 1996; Graham, 1996; Hodges, 1996; Wildt, 1996).

Por otro lado, también se ha observado que las características de los encierros, la dieta, o la composición y tamaño de los grupos, pueden provocar la ausencia de la función reproductiva debido al estrés severo causado por la limitante de espacio y la cercanía de las personas, la falta de algún nutriente, o la presencia de nutrientes coespecíficos que alteren el estado reproductivo de estos animales (Ziegler y cols., 1995; Carlstead, 1996; Robinson, 1996; Seidensticker y Doherty, 1996). Además, las prácticas propias del manejo de animales en cautiverio, como la contención, el transporte, la anestesia y las cirugías, también provocan estrés (Broom, 1988; Nogueira y Silva, 1997; Dobson y Smith, 2000). Debido a que la función reproductiva y las reacciones de estrés se asocian con cambios hormonales, el análisis de muestras de heces fecales de hormonas sexuales y de hormonas propias del estrés como el cortisol o la cortisona son un método efectivo para lograr un seguimiento del estado reproductivo y del grado de estrés de los animales en

estudio (Lasley y Kirkpatrick, 1991; Harper y Austad, 2000). Sin embargo, el beneficio mayor de emplear excretas en estudios de la fisiología reproductiva de los animales son los seguimientos de perfiles hormonales por períodos largos sin necesidad de manipular –estresar– a los animales, lo cual es muy conveniente cuando los eventos que desean estudiarse son poco frecuentes o bien se realizan en el hábitat de los animales, sin la necesidad de capturarlos (Lasley y Kirkpatrick, 1991; Harper y Austad, 2000; Millspaugh y cols., 2001, 2002; Möstl y Palme, 2002; Touma y cols., 2003; Wasser y cols., 2000). Otra de las ventajas, tiene que ver con el hecho de que la concentración de metabolitos es, en general, de 2 a 4 órdenes de magnitud mayor que la de los esteroides parentales obtenidos en sangre. Por lo tanto, permiten el uso de kits o estuches comerciales para efectuar mediciones manuales o automatizadas (Lasley y Kirkpatrick, 1991).

Además, la secreción de hormonas por parte de las glándulas es generalmente de naturaleza pulsátil con lo cuál, a lo largo del día, muestras de sangre reportarán variación en la concentración. Sin embargo, las cantidades que se eliminan en las excretas corresponden a la producción acumulada a través del tiempo con lo cuál se elimina esta variación circádica (Harper y Austad, 2000; Goyman, 2005). Es por todas estas razones que los estudios de hormonas sexuales en heces fecales han tomando una gran importancia.

X. CARACTERISTICAS DEL INMUNO ENSAYO ENZIMÁTICO (EIA) PARA LA MEDICIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

La técnica de EIA es una prueba que usa complejos de anticuerpo y antígeno, utilizada para medir hormonas y sus metabolitos en heces y orina de muchas especies de mamíferos como medio para generar un resultado perceptible sin la necesidad de utilizar métodos invasivos en la obtención de las muestras.

Los Inmunoensayos enzimáticos se diferencian de otros tipos de pruebas de laboratorio, como las pruebas colorimétricas, en donde se requiere el uso de una enzima que hace que cambie el color de una solución, o una sustancia que produzca luz, ya que usan complejos anticuerpo: antígeno para generar una señal que pueda medirse. Este procedimiento consiste en la competencia entre un antígeno sin marcar y otro marcado con enzimas por un número fijo de lugares de unión a anticuerpos. La cantidad de antígeno marcado con enzima que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito no marcado presente. El material que no se haya unido se elimina mediante decantación y lavado de los pocillos, (Shideler y cols., 1993), (Goymann y cols., 1999), (Ziegler y cols., 2005).

a) Control de calidad de EIA

El control de calidad es el conjunto de procedimientos que nos permite evaluar la calidad de cualquier análisis cuantitativo; específicamente en el EIA se estima la precisión, la reproducibilidad y la desviación de éste. Además, nos permite identificar y eliminar los errores que se producen en todo el análisis.

El resultado de la medición será confiable si el método cumple con las siguientes características (Garza y cols, 1996).

b) Criterios de confiabilidad

Precisión: es la dispersión de una misma muestra alrededor de su promedio. Se refiere a la repetición del valor medido o a la consistencia de los resultados. Esta es una medida del error del azar definido como la variación entre la replica de medición de las muestras definidas y esta determina la calidad del ensayo.

La exactitud: es el grado de coherencia entre el valor obtenido a través del análisis y la concentración verdadera de la muestra. La exactitud en una medición que va a depender de una máxima precisión y de la no desviación de ésta.

Reproducibilidad: es la consistencia en los resultados a lo largo del tiempo (se evalúa principalmente con la medición de muestras de control de calidad en cada análisis que se procese “Intra-ensayo”).

Especificidad: es la capacidad de un anticuerpo para unirse exclusivamente a un analito o antígeno, o bien, la capacidad del anticuerpo para discriminar entre los antígenos.

Sensibilidad: es la mínima dosis detectable o capacidad para detectar la mínima cantidad de antígeno. Esta es la baja concentración del antígeno que puede ser estadísticamente distinguido desde una muestra. Estadísticamente diferente de cero (DSL-10-3800 ACTIVE Testosterona y Androstendiona EIA, Garza y cols., 1996).

XI. JUSTIFICACIÓN

En diferentes especies de mamíferos estudiadas, se ha descrito que la castración provoca una reducción de la conducta de apareamiento, disminuyendo tanto la motivación como la ejecución sexual y que son las hormonas gonadales, principalmente Testosterona, quien revierte los efectos de la castración. Sin embargo, a pesar de la vasta información que existe de las hormonas gonadales sobre la regulación de la conducta reproductiva, particularmente en roedores, y que múltiples estudios han sido dirigidos a evaluar la Testosterona en plasma y correlacionarlo con los diferentes procesos reproductivos. No existen estudios dirigidos a establecer la relación entre las hormonas sexuales (Testosterona y Androstendiona) excretadas en heces fecales y las que se encuentran en el plasma. De tal manera, que es importante analizar esta relación, pues la administración de tratamientos exógenos de hormonas en modelos *in vivo*, particularmente en roedores, para el estudio del comportamiento sexual utiliza concentraciones muy altas (del orden de mg) que sobre pasan por mucho las concentraciones plasmáticas (expresadas en ng). Además, esta relación cobra importancia, pues en especies en peligro de extinción o en cautiverio, se requieren de evaluaciones hormonales no invasivas para el estudio de la capacidad reproductiva en estas especies. Hoy en día, esto ha sido posible gracias a la utilización de técnicas como el inmunoensayo enzimático, el cual ha sido utilizado con gran éxito y con la posibilidad de dar seguimientos a largo plazo sin la necesidad de sacrificar a las especies en estudio.

Por otro lado, son pocos los estudios que han considerado la posibilidad de que otros andrógenos como la Androstendiona puedan ser responsables de regular

el comportamiento reproductivo en diferentes especies de mamíferos, pues la mayoría de los estudios reportan que es la Testosterona quien regula el comportamiento reproductivo en mamíferos. De tal forma, que nuestro interés en este estudio, es determinar la cantidad de Testosterona y Androstendiona en heces fecales y en plasma de hamsters bajo diferentes condiciones experimentales: sujetos intactos, sujetos castrados y sujetos castrados y con reemplazo hormonal de Testosterona y Androstendiona. Tratando de encontrar una relación entre la dosis de hormona que se administra, la cantidad de hormona en plasma y lo que se depura de estas hormonas en las heces fecales. Además de relacionar los efectos que estas hormonas ejercen a nivel central, reflejado por la ejecución de la conducta sexual. De tal forma que esta información permitirá contribuir con el conocimiento en la Biología reproductiva y establecer semejanzas o diferencias en la regulación hormonal con otros mamíferos, abriendo la posibilidad de que otros andrógenos participen en esta regulación.

XII. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre la Testosterona y Androstendiona excretadas en heces fecales y las concentraciones plásmaticas. Así como el efecto de estas hormonas sobre la conducta sexual masculina en el hámster y contribuir al estudio de la conducta reproductiva en mamíferos.

XIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la cantidad de hormonas excretadas de: Testosterona y Androstendiona en hamsters macho intactos, castrados y castrados bajo el tratamiento con Testosterona y Androstendiona a diferentes dosis.
2. Cuantificar la cantidad de hormonas: Testosterona y Androstendiona, en plasma de hamsters macho intactos, castrados y castrados bajo el tratamiento hormonal con Testosterona y Androstendiona a diferentes dosis.
3. A partir de la concentración de Testosterona y Androstendiona cuantificadas en las heces fecales, encontrar un modelo matemático que revele la concentración de Testosterona y Androstendiona en plasma a diferentes dosis.
4. Comparar el curso temporal de la conducta sexual masculina en hámster castrados y tratados con Testosterona y Androstendiona a diferentes dosis

XIV. HIPÓTESIS

A partir de las concentraciones de Testosterona y Androstendiona encontradas en heces fecales, bajo los diferentes tratamientos hormonales, será posible estimar las concentraciones plasmáticas de éstas mismas hormonas, así como correlacionar estas concentraciones con la ejecución copulatoria del hámster.

XV. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un grupo de hamsters (*Mesocricetus auratus*) de 8 semanas de edad proporcionados por el Bioterio de la UAM-Iztapalapa, estos animales fueron mantenidos en jaulas con alimento chow Purina y agua *ad libitum*, bajo un ciclo de iluminación invertido controlado 14 hrs luz: 10 hrs oscuridad, con temperatura de $23 \pm 2^\circ$ C. Después de dos semanas de adaptación a estas condiciones, los animales fueron sometidos a tres pruebas de conducta sexual de selección. Los animales utilizados en este estudio fueron manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

a) Selección de Sujetos

Se realizaron tres pruebas de selección, a intervalos de una semana y únicamente fueron incluidos en el estudio aquellos animales que realizaron tres series copulatorias sucesivas en un tiempo no mayor a 15 minutos. Las pruebas se realizaron durante el periodo oscuro bajo iluminación roja tenue. Cada animal fue colocado en una caja de observación (Plexiglas de 1/8 de pulgada, 50 cm x 42 cm de base y 42 cm de altura) y después de cinco minutos de adaptación al área se introdujo una hembra receptiva. Las hembras utilizadas fueron tratadas por vía subcutánea con 3 μ g de Benzoato de Estradiol (Sigma, Chemical Co. St. Loise. MO, EEUU, en 50 μ l de aceite maíz) tres veces por semana y 500 μ g de Progesterona (Sigma, Chemical Co. St. Loise. MO, EEUU, en 50 μ l de aceite maíz). Las pruebas se dieron por terminadas al cumplirse alguno de los siguientes criterios: a) Si a los 15

minutos si los sujetos no presentaban la conducta de eyaculación, b) Al presentarse tres series copulatorias sucesivas en 15 minutos.

b) Distribución de los sujetos seleccionados

Una vez que los 36 hamsters fueron seleccionados, se distribuyeron en hamsters intactos (n=36), en donde no hubo remoción de las gónadas; hamsters castrados en donde hubo remoción de las gónadas (n=36). Un mes después de la castración, los hamsters fueron asignados aleatoriamente a la administración del tratamiento de restitución hormonal con Testosterona o Androstendiona en dosis de 500µg/día (n= 9) o 1000µg/día (n=9), durante tres semanas. La distribución de los sujetos siguió el diseño de grupos (Tabla 1).

Tabla 1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS 6 DIFERENTES GRUPOS

INTACTOS	CASTRADOS	A 500 µg/día	A1000 µg/día	T500 µg/día	T1000 µg/día
S1	S1	S1	S10	S19	S28
S36	S36	S9	S18	S27	S36

Tabla 1. Se muestran la distribución de los sujetos sexualmente activos (grupos correlacionados): hamsters intactos, que posteriormente fueron castrados y después de un mes postcastración, los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los tratamientos hormonales. (A= Androstendiona; T= Testosterona, con dosis de 500 ó 1000 µg/día).

Una vez que los sujetos fueron distribuidos aleatoriamente, se realizó: i) Muestreo y Extracción de Heces Fecales, ii) Registros de conducta sexual y iii) Colecta de las muestras de sangre para la obtención de plasmas, para cada una de las etapas.

c) Determinación de hormonas sexuales en heces fecales por Inmunoensayo Enzimático.

i) Muestreo de Heces Fecales

Se realizó el muestreo de las heces fecales de los hamsters durante cada una de las etapas: hamsters intactos, hamsters castrados y hamsters castrados y tratados con Testosterona o Androstendiona en dosis de 500 y 1000 μ g, el muestreo fue a las 9:00 horas del día en el que se obtuvieron la mayor cantidad de heces fecales, durante tres días consecutivos, las muestras fueron pesadas y empaquetadas en plástico, posteriormente se congelaron a una temperatura de -70°C.

ii) Extracción de los esteroides en heces

Las muestras fueron expuestas a temperatura ambiente, cuidando de que estas no estuvieran congeladas, para posteriormente ser maceradas en un mortero y realizar la extracción de los esteroides. Se utilizó 0.6 g de las muestras, éstas se maceran, cada una por separado y son depositadas en un frasco de plástico de aproximadamente 20ml, agregándoseles a cada una 5ml de Buffer de fosfatos y 5ml de metanol; posteriormente se agitaron en un vórtex hasta que la muestra se observó totalmente dispersa. Una vez terminado este paso se decanto el líquido y se colocó en tubos de polipropileno de 12 x 75 (Criogen). Estos fueron colocados en un agitador con movimientos horizontales y laterales (agitador shaiker) durante

aproximadamente 16 hrs. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por espacio de 50 min, se obtuvo el sobrenadante con una pipeta Pasteur de plástico, para cada una de las muestras, estos sobrenadantes fueron guardados en criotubos (Cimalgen) a una temperatura de -70°C, hasta el día del ensayo de EIA.

iii) Cuantificación de Testosterona y Androstendiona por EIA

TESTOSTERONA

Las hormonas fueron leídas utilizando el kit de EIA DSL-10-3800 ACTIVE Testosterone EIA. Se realizaron diluciones 1:20 (180µl del Buffer de fosfatos, 20µl de las muestras de Testosterona).

Procedimiento del ensayo

Los estándares, controles y muestras problema fueron sometidas a ensayo por duplicado, posteriormente se marcaron las tiras de microtitulación que se utilizaron. Se pipetearon 50µl de cada estándar, control y muestra problema en los pocillos correspondientes, después se preparó la solución de conjugado de enzima diluyendo el concentrado de conjugado de enzima en el diluyente del conjugado, se añadieron 100µl de solución de conjugado de enzima a cada pocillo. A estos pocillos, se añadieron 100µl de antisuero frente a Testosterona, se incubaron agitando a alta velocidad (500-700rpm) en un agitador orbital de microplacas, durante una hora a temperatura ambiente (~25°C). Posteriormente se lavaron los pocillos cinco veces con la solución de lavado, se secaron invirtiendo la placa sobre material absorbente. Se añadieron 100µl de solución de cromógeno TMB a cada pocillo, agitando a alta

velocidad (500-700 rpm) en un agitador orbital de microplacas, durante 30 minutos a temperatura ambiente (~25°C). Se añadieron 100µl de solución de parada a cada pocillo empleando un dispensador semiautomático, agitando suavemente de forma manual. Finalmente se leyó la absorbancia de la solución en los pocillos al cabo de 30 min, utilizando un lector de microplacas programado entre 450 y 630nm.

ANDROSTENDIONA

Las hormonas fueron leídas utilizando el kit de EIA DSL-10-3800 ACTIVE Androstenedione EIA. Se realizaron diluciones 1:10 (190µl de Buffer de fosfatos, 10µl de las muestras de androstendiona).

Procedimiento del ensayo

Todos los reactivos y muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (~25°C), los estándares, controles y muestras problema se trabajaron por duplicado. Posteriormente se marcaron las tiras de microtitulación que se utilizaron. Se pipetearon 25µl de cada estándar, control y muestra problema en los pocillos correspondientes. Después se añadió 100µl de conjugado-RTU a cada pocillo empleando una pipeta de precisión. Inmediatamente después, se añadió 100µl de antisuero frente a Androstendiona a cada pocillo empleando una pipeta de precisión. Los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente (~25°C) en un agitador programado a 500-700 rpm durante una hora, después se aspiraron y se lavaron cinco veces con la solución de lavado diluida, se secaron invirtiendo la placa sobre material absorbente. Se añadió 100µl de solución de cromógeno TMB a cada pocillo empleando un dispensador semiautomático y después se incubaron a temperatura

ambiente (~25°C) en un agitador programado a 500-700 rpm durante 10-15 minutos. Se añadieron 100µl de solución de parada a cada pocillo empleando una pipeta de precisión se agitaron suavemente de forma manual. Finalmente se leyó la absorbancia de la solución en los pocillos al cabo de 30 minutos, utilizando un lector de microplacas programado entre 450 y 630nm.

d) Registros de conducta sexual masculina

Estos registros se realizaron bajo las mismas condiciones que las pruebas de selección de los sujetos sexualmente activos. Sin embargo la duración del registro fue de 30 min. En cada uno de los registros, se analizaron los siguientes parámetros.

- 1) **Latencia de monta. (LM).** Tiempo que transcurre desde la entrada de la hembra a la jaula de observación hasta que se presenta la primera monta.
- 2) **Latencia de intromisión (LI).** Tiempo que transcurre desde la entrada de la hembra a la jaula de observación hasta que se presenta la primera intromisión.
- 3) **Latencia de eyaculación (LE).** Tiempo que transcurre desde la primera intromisión de la serie eyaculatoria hasta que se presenta la eyaculación, que da por terminada la serie.
- 4) **Número de montas (NM).** Número de eventos que se presentan durante una serie copulatoria.
- 5) **Numero de intromisiones (NI).** Número de eventos que se presentan durante una serie copulatoria.

- 6) **Frecuencia de eyaculación (FE).** Número de eyaculaciones que se presentan durante un período determinado.
- 7) **Intervalo de intromisión (III)** Intervalo que separa las intromisiones de una serie copulatoria.
- 8) **Intervalo posteyaculatorio (IPE).** Tiempo que transcurre entre una eyaculación y el inicio de una nueva serie copulatoria, determinado por la siguiente intromisión de la segunda serie copulatoria.

i) Gonadectomía

Los machos seleccionados como sujetos sexualmente activos (n=36) fueron sometidos a gonadectomía bilateral, bajo anestesia con 0.3ml de Ketamina y Xilacina (1:1) via intraperitoneal. Los sujetos una vez anestesiados fueron colocados en una charola de disección en posición ventral, sujetándose de ambas extremidades. Posteriormente, a cada uno de los sujetos sexualmente activos se les realizó una incisión en un plano vertical, a nivel escrotal. Realizándose la separación de la piel escrotal y del músculo de la bolsa escrotal, inmediatamente después se realizó una pequeña incisión en el músculo, oprimiéndose ligeramente con el dedo índice y pulgar para la obtención del testículo. Una vez fuera el testículo de la bolsa escrotal, este fue sujetado fuertemente con hilo seda, posteriormente se realizó la extirpación del testículo y se presionó nuevamente para sujetar y extirpar el siguiente testículo. Al término de la extirpación de ambos testículos, se cerró la bolsa escrotal y finalmente la piel escrotal con hilo seda. Los sujetos gonadectomizados fueron registrados semanalmente a partir de la cirugía hasta la pérdida de la CSM (4 semanas).

ii) Administración del tratamiento hormonal

Una vez cumplido un mes postcastración, se administró al grupo experimental por vía subcutánea, los siguientes andrógenos: Testosterona (17 β -Hidroxi-4-androsteno-3-ona, Sigma Chemical Co., San Luis, MO, USA., 1000 y 500 μ g por día en 50 μ l de aceite de maíz). Androstendiona (A, 4-Androstene-3,17-diona, Sigma Chemical Co., San Luis, MO, USA., 1000 y 500 μ g por día en 50 μ l de aceite de maíz), hasta completar 21 días de tratamiento hormonal.

Las hormonas se disolvieron inicialmente en 5ml de Metanol (Merck, México), se agregó el volumen de aceite de maíz necesario de acuerdo a la concentración requerida y se evaporó el Metanol a baño maría. Al grupo intacto y al grupo castrado se le administró diariamente por vía subcutánea, 50 μ l de aceite de maíz.

iii) Evaluación de los registros de Conducta sexual

En estas pruebas se analizó el curso temporal de sus respuestas copulatorias realizadas por los diferentes grupos experimentales, se evaluaron los siguientes parámetros: 1) latencia de monta; 2) número de montas en cada serie copulatoria; 3) latencia de intromisión en cada serie copulatoria; 4) número de respuestas de intromisión; 5) latencia de eyaculación en cada serie copulatoria; 7) frecuencia de eyaculación; 8) latencia de intromisión larga; 9) número de respuestas de intromisión larga; 10) intervalo interintromisión (III) en cada serie copulatoria; 11) intervalo posteyaculatorio (IPE) en cada serie copulatoria; 12) tasa de aciertos (TA) en cada serie copulatoria.

iv) Cuantificación de hormonas gonadales en plasma

Inmediatamente después de la prueba de conducta sexual los animales fueron sacrificados por decapitación para la obtención de sangre y separación del plasma. En cada una de las muestras de plasma se cuantificaron las concentraciones de Testosterona y Androstendiona. Las hormonas esteroides se extrajeron del plasma y se cuantificaron por HPLC, utilizando una modificación del método reportado por Wordward y Emery (1987). Un ml de plasma se mezcló con 100µl de una solución de 19-nortestosterona (5µg/ml en metanol) como estándar interno. Los esteroides se extrajeron en 5ml de una mezcla de éter dietílico-diclorometano (60:40, v/v) en vórtex, la mezcla se centrifugó por 5 min.

El sobrenadante se mezcló con 1ml de agua grado HPLC. Después de centrifugarse, el sobrenadante (3ml) se evaporó a sequedad bajo nitrógeno a temperatura ambiente. El residuo se disolvió con 100 µl de una mezcla de metanol-agua (60:40 v/v). La columna y la precolumna (Waters, Corp., Milford, Massachusetts) se equilibraron utilizando una mezcla de agua-acetonitrilo (65:35 v/v) a un flujo de 0.4ml/min. Las separaciones se realizaron a una temperatura de 40° C.

Se utilizó un controlador de sistema (Waters, mod. 600-MS) para bombear la fase móvil y los esteroides se detectaron con un detector UV (Waters, mod. 486) a una longitud de onda de 250nm. Los resultados se analizaron con una estación de manejo de datos (Maxima 820, Waters). El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo para los esteroides evaluados con esta metodología fue de 2.93% y 7.12%, respectivamente.

XVI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las concentraciones en heces y en plasma se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey, para saber si existían diferencias significativas entre grupos. Para conocer la relación de las concentraciones de Testosterona y Androstendiona obtenidas por EIA en heces fecales, con las obtenidas en plasma, se determinó inicialmente el factor algebraico que puede contribuir a estimar o predecir la concentración de hormona promedio obtenida en plasma a partir del promedio de la concentración de Testosterona y Androstendiona excretada en las heces fecales. Posteriormente a los promedios de concentración de hormonas de cada tratamiento (n=3), considerando la concentración en heces como variable independiente y la concentración en plasma como variable dependiente, se les aplicó una Regresión Lineal (con ambas series de datos transformadas a logaritmo; modelo potencial) para conocer la relación que existe entre la concentración de hormonas en plasma y en las heces fecales.

Para los parámetros de conducta sexual, se calcularon la media y la desviación estándar ($\bar{x} \pm s$) en cada grupo experimental, posteriormente se realizó una ANOVA de una vía para cada parámetro analizado seguido por una prueba *post-hoc* de Tukey. El valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

XVII. RESULTADOS

a) Cuantificación de Androstendiona y Testosterona por EIA en hamsters

Para determinar la relación entre la concentración de Testosterona y Androstendiona excretadas en heces fecales y las concentraciones plasmáticas de estas hormonas, se trabajaron los datos obtenidos por EIA y HPLC, en los hamsters bajo diferentes

condiciones experimentales, los sujetos pasaron por la condición de sujetos intactos, estos mismos sujetos se castraron y después de un mes de la castración se asignaron aleatoriamente al tratamiento hormonal de Testosterona o Androstendiona en dosis de 500 ó 1000µg/día, durante 21 días. (Tabla 2)

TABLA 2. CONCENTRACIÓN DE T Y A EN PLASMA Y HECES FECALES.

CONDICIÓN EXPERIMENTAL	HECES FECALES ($\bar{x} \pm s$)	PLASMA ($\bar{x} \pm s$)
INTACTO	9.74±0.82	2.92±0.97
CASTRADO	0.07±0.008	0.03±0.005
T500 µg/g	4227.03±1286.84*	71.61±43.4*
T1000 µg/g	5192±523.53*	64.51±34.64*
INTACTO	9.44±1.35	4.83±1.40
CASTRADO	0.07±0.008	0.05±0.006
A 500 µg/g	783.25±163.23*	41.36±2.71*
A 1000 µg/g	1305.47±394.36*	106.88±34.80*

Tabla 2. Se muestran los valores obtenidos ($\bar{x} \pm s$), a partir de las concentraciones de Androstendiona (A) y Testosterona (T) en µg/g en heces fecales por EIA, y en µg/ml en plasma por HPLC, obtenidos de los grupos experimentales: intactos, castrados y castrados con el tratamiento hormonal con dosis de T y A 500 y 1000µg/día, durante 21 días. Obsérvese un aumento significativo en las concentraciones de T y A cuando los sujetos castrados fueron tratados con el tratamiento hormonal al compararse contra ellos mismos en la condición de sujetos intactos y castrados. (*p<0.05) ANOVA, por medio del paquete estadístico NCSS, seguida de una *post hoc* de Tukey.

b) Factor de estimación de la concentración que se encuentra en el plasma

Una vez que se obtuvieron los promedios de las concentraciones de Testosterona y Androstendiona en plasma y en heces, bajo las diferentes condiciones experimentales, se obtuvo un indicador de la concentración de Testosterona o Androstendiona en el plasma, a partir del valor encontrado en las heces fecales.

Utilizando los promedios obtenidos de los datos de las concentraciones, se puede obtener una estimación de la concentración promedio aproximada en plasma, a partir del promedio de la concentración excretada en heces fecales, por medio del siguiente coeficiente:

$$X_p = (F) X_e$$

En donde **X_p** = Promedio de los datos de la concentración obtenida en plasma por HPLC; **X_e**= Promedio de los datos de la concentración obtenida en Heces fecales por EIA; **F**= Factor por el cual se hace un aproximado de la concentración que se encuentra en plasma, a partir de la concentración excretada.

Aplicándolo a los datos, el promedio de la concentración obtenida en plasma de animales Intactos es de Androstendiona = 4.55, y para Androstendiona, el promedio de la concentración excretada en heces fecales de los mismos sujetos experimentales = 9.44.

Entonces:

$$X_p = 4.55 \text{ ng/ml}$$

$$X_e = 9.44 \text{ ng/g}$$

Sustituyendo, el coeficiente quedaría de la siguiente forma:

$$(4.55 \text{ ng/ml}) = F (9.44 \text{ ng/g})$$

Despejando para obtener el factor:

$$4.55\text{ng/ml} / 9.44\text{ng/g} = F$$

$$F = 0.4829\text{g/ml}$$

Así, cualquier valor de concentración de hormona en heces multiplicado por este factor, podría dar un indicador de la concentración en plasma.

$$F = (0.4829\text{g/ml})(9.44\text{ng/g}) = 4.55\text{ng/ml}$$

Por otro lado, para dar mayor sustento matemático a la estimación de las concentraciones plasmáticas de Testosterona y Androstendiona a partir de las concentraciones cuantificadas en las heces fecales, primero graficamos nuestros datos y observamos, que estas variables no mostraban una completa linealidad, es decir que no existía una relación exacta entre la concentración de hormonas plasmáticas y las excretadas en las heces fecales. Por lo que se utilizó el modelo potencial, el cual establece una distribución potencial en ambas variables, es decir, se ajustan los datos de dos variables que no son completamente lineales. Este tipo de modelo ha sido ampliamente utilizado en los últimos 15 años y ha sido de gran utilidad en el campo de la Biología, especialmente en el conocimiento de la distribución de diferentes especies que convergen en un hábitat y del potencial ecológico que estas especies representan (Naoki y cols., 2006), además son una

herramienta útil para el manejo adecuado de zonas protegidas y de la conservación de la biodiversidad (Olson y Dinerstein, 1998, Myers y cols., 2000, Sechrest y cols., 2002). Sin embargo, aunque en este trabajo no se planteo estudiar la distribución de especies en una región geográfica específica, las características que ofrece el modelo potencial se ajustan con los datos obtenidos en la cuantificación de Testosterona y Androstendiona en plasma y heces fecales. De tal forma que este es el primer estudio en el que el modelo potencial se utiliza para predecir la concentración hormonal en plasma a partir de la cuantificación de las hormonas gonadales en heces fecales. Para ello, lo primero que se hizo fue obtener el logaritmo natural (ln) de los promedios de las concentraciones de Testosterona y Androstendiona en plasma y en heces fecales. La Matriz quedó de la siguiente forma, para la concentración de Testosterona y Androstendiona en plasma y heces fecales con los sujetos intactos y tratados con las dosis de Testosterona y Androstendiona 500µg y 1000µg/día, durante 21 días.

MATRIZ PARA TESTOSTERONA

CONDICIÓN EXPERIMENTAL	CONCENTRACIÓN EN PLASMA ng/ml	CONCENTRACIÓN EN HECES FECALES ng/g	ln DE LA [T] EN PLASMA	ln DE LA [T] EN HECES FECALES
INTACTO	2.92 ± 0.97	9.74 ± 0.82	1.07	2.27
T500µg	71.61 ± 43.4	4227.03 ± 1287	4.27	8.35
T1000µg	64.51 ± 35	5192 ± 523.5	4.16	8.55

MATRIZ PARA ANDROSTENDIONA

CONDICIÓN EXPERIMENTAL	CONCENTRACIÓN EN PLASMA ng/ml	CONCENTRACIÓN EN HECES FECALES	ln DE LA [A] EN	ln DE LA [A] EN
------------------------	-------------------------------	--------------------------------	-----------------	-----------------

		ng/g	PLASMA	HECES FECALES
INTACTO	4.83 ± 1.4	9.44 ± 1.35	1.57	2.24
A500µg	41.36 ± 2.7	783.25 ± 163.2	3.72	6.66
A1000µg	106.88 ± 35	1305.47 ± 394.3	4.67	7.17

Los datos correspondientes a la condición de sujetos castrados no fue analizada, pues lo que observamos es que estos sujetos al carecer de las gónadas, las concentraciones de Testosterona presentan valores cercanos a cero tanto en plasma (0.03 ± 0.005) como en heces fecales (0.07 ± 0.008).

Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal para las concentraciones de Testosterona y Androstendiona en plasma y heces fecales, trabajándose con los logaritmos naturales, para conocer la relación que existe entre la concentración de Testosterona o Androstendiona en plasma y la excretada de estas hormonas en las heces fecales, es decir entre las dos variables.

Los resultados de la regresión lineal de los logaritmos naturales de los promedios de Testosterona y Androstendiona en plasma y heces fecales, se presenta en las Figuras 8 y 9. En estas gráficas se muestra la relación entre la concentración de Testosterona y Androstendiona obtenida en plasma y la concentración de estas mismas hormonas obtenidas en las heces fecales, en donde la variable dependiente (Y), fue la concentración obtenida de Testosterona y Androstendiona en ng/ml a partir del plasma por HPLC y la variable independiente (X) es la concentración obtenida de Testosterona y Androstendiona en ng/g, a partir de heces fecales por EIA.

Para Testosterona, Se puede observar que la ordenada al origen presenta un valor de Antilog $a=0.92025$, la pendiente presenta un valor de $B_1= 0.5088$ y un coeficiente de determinación $R^2= 0.9966$, $p<0.03$. El valor del coeficiente de determinación indica que estas dos concentraciones tienen una relación del 99.67% entre los valores de las concentraciones de Testosterona.

Por tanto, en un 99.67% la variabilidad de los valores obtenidos de Testosterona en plasma, depende de los valores obtenidos de Testosterona en las heces fecales.

RELACIÓN ENTRE LA [T] EN PLASMA Y HECES FECALES

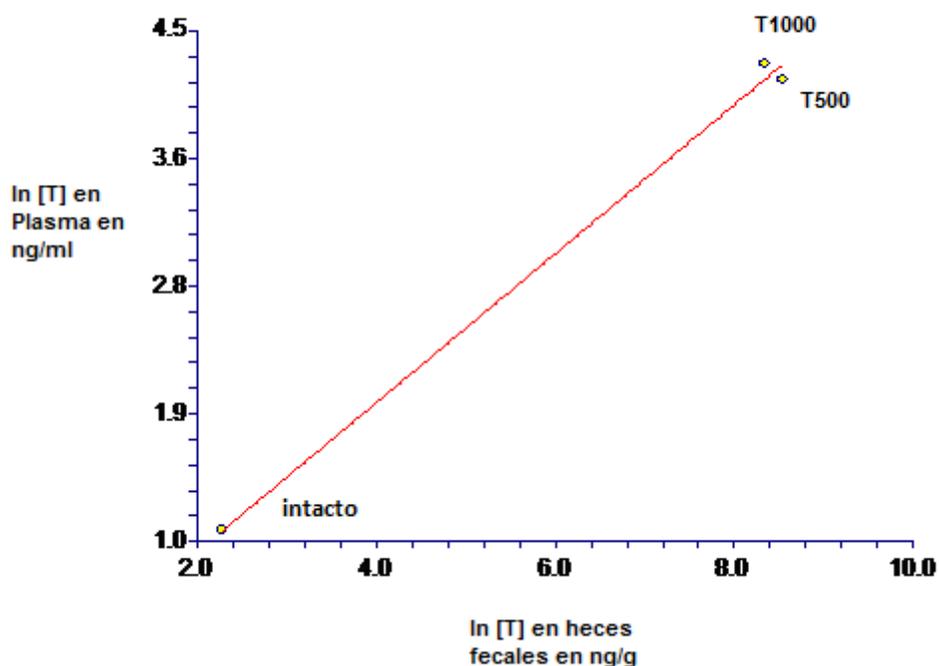


Fig. 8. Representación gráfica de la concentración de Testosterona en plasma (Y) y la concentración encontrada en heces fecales (X), de los sujetos en condición de intactos, castrados y tratados con T 500 y 1000 μ g. En donde se puede observar una [T] muy baja en plasma y en heces fecales de los sujetos en la condición de intactos. Los sujetos castrados y tratados con T500 ó 1000 μ g, presentan valores mayores de la [T], tanto en plasma, como en lo excretado en las heces fecales.

Con respecto a la relación entre la concentración de Androstendiona en plasma y la cuantificada en las heces fecales, se obtuvo el valor de la ordenada al origen de Antilog $a = 1.2873$, la pendiente presentó un valor de $B_1 = 0.5730$ y el coeficiente de determinación, $R^2 = 0.9567$, lo que significa que estas dos concentraciones tienen una relación del 95.67%, $p < 0.05$

Por tanto, en un 95.67% la variabilidad de los valores obtenidos de Androstendiona en plasma, depende de los valores obtenidos de Androstendiona en las heces fecales.

Los datos correspondientes a la condición de sujetos castrados no fue analizada, pues lo que observamos es que estos sujetos al carecer de las gónadas, las concentraciones de Androstendiona presentan valores cercanos a cero tanto en plasma (0.03 ± 0.005) como en heces fecales (0.07 ± 0.008).

RELACION ENTRE LA [A] EN PLASMA Y HECES FECALES

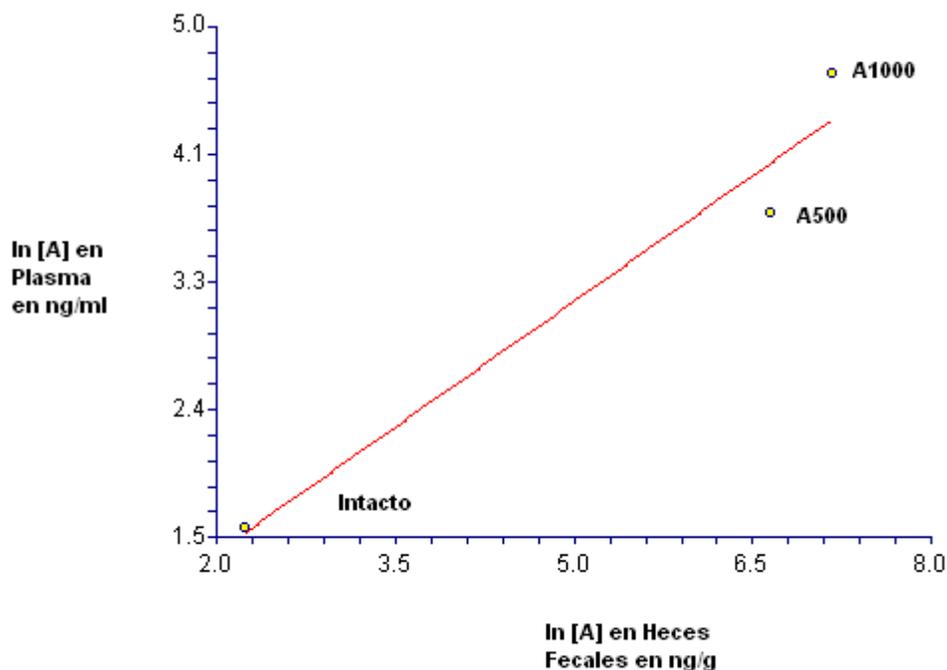


Fig. 9. Representación gráfica de la relación entre la concentración de Androstendiona en plasma (Y) y la concentración encontrada en heces fecales de los sujetos en condición de intactos y tratados con A500 y 1000 μ g, en donde se puede observar una [A] muy baja en plasma y en heces fecales de los sujetos bajo la condición experimental de intactos. Los sujetos castrados y tratados con T500 Y 1000 μ g presentan valores mayores tanto en plasma, como en heces fecales.

Lo anterior permitió disponer de un modelo predictivo, el cual puede determinar la concentración de hormona en plasma, a partir de concentraciones de hormona en heces. Este modelo fue el que mejor se ajustó a los datos, es decir el que cumplía con las siguientes características:

Tener el coeficiente de determinación R^2 más grande y el error estándar de estimación más pequeño.

c) Ecuación del modelo potencial

La relación entre la concentración de hormona del plasma y de heces, se ajusta de mejor manera al modelo de tipo:

$$Y = a x^b$$

Aplicando transformación logarítmica, el modelo queda representado por la siguiente ecuación:

$$\text{Log (y)} = \text{log (a)} + b \text{ log (x)}$$

Sustituyendo las variables para el presente caso:

$$P = B_0 H^{B_1}$$

En donde: P= Concentración hormonal en Plasma, H= Concentración hormonal en Heces fecales, B_0 = ordenada al origen de la recta (antilogaritmo de a) y B_1 = coeficiente de regresión ó pendiente de la recta, siendo los dos últimos valores determinados a partir de la regresión lineal.

El Coeficiente de determinación R^2 explica el porcentaje de relación que existe entre las variables con valores de 0 a 1, en donde 1= 100% de relación entre las variables.

Desarrollando el modelo:

$$P = \text{Antilog } a * H^{B_1}$$

Determinación de valores esperados

Aplicando este modelo a los datos obtenidos y utilizando el promedio de las heces fecales de los sujetos bajo la condición experimental de intactos, el valor de plasma esperado sería:

$$P = \text{Antilog } a * 9.74^{0.5088} = \text{Antilog } -0.0831 * 9.74^{0.5088} = 0.92025 * 3.18 = 2.92 \text{ ng/ml.}$$

Este valor esperado concuerda con el valor obtenido en plasma con HPLC ($2.92 \pm 0.97 \text{ ng/ml}$).

En el caso de Androstendiona, para la condición experimental de intacto el modelo queda de la siguiente forma:

$$P = \text{Antilog } a * 9.44^{0.5730} = \text{Antilog } 0.2526 * 9.44^{0.5730} = 1.2873 * 3.61 = 4.64, \text{ que es aproximadamente el valor obtenido para plasma por HPLC del sujeto intacto, que es } 4.83 \pm 1.4 \text{ ng/ml.}$$

d) Análisis de los registros de conducta sexual

Hamsters intactos

Los hamsters seleccionados como sexualmente activos fueron sometidos a una prueba de conducta sexual, la cual se realizó bajo las mismas condiciones que la prueba de selección de sujetos, sólo que esta tuvo una duración de 30 min. Los parámetros de conducta analizados durante este tiempo de registro, se muestran en la Tabla 3 y Figura 10. En esta tabla y en la Figura 10, se observa que los sujetos en la etapa de sujetos intactos presentaron diez series copulatorias, en las cuales se observó un menor número de montas en las primeras series copulatorias y conforme transcurren las series copulatorias el número de montas va aumentando. En cuanto al

número de intromisiones se observó que estas se presentaron en mayor número en la primera serie (11.0 ± 2.0) y conforme transcurren las series copulatorias se disminuyó este parámetro (4.0 ± 1.2), hasta que se presentaron las intromisiones largas (5.0 ± 2.0) las cuales se presentaron al transcurrir 9 ó 10 series eyaculatorias. Con respecto a las latencias (tiempo en que se presenta la primera conducta copulatoria después de la entrada de la hembra a la jaula de observación), para la conducta de monta fue de 101.7 ± 1.6 seg y para la conducta de intromisión fue de 124.0 ± 5.6 seg, estos valores corresponden únicamente a la primera serie copulatoria.

Con respecto al parámetro de Intervalo Post Eyaculatorio (IPE), se observó que se presentó un valor de 34.0 ± 3.0 , seg en la primera serie copulatoria y este valor fue aumentando conforme transcurrieron la siguientes series copulatorias, Figura 10. En cuanto al Hit Rate (HR) o tasa de aciertos, se observó que todos los sujetos, en condición de intactos tuvieron un HR con valores de 0.7 a 0.98, índice que nos indicó una buena eficiencia copulatoria, pues se ha reportado que el valor máximo para este parámetro es de 1.0 (Meisel y Sachs, 1994). Los valores de HR fueron disminuyendo, conforme transcurrieron las series copulatorias.

Hamsters Castrados

Una vez que los hamsters pasaron por la condición de sujetos intactos, estos fueron sometidos a la cirugía de gonadectomía, con la remoción de las gónadas, en esta condición se observó que uno de los primeros efectos de la castración fue la alteración del curso temporal de las respuestas copulatorias, lo cual se manifestó en un espaciamiento de las conductas copulatorias y una disminución del número de

series copulatorias. Desde la primera semana postcastración se presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) en este último parámetro, encontrándose valores de 5.4 ± 3.6 series copulatorias por prueba. En la segunda semana postcastración esta reducción fue mayor ($p < 0.01$), observándose valores de 1.3 ± 1.0 series copulatorias por prueba y en la tercera y cuarta semanas posteriores a la cirugía no se presentó ninguna respuesta de eyaculación.

Hamsters castrados y tratados con Testosterona dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{día}$

Una vez que los hamsters castrados no presentaron conductas copulatorias, los sujetos fueron asignados aleatoriamente a recibir la administración subcutánea de $500\mu\text{g}/\text{día}$ de Testosterona en un volumen de $100\mu\text{l}$ de aceite de maíz durante 21 días, la inyección se realizó diariamente y en el mismo horario. El registro de conducta sexual se realizó en el día 21 del tratamiento hormonal, en este registro se observó que los sujetos castrados y tratados con este andrógeno presentaron las conductas copulatorias de monta, intromisión, e incluso de eyaculación, pero de forma menos eficiente que estos mismos sujetos presentaron en la condición de sujetos intactos, presentándose con este tratamiento sólo 5 series copulatorias. Con respecto a los parámetros de número de montas (NM) se observó que estos sujetos presentaron mayor número de montas de 6.0 ± 0.5 a 5.0 ± 0.3 , para la primera y última serie copulatoria, respectivamente, ver Figura 10. Esto mismo sucedió con el número de intromisiones (NI), presentándose valores de 13.0 ± 1.0 para la primera serie copulatoria y de 8.0 ± 3.0 para la última serie copulatoria. Además de que estos sujetos nunca presentaron conducta de intromisión larga. En cuanto a las latencias

de monta y de intromisión, para la primera serie copulatoria, se presentaron valores más altos 200.0 ± 45.0 seg para la conducta de monta y de 240.0 ± 35.2 seg para la conducta de intromisión. Con respecto a las latencias de eyaculación, estas alcanzaron valores de 350.0 ± 46.3 seg para la primera serie copulatoria. Este mismo comportamiento se observó en el IPE alcanzado valores de 120.0 ± 15.0 seg para la primera serie copulatoria, incrementándose este valor conforme transcurrían las series copulatorias. (Figura 10). En cuanto al HR se observó un valor de 0.65 ± 0.05 , lo que indica una baja eficiencia copulatoria.

Hamsters castrados y tratados con Testosterona dosis de 1000 µg/día

Los hamsters castrados fueron asignados aleatoriamente a recibir la administración subcutánea de 1000 µg/día de Testosterona en un volumen de 100µl de aceite de maíz durante 21 días, la inyección se realizó diariamente y en el mismo horario. El registro de conducta sexual se realizó en el día 21 del tratamiento hormonal, en este registro se observó que los sujetos castrados y tratados con esta dosis presentaron mayor número de series copulatorias 6.0 ± 1.0 (Fig. 10). En cuanto a los parámetros conductuales de NM y de NI se observó una disminución de 5.0 ± 0.5 y de 7.0 ± 1.5 , respectivamente, y sólo dos de los sujetos tratados con esta dosis presentaron conductas de intromisión larga. Con respecto a las latencias de monta y de intromisión estas presentaron valores similares a los de la dosis de T 500µg/día, 250 ± 25.3 seg para la latencia de monta y 215 ± 5.3 seg para la latencia de intromisión, valores obtenidos para la primera serie copulatoria. La latencia de eyaculación presentó valores de 360.2 ± 26.1 seg y el IPE de 78 ± 8.2 seg (Fig. 10),

mientras que el valor del HR fue de 0.7 ± 0.2 . Por lo que este tratamiento tampoco tuvo una buena eficiencia copulatoria.

Hamsters castrados y tratados con Androstendiona dosis de 500 µg/día

Los hamsters castrados fueron asignados aleatoriamente a recibir el tratamiento con Androstendiona en dosis de 500µg/día, y se observó que en los sujetos castrados estimuló la presentación de todas las conductas copulatorias, presentando valores muy similares a los que estos sujetos presentaron en la condición de sujetos intactos ver Tabla 3. Observándose un HR de 0.7 a 0.9 para las primeras series copulatorias, lo que nos indica que este tratamiento fue efectivo para restablecer los efectos de la castración. Sin embargo, las conductas de intromisión larga se presentaron sólo en 4 sujetos de 9 que recibieron el tratamiento.

Hamsters castrados y tratados con Androstendiona dosis de 1000 µg/día

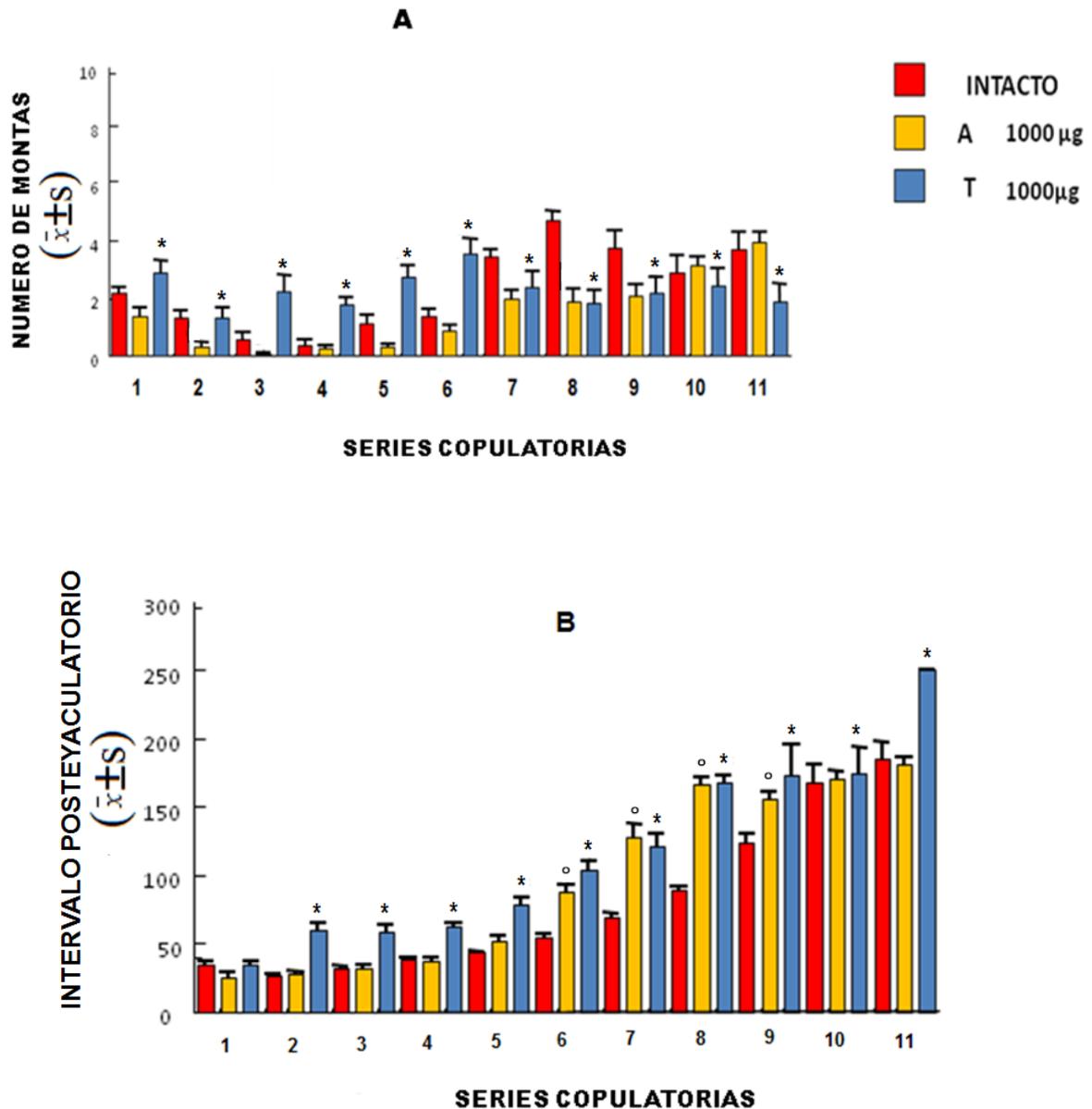
Los hamsters castrados que fueron asignados aleatoriamente a recibir el tratamiento con Androstendiona en dosis de 1000µg/día, estimularon la expresión de la conducta sexual, manifestándose en un aumento significativo ($p < 0.01$) en el número de eyaculaciones realizadas por los sujetos al compararse con los mismos sujetos en la condición de sujetos intactos. Este efecto se encontró asociado con la presencia de intromisiones largas en todos los sujetos. Además se observó un número menor de montas y de intromisiones; así como una reducción en las latencias de monta y de intromisiones 100.0 ± 10.0 seg y 113 ± 8.0 seg, respectivamente, al igual que la latencia de eyaculación 90.2 ± 5.1 seg y el valor del

IPE de 25.0 ± 4.0 seg, para la primera serie copulatoria (Fig. 10). Estos valores se comportaron de la misma forma que se presentó cuando los sujetos tenían las gónadas (intactos). Sin embargo, en las series copulatorias 6,7, 8 y 9 el valor del IPE fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el presentaron estos mismos sujetos en la condición de intactos (Fig. 10).

Tabla 3. PARÁMETROS DE LOS REGISTROS DE CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN EL HÁMSTER

Series Copulatorias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
INTACTO NM	2.5 ± 1.2	1.7 ± 0.5	-----	-----	0.7 ± 1.0	0.7 ± 1.0	3.7 ± 0.5	4.0 ± 1.0	3.0 ± 1.0	3.0 ± 0.50	3.7 ± 0.05
T 1000 NM	3.0 ± 0.5 **	1.7 ± 0.5	3.0 ± 0.5 **	2.0 ± 0.5 **	3.0 ± 0.5	3.0 ± 0.3	2.3 ± 0.2-	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.2	-----
T 500 NM	6.0 ± 0.5 **	2.0 ± 0.5	2.5 ± .03 **	4.0 ± 0.4 **	5.0 ± 0.3 **	-----	-----	-----	-----	-----	-----
INTACTO IPE	34.0 ± 3.0	26.0 ± 6.0	31.5 ± 2.0	38.0 ± 2.0	43.0 ± 1.5 **	54.5 ± 2.3	69.0 ± 4.0	96. ± 3.0	123.0 ± 8.0	168.0 ± 6.0	-----
T 1000 IPE	38.0 ± 8.2 **	66.0 ± 6.0 **	71.0 ± 3.4 **	68.0 ± 4.0 **	86.0 ± 4.3 **	121.0 ± 3.5	131.3 ± 5.0	175.7 ± 6.0	177.0 ± 12	177.0 ± 10.3	230.0 ± 1.0
T 500 IPE	85.0 ± 8.4	62.0 ± 7.0 **	80.0 ± 7.0 **	139.0 ± 10.0 **	155.0 ± 9.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
INTACTO HR	0.8 ± 0.11	0.74 ± 0.03	0.89 ± 0.02	0.93 ± 0.03	0.92 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.6 ± 0.06	0.70 ± 0.05	0.70 ± 0.02	-----
T 1000 HR	0.7 ± 0.02	0.7 ± 0.02	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.04	0.6 ± 0.02	0.5 ± 0.02	-----	-----	-----	-----	-----
T500 HR	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.02	0.6 ± 0.03	0.6 ± 0.02	0.5 ± 0.04	-----	-----	-----	-----	-----	-----
INTACTO NM	2.0 ± 1.3	1.0 ± 1.0	-----	-----	2.0 ± 1.2	4.0 ± 1.0	5.1 ± 0.6	4.0 ± 1.3	3.0 ± 1.2	4.0 ± 0.71	-----
A1000 NM	1.7 ± 0.5	0.5 ± 0.02	-----	-----	0.1 ± 0.01	0.5 ± 0.02	2.0 ± 0.70	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.8	3.0 ± 1.0	4.0 ± 0.6
A500 NM	6.0 ± 1.5 **	5.0 ± 0.3 **	3.0 ± 0.5 **	2.0 ± 1.0 **	2.0 ± 0.6 **	3.0 ± 2.1 **	4.0 ± 2.3 **	6.0 ± 1.2 **	7.0 ± 2.0 **	-----	-----
INTACTO IPE	34.0 ± 3.0	26.0 ± 2.0	31.5 ± 2.0	38.0 ± 2.0	43.0 ± 1.5	54.5 ± 2.3	69.0 ± 4.0	95.8 ± 3.0	123.0 ± 8.0	167.0 ± 6.0	-----
A 1000 IPE	30.0 ± 4.0	37.0 ± 3.0	41.2 ± 3.0	36.0 ± 3.4	45.0 ± 5.0	88.0 ± 5.0	120.0 ± 10.0	170.3 ± 3.3	160 ± 3.0	165.0 ± 6.0	181 ± 6.0
A500 IPE	34.0 ± 2.5	59.0 ± 5.4 **	58.0 ± 5.0 **	62.0 ± 3.2 **	78.0 ± 5.4 **	103.0 ± 7.0 **	121.0 ± 10.0 **	141.1 ± 2.1 *	168.0 ± 5.0 *	-----	-----
INTACTO HR	0.8 ± 0.11	0.74 ± 0.03	0.89 ± 0.02	0.92 ± 0.03	0.87 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.6 ± 0.06	0.70 ± 0.05	0.64 ± 0.02	-----
A 1000 HR	0.9 ± 0.01	0.96 ± 0.07	0.98 ± 0.03	0.96 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.88 ± 0.02	0.70 ± 0.040	0.74 ± 0.02	0.64 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.05
A 500 HR	0.7 ± 0.01 **	0.90 ± 0.06 **	0.72 ± 0.02 **	0.81 ± 0.01 **	0.79 ± 0.01 **	0.69 ± 0.02 **	0.48 ± 0.06 **	0.45 ± 0.02 **	0.43 ± 0.03 **	-----	-----

Tabla 3. Se muestran las ($\bar{x} \pm s$) de todos los parámetros de conducta sexual analizados. Se observa que los animales castrados y tratados con T y A 1000µg son más activos, ya que los valores obtenidos para estas etapas son significativamente mayores (**p < 0.01).



XVIII. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo experimental en el que se determinan las concentraciones de Testosterona y Androstendiona en heces fecales de hamsters intactos y castrados antes y después de la restitución hormonal, y se correlacionan con las concentraciones hormonales obtenidas en plasma, así como con la ejecución de la conducta sexual, además se hace uso de un modelo matemático predictivo, el modelo potencial, el cual normalmente es utilizado para realizar estudios de distribución de diferentes especies que convergen en determinado hábitat y del potencial ecológico que estas especies representan en ese hábitat (Naoki y cols., 2006). Aunque en este trabajo no se estudia la distribución de especies en una región geográfica específica, el modelo potencial se ajusta a los datos obtenidos para relacionar ambas variables.

Al analizar los datos de la cuantificación de las hormonas excretadas en las heces fecales, por medio de la técnica de EIA, en las condiciones de sujetos intactos, castrados y tratados con Testosterona o Androstendiona en dosis de 500 ó de 1000 μg se observó que la cantidad de Testosterona y Androstendiona excretada en la condición de sujetos intactos es mucho menor que la que se presentó en la condición de sujetos castrados y tratados ya sea con Testosterona o Androstendiona en cualquiera de las dos dosis administradas y que se presenta una ausencia en la excreción de Testosterona y Androstendiona en los sujetos en la condición de castrados, esto debido a la falta del testículo, principal fuente de síntesis de andrógenos (Hall, 1988). Al recibir el tratamiento hormonal de Testosterona o Androstendiona en dosis de 500 ó de 1000 μg , se observó un aumento significativo

en la excreción de estos andrógenos, de manera similar a lo que sucede con la administración de otros andrógenos. En donde se ha observado que al aumentar la dosis del esteroide, este se depura y excreta en mayor cantidad (Gao y cols., 2005, Perera y cols., 2006). Además, se observó que los valores de Testosterona en las heces fecales, son mayores que los de Androstendiona en el grupo de animales intactos, y aún más altos los valores de las concentraciones de Testosterona en los grupos de hamsters castrados y tratados con el reemplazo hormonal de Testosterona y de Androstendiona, lo que sugiere una interconversión de Androstendiona a Testosterona, pues se sabe que la concentración de Androstendiona, en el hámster, es mayor en plasma (4.08 ± 0.23 ng/ml) que la de Testosterona (2.04 ± 0.16 ng/ml), (Arteaga-Silva y cols., 2005) y la principal forma de excretarse estas hormonas podría ser en forma de Testosterona vía las heces fecales. Por otro lado, la cantidad encontrada en heces, concuerda con el hecho de que la concentración de hormonas sexuales en otros paradigmas experimentales es, en general, de 2 a 4 órdenes de magnitud mayor en las heces fecales que las de estas hormonas obtenidas en sangre (Lasley y Kirkpatrick, 1991).

En cuanto a las concentraciones plasmáticas, se observó un patrón similar al que se presentó en las heces fecales, sólo que los valores de estas concentraciones están muy por debajo de lo que se está excretando en las heces fecales, lo que nos está sugiriendo una excreción de los andrógenos de manera considerable, y que presenta una relación estrecha con la cantidad de hormona que se está administrando, pues la hormona administrada está en el orden de 0.5mg (500µg) y de 1mg (1000µg). Además, debemos tomar en cuenta que la administración de esta

hormona fue por 21 días y que esta hormona al día 21, tiempo en el que se tomaron las muestras de las heces fecales, hecho que también puede estar relacionado con la concentración tan elevada que se encontró en las heces fecales por medio de EIA. Por otro lado, tal vez el metabolismo del hámster presente una tasa alta de excreción y por ello se presenta una mayor concentración de Testosterona o Androstendiona en las heces fecales, tomando en cuenta que la cantidad de hormonas en heces fecales, se encuentra en 2 órdenes de magnitud, como se ha reportado en otros estudios (Lasley y Kirkpatrick, 1991). También, este aumento de hormonas excretado en las heces fecales pudiera correlacionarse con la necesidad de utilizar dosis suprafisiológicas para que la restitución de la Conducta Sexual Masculina se restablezca por completo, no solo en el hámster, sino incluso en otros roedores (Arteaga-Silva, 2005; Arteaga-Silva y cols., 2008; Phillips-Farfán y cols., 2008).

Con la idea de encontrar un modelo que fuera útil para determinar las concentraciones de Testosterona y Androstendiona en plasma a partir de los valores cuantificados en las heces fecales, trabajamos con un factor de estimación, que nombramos “Factor de estimación de la concentración hormonal que se encuentra en el plasma”, utilizando los valores promedios de las concentraciones de las heces fecales por EIA. Sin embargo, en este factor de estimación necesitaríamos forzosamente las concentraciones en plasma. Sin embargo, la posibilidad de encontrar un modelo predictivo, que a partir de la cantidad de hormona excretada en las heces fecales nos pudiera dar los valores de las concentraciones de Testosterona y Androstendiona en los plasmas de los hamsters bajo las diferentes condiciones experimentales, revisando la literatura encontramos que el modelo matemático

predictivo utilizado generalmente para ajustar dos variables que no son lineales pero que su relación es potencial, podía ser de gran utilidad para nuestros datos. Así, se observó que aplicando el modelo predictivo denominado “modelo potencial”, se obtienen los valores de plasma obtenidos por HPLC. Por lo tanto, aunque nuestros datos no son completamente lineales, el modelo potencial ajusta nuestras dos variables.

Con respecto a los datos obtenidos de la Conducta Sexual Masculina, observamos que la restitución de la conducta copulatoria de los sujetos castrados y tratados con los andrógenos coincide con lo descrito por otros autores (Lisk y Greenwald, 1983). Sin embargo, en la mayor parte de estos estudios se evalúan en conjunto los números totales de las respuestas de monta y de intromisión en registros con una duración de 10 ó 15 minutos. En nuestro estudio, al igual que otros realizados en nuestro grupo de trabajo, se evalúan registros de conducta copulatoria de 30 minutos, lo que nos permitió obtener una mayor información acerca del curso temporal en que suceden las respuestas copulatorias realizadas por los hamsters en las diferentes condiciones experimentales.

Por otro lado, observamos que el tratamiento con los andrógenos gonadales restituye la conducta sexual en los sujetos castrados, sin embargo la restitución de estos parámetros conductuales no fue inmediata, de tal forma que fue necesario la administración de los andrógenos por 21 días, sugiriendo un mecanismo de acción de estas hormonas a nivel genómico y no a nivel membranal, ya que la restitución de la conducta copulatoria fue un fenómeno paulatino, que requirió de varios días (21 días) para manifestarse, excluyendo la posibilidad de que el mecanismo de acción

a nivel de membrana esté involucrado en este tipo de respuestas. Además, se corrobora que la conducta copulatoria en el hámster requiere de hormonas gonadales para que se lleve al cabo, hecho que no sólo sucede en esta especie, sino también en otros roedores como la rata (Larsson, 1979; Hall, 1988). Sin embargo, la expresión de la conducta sexual en la rata se atribuye a la Testosterona y a sus metabolitos DHT y E₂ (Hull y Domínguez, 2007). En nuestro estudio, observamos que los hamsters castrados y tratados con Testosterona bajo dosis de 500 y de 1000µg, no fueron capaces de restituir todas las series copulatorias, por lo que no se presentaron las intromisiones largas, pues se sabe que se requiere de 9 ó 10 series copulatorias para que estas respuestas copulatorias se presenten (Bunnell y cols., 1979; Arteaga y cols., 2000). Sin embargo, si analizamos únicamente las primeras series copulatorias que corresponderían como a 15 minutos de registro, las conductas de monta, intromisión y de eyaculación son restituidas por Testosterona, datos que concuerdan con otros autores (Tiefer, 1969; Powers y cols., 1987, Wood y Newman., 1995), pero la conducta copulatoria en el hámster incluye las intromisiones largas. Estas conductas han sido poco analizadas, sin embargo se sugiere que son importantes para desencadenar los eventos neuroendocrinos correspondientes a la gestación en las hembras (Huck y Lisk, 1985).

Con respecto a los hamsters castrados y tratados con Androstendiona bajo dosis de 500 y 1000µg, nuestros resultados indican que esta hormona restituye todos los parámetros de la conducta sexual masculina en el hámster, incluyendo las intromisiones largas, lo que sugiere que este andrógeno podría estar jugando un

papel principal (tal vez más que la Testosterona) en la regulación hormonal de la conducta sexual del hámster (Arteaga-Silva y cols., 2005, Arteaga-Silva y cols., 2008). De tal forma, que este estudio abre la posibilidad de que otros andrógenos como la Androstendiona puedan ser responsables de regular el comportamiento reproductivo en diferentes especies de mamíferos.

Por otro lado, nuestros resultados aquí analizados, demuestran que la obtención de la concentración de hormonas en heces fecales es útil para indagar el estado reproductivo de una especie específica y profundizar en la participación de la Androstendiona en la regulación hormonal del comportamiento reproductivo, estimando las concentraciones plasmáticas a partir de las excretadas en las heces fecales. Además de relacionar los efectos que las hormonas sexuales ejercen a nivel central, reflejado en la ejecución de la conducta copulatoria, permitiéndonos contribuir con el conocimiento en la Biología Reproductiva y estableciendo semejanzas o diferencias con otros mamíferos con la posibilidad de que otros andrógenos participen en el comportamiento reproductivo.

XIX. CONCLUSIÓN

- ✓ La castración provoca la pérdida de las hormonas sexuales y con ello la nula excreción en las heces.
- ✓ La terapia hormonal reconstitutiva de Testosterona (T) y Androstendiona (A) aumenta la excreción de estas hormonas en las heces. Observándose una mayor cantidad de T, debido a la interconversión de A a T.
- ✓ La cantidad de T y A en plasma es mucho menor que la que se presenta en las heces fecales.
- ✓ Existen dos formas de predecir la concentración de plasma a partir de la concentración de Testosterona y Androstendiona en heces fecales, por medio del Modelo Potencial ($P=B_0H^{B^1}$) y por medio del Coeficiente ó factor de estimación.
- ✓ La Androstendiona en dosis de 1000 μ g restituye todos los parámetros de la conducta copulatoria en el hámster, incluyendo las intromisiones largas, no así la Testosterona.
- ✓ La Androstendiona y no la Testosterona juega un papel principal en el comportamiento reproductivo de esta especie y que incluso la Androstendiona podría regular el comportamiento reproductivo en otras especies de mamíferos.

XX. REFERENCIAS

Adlercreutz, H and Martin, F. (1980). Biliary excretion and intestinal metabolism of progesterone and estrogens in man. *J. Steroid. Biochem.* 13: 231-244.

Aranyi, P. (1983). Activation and Deactivation of the Glucocorticoid Hormone-Receptor Complex. *Eur. J. Biochem.* 129: 549-554.

Arteaga, M., and Moralí, G. (1997). Characteristics of motor and genital copulatory responses of the male hamster. *J. Physiol. (Paris)* 91:311-316.

Arteaga, M., Motte-Lara, J., Velázquez-Moctezuma, J. (2000). Temporal pattern of recovery from sexual satiety in male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Physiol. Behav.* 68:591-594.

Arteaga-Silva, M., Márquez-Villanueva, Y., Martínez-García, R., Hernández-González, M., Bonilla-Jaime, H., Retana-Marquez, S. (2005). Effects of hormonal replacement with androgens and estrogens on male sexual behavior and plasma levels in gonadectomized golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Physiol. Behav.* 85:571-580.

Arteaga-Silva, M., Viguera R., Retana S., Hernández M., Chihuahua C., Bonilla H., Contreras J., Moralí G. (2008). Testosterone, Androstendione and 5 α -dihydrotestosterone on male sexual behavior and penile spines in the hamster. *Physiol. Behav.* 10: 1-10.

Arteaga-Silva, M., Viguera-Villaseñor, R.M., Bonilla-Jaime, H., Retana-Márquez, M.S., Guzmán-García, X., Muñoz-Gutiérrez, M., Hernández-González, M. (2009). Expresión de receptores a andrógenos y estrógenos después de la castración y restitución hormonal en el hámster dorado. Pp. 399-426. En: Guevara-Pérez, M.A., Contreras- Gómez, A., Arteaga-Silva, M.A., Bonilla-Jaime, H., Hernández-González,

M. (Eds). Aproximaciones al estudio de la neurobiología conductual. Ediciones de la noche. México.

Asa, C.S. (1996). Reproductive physiology. Pp. 390-417. En: Kleiman, D.G, M.E. Allen, K.V. Thompson y S. Lumpkin (Eds.) *Wild mammals in captivity*. Chicago Press. Chicago, EUA.

Ballou, J.D. and T.J. Foose. (1996). Demographic and genetic management of captive populations. Pp. 263-283. En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson and S. Lumpkin (Eds.) *Wild mammals in captivity*. Chicago Press. Chicago, EUA.

Beach, F.A. (1940). Effects of cortical lesions upon the copulatory behavior of male rats. *J. Comp. Psychol.* 29: 193-245.

Beach, F.A. (1944). Relative effects of androgen upon the mating behavior of male rats subjected to forebrain injury or castration. *J. Exp. Zool.* 97: 249-295

Beach, F.A. and Holtz, A.M. (1946). Mating behavior in male rats castrated at various ages and injected with androgen. *J. Exp. Zool.* 101: 91-42.

Beach, F.A. (1967). Cerebral and hormonal control of reflexive mechanism involved in copulatory behavior. *Physiol. Psychol.* 52: 56-61.

Beach, F.A. (1970). Coital behavior in dogs. VI. Long-term effects of castration upon mating in the male. *J. Physiol. Psychol.* 70. 1-32

Beato, M. (1996). Chromatin structure and the regulation of gene expression: remodeling at the MMTV promoter. *J Mol Med.* 74 (12) 711-24.

Beato, M. and Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: An update. *Hum Reprod Update* 6:255-236.

Bookhout, T.A. (1996). *Research and Management Techniques for Wildlife and Habitats*. Pp 1256. Wildlife Society. Maryland, EUA.

Broom, D.M. (1988). The scientific assessment of animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 20:5-19.

Bunnell, B.N., Boland, B. D., Dewsbury, D. A. (1976) Copulatory behavior of golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Behav.* 61:180-206.

Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the map kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15: 2174-2183.

Buenrostro, A., Gallina, S. y Sánchez-Rojas, G. (2004). Diferencias en la calidad de la dieta de venado cola-blanca (*Odocoileus virginianus mexicanus*) determinadas por concentraciones de nitrógeno fecal. XXI Simposio sobre Fauna Silvestre “Gral. MVZ. Manuel Cabrera Valtierra”, del 24-26 de nov. 2004. Colima Col. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM.

Caggiula, A.R. and Szechtman, H. (1972). Hypotalamic stimulation: a biphasic influence on copulation of the male rat. *Behav. Biol.* 7: 591-598.

Carlstead, K., J.L. Brown., Strawn, W. (1993). Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 38:143–158.

Carlstead, K. (1996). Effects of captivity on the behavior of wild mammals. Pp. 317-333. *En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson & S. Lumpkin (Eds.) Wild mammals in captivity*. Chicago Press. Chicago, EUA.

Cockrem, J E. and Rounce, J. R. (1994). Fecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation on plasma steroid concentrations in the domestic fowl. *British Poultry Sci.* 35: 433-443.

Cooperrider, A.Y. (1986). Food habits. Pp. 699-710. *En: Cooperrider AY., R.J. Boyd y H.R.Stuart (Eds.). Inventory and monitoring of wildlife habitat*. U.S. Department of the Interior-Bureau of Land Management. Colorado, EUA.

Civitel, I R., Kim, Y S., Gunsten, S. L., Fujimori. A., Huskey, M., Avioli, L. V., Hruska, K. A. (1990). Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells. *Endocrinol.* 127; 2253-2262.

Chellini, M.O.M., Souza, N.L., Rocha, A.M., Felipe, E.C.G., Oliveira, C.A., (2005). Quantification of fecal estradiol and progesterone metabolites in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*), *Brazilian J. Med. Biol. Res.*38. 1711-1717.

Christensen, L.W., Coniglio, L.P., Paup, D.C., Clemens, L.G. (1973). Sexual behavior of male golden hamsters receiving diverse androgen treatments. *Horm. Behav.* 4:223-229.

Davis, D.E. and Winstead, R. L. (1980). Estimating the numbers of wildlife populations. Pp.221-246. *En: Schemnitz, S.D. (Ed.). Wildlife management techniques manual*. The Wildlife Society. Washington, D.C. EUA.

De Boland, A.R. and Norman, A.W. (1990). Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcalcemia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport). *Endocrinol.* 127: 2475-2480.

Devor, M. (1973). Components of mating dissociated by lateral olfactory tract transection in male hamsters. *Brain. Res.* 64: 437-441.

Dewsbury, D.A. (1979). Description of sexual behavior in research on hormone behavior interactions. En: *Endocrine control of sexual behavior*. C. Beyer (Ed). Raven Press, New York, Pp 3-32.

Dobson, H. and Smith, R.F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim.Reprod. Sci.* 61: 743–752.

Doty, R.L., Carter, C.S., Clemens, L.G. (1971). Olfactory control of sexual behavior in the male and early androgenized female hamster. *Horm. Behav.*, 2: 325-335.

Ezcurra, E. and Gallina, S. (1981). Biology and populations dynamics of White-tailed deer in northwestern Mexico. Pp. 77-108. En: Folliot P.F. and S. Gallina (Eds.). *Deer biology, habitat requirements, and management in western North America*. Instituto de Ecología, A. C. México.

Falkenstein, E., Tilmann, H.C., Christ, M. Feuring, M., Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones-A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 52; 513-555.

Feder, H. H. (1971). The comparative action of testosterone propionate and 5^α-androstan-17β-I-3-one propionate on the reproductive behavior, physiology and morphology of male rats. *J. Endocrinol.* 51: 242-252

Floody, O.R. and Pfaff, D.W. (1997). Communication among hamsters by high-frequency acoustic signals. II, Determinants of calling by females and males. *J.Comp. Physiol. Psychol.* 91: 807-819.

Fuller, P.J. (1991). The steroid receptor superfamily: Mechanisms of diversity *FASEBJ.* 3092-3099.

Gao, W., Wu, Z., Bohl, E.C., Yang, J., Miller, D.D., Dalton, T.J., (2005), Characterization of the in vitro metabolism of selective androgen receptor modulator using human, rat, and dog liver enzyme preparations, *Drug metabolism and disposition.* 34: 243-252.

Garza, F.J., Díaz, S.V., Vásquez, A.S., Brandels, A., Romero, C. (1996). El radioinmunoanálisis y su control de calidad. México. Pp.1-81.

Gore-Langton, R.E and Armstrong, D.T. (1994) Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil, E.y Neill, JD (Eds.), *The physiology of reproduction.* Raven Press, New York. Pp 571-613.

Goymann, W. (2005). Noninvasive of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Ann NY Acad Sci.* 1046: 35-53.

Graham, S. (1996). Issues of surplus animals. Pp. 290-296. *En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson y S. Lumpkin (Eds.) Wild mammals in captivity.* Chicago Press. Chicago, EUA.

Hall, P.F. (1988). Testicular steroid synthesis: Organization and regulation In: *The Physiology of Reproduction.* Pp. 975-998 En: E. Knobil and J. Neill (Eds) Raven.

Harper, J.M. and Austad, S.N. (2000). Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Phys. Biochem. Zool.* 73 (1): 12-22

Heimer, L. and Larsson, K. (1966). Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic anterior hypothalamic continuum. *Brain. Res.* 3: 248-263.

Heistermann, M. E. Möstl, J., Hodges, K. (1995). Non-invasive endocrine monitoring of female reproductive status: methods and applications to captive breeding and conservation of exotic species. Pp. 36-48. *En: Gauslophe, A., J.K. Hodges, W. Kaumanns (Eds.) Research and captive propagation.* Filander Verlag GmbH Erlanger. Finlandia.

Hodges, J.K. (1996). Determining and manipulating female reproductive parameters. Pp. 418-428. *En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson y S. Lumpkin (Eds.) Wild mammals in captivity.* Chicago Press. Chicago, EUA.

Hull, E.M. and Dominguez, J.M., (2007). Sexual Behavior in male rodents. *Horm Behav.* 52 (1):45-55.

Huck, U.W. and Lisk, R.D., (1985). Determinants of mating success in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): I. Male Capacity. *J.Comp. Psychol.* 99(1): 98-107.

Keveter, G.A. and Winans, S.S. (1981). Efferents of the corticomедial amygdale. *J. Comp. Neurol.* 197: 81-98.

Kling, A. (1968). Effects of amygdectomy and testosterone on sexual behavior of male juvenile macaques. *J.Comp. Physiol. Psychol.* 65(3); 466-71.

Korschgen, L.J. (1980). Procedures for food habits analysis. Pp. 113-128. *En: Schemnitz, S.D.(Ed.). Wildlife management techniques manual*. The Wildlife Society. Washington, D.C.EUA.

Kow, L.M., Malsbury, C.W., Pfaff, D.W. (1976). Lordosis in the male golden hamster elicited by manual stimulation. Characteristics and hormonal sensitivity. *J.Comp., Physiol. Psycho.* 90: 26-40.

Lancia, R.A., Nichols, J.D., Pollock, K.H. (1996). Estimating the number of animals in wildlife populations. Pp. 215-253. *En: Bookhout, T.A. (Ed.). Research and Management Techniques for Wildlife and Habitats*. Wild life Society. Maryland, EUA.

Landsman, T. and Waxman, D.J. (2005). Role of the Cytokine-induced SH2 Domaincontaining Protein CIS in Growth Hormone Receptor Internalization. *J. Biol. Chem.* (45): 471-480.

Larsson, K (1979). Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. Pp. 77-163 In: *Endocrine Control of Sexual Behavior*. C. Beyer (Ed) Raven Press, New York.

Lasley, B.L. and Kirkpatrick, J.F. (1991). Monitoring ovarian function in captive and free ranging wild life by means of urinary and fecal steroids. *J. Zool. Wildl. Med.* 22: 23-31

Lasley, B.L. (1985). Methods for evaluating reproductive function in exotic species. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 30: 209-228.

Lehman, M.N., Winans, S.S., Powers, J.B. (1980). Medial nucleus of the amygdale mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science.* 210: 557-560.

Lehman, M.N., Powers, J.B., Winans, S.S. (1983). Stria terminalis lesions alter the temporal pattern of copulatory behavior in the male golden hamster. *Behav. Brain Res.* 8: 109-128.

Lehman, M.N. and Winans, S.S. (1983). Evidence for a ventral non strial pathway from the amygdale to the bed nucleus of the stria terminalis in the male golden hamster. *Brain Res.* 268: 139-146.

Lisk, R.D. and Bezier, J.L. (1980). Intrahypothalamic hormone activation of sexual behavior in the male hamster. *Neuroendocrinol.* 30:220-227.

Lisk, R.D. and Greenwald, D.P. (1983). Central plus peripheral stimulation by androgen is necessary for complete restoration of copulatory behavior in the male hamster. *Neuroendocrinol.* 36:211-217.

Loskutoff, N.M., Ott, J.E., Lasley, B.L. (1983). Strategies for assessing ovarian function in exotic species. *J. Zoo Anim. Med.* 14: 3-12.

Loza, A. M.C., Lemus, E.A. y Pérez, P.G., (1988), Metabolismo de Hormonas Esteroides. Pp.53-92. En: Hicks, J.J. y Díaz, Z.J. Bioquímica e Inmunología. edit. Piensa S.A de C.V, México, D.F.

Malsbury, C.W. (1971). Facilitation of male rat copulatory behavior by electrical stimulation of the medial preoptic area. *Physiol. Behav.* 7: 797-805.

Mandujano, S. and Gallina, S. (1995). Comparison of deer censusing methods in tropical dry forest. *Wildlife Soc. B.* 23 (2): 180-186.

Mc Gill, T.E. and Haynes, C.M. (1973). Heterozygosity and retention of ejaculatory reflex after castration in male mice. *J. Comp., Physiol. Psychol.* 84: 423-429

McNabb, F.M.A. (2004). Avian thyroid development and adaptive plasticity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147: 93–101.

Meisel, R.I. and Sachs, B.D. (1994). The Physiology of Male Sexual Behavior. En: The physiology of reproduction. Knobil, E. y J. Neill y Cols., (Eds). Raven Press, Ltd. New York. Pp 3-105.

Michael, R.P. and Wilson, M. (1974). Effects of castration and hormone replacement in fully adult male Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinol.* 95: 150-159

Mills, M.G.L. (1996). Methodological advances in capture, census, and food-habits studies of large African carnivores. Pp. 223-242. En: J.L. Gittleman (Ed). *Carnivore behavior, ecology and evolution* (vol. 2). Cornell Univ. Press. Nueva York, EUA.

Millsaugh, J.J., Woods, R.J., Hunt, K.E., Raedeke, K.J., Brundige, G.C., Washburn, B.E., Wasser, S.K. (2001). Using fecal glucocorticoid assays to study the physiological stress response of elk. *Wildlife Soc. B.* 29: 899–907.

Millsaugh, J.J., Washburn, B.E., Milanick, M.A., Beringer, J., Hansen, L.P., Meyer, T.M. (2002). Noninvasive techniques for stress assessment in white-tailed deer. *Wildlife Soc. B.* 30: 899–907.

Mogenson, G.J., Janes, D.L., Yim, L.Y. (1980). Functional interfase between the limbic system and the motor system. *Prog. Neurobiol.* 14: 69-97.

Mogenson, G.J. and Yong, C.R. (1991). The contribution of basal forebrain to limbic-motor integration and the mediation of motivation to action. *Adv. Exp. Med. Brain.* 295: 267-290.

Möstl, E. and R. Palme. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrin.* 23: 67–74 (Número especial).

Murphy, M.R. and Schneider, G.E. (1970). Olfactory bulb removal eliminates mating behavior in the golden hamster. *Science.* 167: 302-304.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Naoki, K., Gómez, M.I., López, P.R., Meneses, I.K., Vargas, J. (2006). Comparación de Modelos de Distribución de Especies para predecir la distribución potencial de vida silvestre en Bolivia. *Ecología en Bolivia.* 41(1): 65-78.

Noble, R.G. (1979)a. The sexual responses of the female hamster. A descriptive analysis. *Physiol. Behav.* 23: 1001-1005.

Noble, R.G. (1979)b. Limited coital stimulation facilitates sexual responses of the female hamster. *Physiol. Behav.* 23:1007-1010

Nogueira, G.P and Silva, J.C.R. (1997). Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restraint. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 30: 1359-1361.

Nordeen, S.K, Moyer, M.L, Bona, B.J. (1994). The coupling of multiple signal transduction pathways with steroid response mechanisms. *Endocrinology.* 134 (4): 1723-32.

Norman, A.W. and Litwack, G. (1987). Hormones. Acad. Press. Orlando, EUA. Pp.345

Olson, D.M. and Dinerstein, E. (1988). The global 200: a representation approach to conserving the earth's most biologically valuable ecoregions. *Conservation Biology* 12: 502-515.

Ortiz-Martínez, T., Gallina, S., Briones-Salas, M., González, G. (2005). Densidad poblacional y caracterización del hábitat del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus oaxacensis*, Goldman y Kellog, 1940) en un bosque templado de la sierra norte de Oaxaca, México. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 21(3): 65-78.

Perera, M., Yin, D., Wu, D., Chan, K.K., Miller, D.D., Dalton, J. (2006). In vivo metabolism and final disposition of a novel nonsteroidal androgen in rats and dogs. *Drug Metab Dispos* 34 (10):17 13-21.

Pérez-Mejía, S., Mandujano, S., Martínez-Romero, L.E. (2004). Tasa de defecación del venado cola blanca, *Odocoileus virginianus mexicanus*, en cautiverio en Puebla, México. *Acta Zool. Mex. (ns)*: 167-170.

Peter, A.T., Crister, J.K., Kapustin, N. (1996). Analysis of sex steroid metabolites excreted in the feces and urine of nondomesticated animals. *Compendium* 18 (7): 781-792.

Pfaff, D. and Keiner, M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp., Physiol. Psychol.* 151: 121-128.

Phillips-Farfán, BV., Romano- Torres M, Fernández- Guasti, A. (2008) *Pharmacology Biochemistry Behavior.* 89 (3): 241-6.

Phoenix, C.H., Slob, A.K., Goy, R.W. (1973). Effects of castration and replacement therapy on sexual behavior of male juvenile macaques. *J.Comp. Physiol. Psychol.* 65(3):466-71.

Powers, J.B., Newman, S.W., Bergondy, M.L. (1987). MPOA and BNST lesions in male Syrian hamsters: Differential effects on copulatory and chemoinvestigatory behaviors. *Behav. Brain. Res.* 23: 181-195.

Ray, J.C. and Sunkuist, M.E. (2001). Trophic relations in a community of African rainforest carnivores. *Oecologia* 127: 395-408.

Robinson, M.H. (1996). The BioPark concept and the exhibition of mammals. Pp 161-166. *En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson y S. Lumpkin (Eds.) Wild mammals incaptivity.* Chicago Press. Chicago, EUA.

Romeo, R.D., Cook-Wiens, E., Richardson, H.N., Sisk, C.L. (2001). Dihydrotestosterone activates sexual behavior in adult male hamsters but no in juveniles. *Physiol Behav.* 73 (4): 579-84.

Rosenblatt, J.S. and Aronson, L.R. (1958). The decline of sexual behavior in male cats after castration with special reference to the role of prior sexual experience. *Behav.* 12. 258-338.

Sánchez-Rojas, G. and Gallina, S. (2000). Mule deer (*Odocoileus hemionus*) density in a landscape element of the Chihuahuan Desert, Mexico. *J. Arid Environ.* 44: 357-368.

Sar, M. and Stumpf, W.E. (1973). Autoradiographic localization of radioactivity in the rat brain after injection of 1,2-H-Testosterone, *Endocrinol.* 92: 251-256.

Seidensticker, J. and Doherty, J.G. (1996). Integrating animal behavior and exhibit design. Pp.180-190. *En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson & S. Lumpkin (Eds.) Wildmammals in captivity*. Chicago Press. Chicago, EUA.

Sechrest, W., Brooks, T.M., da Fonseca, G.A.B., Konstant, W.R., Mittermeier, C.G., Purvis, A., Rylands, A.B., Gittleman, J. L. (2002). Hotspots and the conservation of evolutionary history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2067-2071.

Shideler S.E., Ortuño, A.M., Morán, F.M., Morrman, E.A., Lasley, B.L., (1993). Simple Extraction and Enzyme Immunoassays for Estrogen and Progesterone Metabolites in the Feces of *Macaca fascicularis* during Non-Conceptive and Conceptive Ovarian Cycles. *Biol. Reprod.* 48: 1290-1298.

Shik, M.L., Severin, F.V., Orlovsky, G.N. (1966). Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. *Biophysics.* 11:756-765.

Siiteri, P.K. (1981). Extraglandular oestrogen formation and serum binding of oestradiol: relationship to cancer. *J. Endocrin.* 89: 11-129.

Sturkie, P.D. (1968). *Avian Physiology*. Comstock Publisher Association.

Sylvia, V.L, Schwartz, Z., Schuman, L., Morgan, R.T., Mackey, S., Gomez, R., Boyan, B.D. (1993). Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D3 metabolites in chondrocyte cultures. *J Cell Physiol.* 157(2): 271-8.

Tiefer, L. (1969), Copulatory Behavior of male *Rattus norvegicus* in a multiple – female exhaustion test. *Anim Behav.* 17 (4): 718-21.

Touma, C., Sachser, N., Mostl, E., Palme, R. (2003). Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen. Comp. Endocrin.* 130: 267-278.

Valenstein, E.S. and Goy, R.W. (1957). Further studies of the organization and display of sexual behavior in male guinea pigs. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 50. 115-119.

Verrey, F. (1998). Early aldosterone effects. *Exp Nephrol.* 6:294-301.

Von der Ohe, C.G. and Servheen, C. (2002). Measuring stress in mammal using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges. *Wildlife Soc. B.* 30 (4): 1215-1225

Warren, R.P. and Aronson, L.R. (1957). Sexual behavior in adult male hamsters castrated-adrenalectomized prior to puberty. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 50. 475-480.

Wasser, S.K., Hunt, K., Brown, J., Cooper, K., Crockett, C., Bechert, U. Millespaugh, J., Larson, S., Monfort, S. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 23(3) (2007)array of non-domestic mammalian and avian species. *Gen. Comp. Endocrin.* 120: 260-275.

Wehling, M., Käsmayr, J., Theisen, K. (1990). Aldosterone influences free intracellular calcium in human mononuclear leukocytes in vitro. *Cell Calcium* 11(9): 565-71.

Wehling, M., Bauer, M.M., Ulsenheimer, A., Schneider, M., Neylon, C.B., Christ, M. (1996). Nongenomic effects of aldosterone on intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 223(1): 181-6.

Whalen, R.E. and Luttge, W.G. (1971). Testosterone, androstenedione and dihydrotestosterone effects on mating behavior of male rats. *Horm. Behav.* 2:117-125.

Whalen, R.E. and DeBold, J. (1974). Comparative effectiveness of testosterone, androstenedione and dihydrotestosterone in maintaining mating behavior in the castrated male hamster. *Endocrinol.* 95:1674-1679.

Wildt, D.E. (1996). Male reproduction: assessment, management and control of fertility. Pp.429-450. *En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson & S. Lumpkin (Eds.) Wildmammals in captivity.* Chicago Press. Chicago, EUA.

Wielebnowski, N.C., Fletchall, N., Carlstead, K., Busso, J.M., Brown, J.L. (2000). Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biol.* 21: 77–98. Asa, C.S. 1996. Reproductive physiology. Pp. 390-417. *En: Kleiman, D.G., M.E. Allen, K.V. Thompson y S. Lumpkin (Eds.) Wild mammals in captivity.* Chicago Press. Chicago, EUA.

Wilson, R.I. (1996). Integration of chemosensory and hormonal input in the male Syrian hamster brain, en *Annals of the New York Academy of Sciences*, 30: 362-372, New York.

Winans, S.S. and Powers, J.B. (1977). Olfactory and Vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brian Res.* 126 (2):325-44.

Wood R.I. and Newman S.W. (1997). The medial amygdaloid nucleus and medial preoptic area mediate steroidal control of sexual behavior in the male Syrian hamster. *Horm. Behav.* 29:338-353

Wood, R.I. (1996). Estradiol, but not Dihydrotestosterone, in the medial amygdala facilitates male hamster sex behavior. *Physiol. Behav.* 59:833-841.

Wood, R.I. (1998). Integration of chemosensory and hormonal input in the male syrian hamster brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 30:362-372.

Woodward, C.J. and Emery, P.W. (1987). Determination of plasma corticosterone using high-performance of chromatography. *J.Chromatogr.* 419:280-284.

Ziegler, T.E., Scheffler, G., Snowdon, C.T. (1995). The relationship of cortisol levels to social environment and reproductive functioning in female cotton-top tamarins, *Saguinusoedipus*. *Horm. Behav.* 29: 407-424.

Ziegler T.E. and Witter J.D., (2005), Fecal Steroid Research in the Field and Laboratory: Improved Methods for Storage, Transport, Processing and Analysis. *Amer. J. Primatol.* 67: 159-174.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis que presentó

TANIA ARELLANO LEZAMA

El día 3 de Diciembre del año 2009

Comité Tutorial:

Presidente: Dr. Miguel Ángel Armella Villalpando



Secretario: Dr. Manuel Arnoldo Castillo Rivera



Vocal: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor



Vocal: Dra. Marisela Hernández González

