



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

“EXPRESIÓN DE LOS GENES *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* HIPOTALÁMICOS EN
RATAS MACHO CON RETRASO EN LA PUBERTAD POR EXPOSICIÓN A
CADMIO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL
P R E S E N T A:
BIÓL. EDUARDO MIGUEL CORNEJO DE LA CONCHA.

CODIRECTORA:
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA.

CODIRECTORA:
DRA. MARGARITA DOLORES CHÁVEZ SALDAÑA.

ASESOR:
DR. SERGIO MONTES LÓPEZ.

CIUDAD DE MÉXICO.

ENERO DE 2022.

COMITÉ DE TUTORES:

CODIRECTORA

Doctora Marcela Arteaga Silva.

Departamento de Biología de la Reproducción.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

asm@xanum.uam.mx

CODIRECTORA

Doctora Margarita Dolores Chávez Saldaña.

Laboratorio de Biología de la Reproducción.

Instituto Nacional de Pediatría.

mdoloreschs@gmail.com

ASESOR

Doctor Sergio Montes López.

Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán.

Universidad Autónoma de Tamaulipas.

montesergio@yahoo.com

MIEMBROS DEL JURADO:

PRESIDENTA

Doctora Rosa María Viguera Villaseñor.
Laboratorio de Biología de la Reproducción.
Instituto Nacional de Pediatría.
rmviguera@yahoo.com.mx

SECRETARIO

Doctor Iván Uriel Bahena Ocampo.
Departamento de Ciencias de la Salud.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.
Ivan.bahena@gmail.com

VOCAL

Doctor Sergio Montes López.
Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán.
Universidad Autónoma de Tamaulipas.
montesergio@yahoo.com

VOCAL

Doctor Daniel Adrian Landero Huerta.
Laboratorio de Biología de la Reproducción.
Instituto Nacional de Pediatría.
gdanielfadrianb@hotmail.com

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro: 003797.

Para la realización de sus estudios de maestría, el alumno Cornejo de la Concha Eduardo Miguel, contó con el apoyo económico de la Beca Nacional de Posgrado del CONACYT, con número: 754344; y número de Currículum *Vitae* Único (CVU): 1012496.

El presente trabajo fue realizado en:

- Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Proyecto aprobado por la DCBS UAM-I. Número de proyecto: CD.CBS.535.2018. Responsable: Dra. Marcela Arteaga Silva.
- Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría. Proyecto aprobado por la Dirección de Investigación y registrado con el número 2020/063 por el Comité de Investigación. Financiamiento de Fondos Federales del Programa E-022 del Instituto Nacional de Pediatría.
- Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Unidad de Manejo de Animales para Docencia e Investigación (UMADI) de la DCBS de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Declaración de originalidad

El que suscribe Eduardo Miguel Cornejo de la Concha, alumno de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* hipotalámicos en ratas macho con retraso en la pubertad por exposición a cadmio”.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autora! y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 12 de diciembre de 2021.



Eduardo Miguel Cornejo de la Concha.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. PUBERTAD	14
2.1.1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada	17
2.2. REGULACIÓN NEURAL DE LA PUBERTAD	21
2.2.1. Kisspeptina (<i>Kiss1</i>)	23
2.2.2. Receptor de kisspeptina (<i>Kiss1r</i>)	28
2.2.3. Hormona liberadora de gonadotropinas (<i>GnRH</i>)	30
2.3. REGULACIÓN GÉNICA DE LA PUBERTAD	32
2.4. DESARROLLO E INDICADORES DE PUBERTAD EN LA RATA MACHO	33
2.5. PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN Y EXPOSICIÓN AL CADMIO	34
2.6. TOXICIDAD DEL CADMIO	35
2.7. CADMIO Y PUBERTAD	38
3. JUSTIFICACIÓN	39
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVOS	40
5.1. OBJETIVO GENERAL	40
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	41
6.2. SUJETOS EXPERIMENTALES	42
6.3. TRATAMIENTO	43
6.4. ASIGNACIÓN DE GRUPOS Y ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO	44
6.5. SEPARACIÓN PREPUCIAL	44
6.6. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS SOMATOMÉTRICOS	45
6.7. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HIPOTÁLAMO	46
6.8. DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA EN SUERO SANGUÍNEO	46
6.9. CUANTIFICACIÓN DE Cd EN EL HIPOTÁLAMO	48
6.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE LOS GENES <i>Kiss1</i> , <i>Kiss1r</i> Y <i>GNRH1</i>	48
6.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
7. RESULTADOS	50
7.1. SEPARACIÓN PREPUCIAL	50
7.2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS SOMATOMÉTRICOS	51
7.3. CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA EN SUERO SANGUÍNEO	54
7.4. CUANTIFICACIÓN DE Cd EN EL HIPOTÁLAMO Y SANGRE	55

7.5. EXPRESIÓN RELATIVA DEL MRNA DE LOS GENES <i>Kiss1</i> , <i>Kiss1R</i> Y <i>GNRH1</i> -----	56 -
8. DISCUSIÓN-----	58 -
9. CONCLUSIÓN-----	74 -
10. BIBLIOGRAFÍA -----	75 -

RESUMEN

La exposición a contaminantes ambientales como los metales pesados, afectan a la salud reproductiva del ser humano. El cadmio (Cd), es un metal pesado ampliamente utilizado en las industrias, lo que facilita su incorporación al medio ambiente y a la cadena alimenticia. La exposición ocupacional y ambiental a este metal incrementan el riesgo de padecer enfermedades en el ser humano, incluso, en edades tempranas. Se ha reportado que la pubertad es altamente sensible al Cd, provocando su retraso, la disminución de las concentraciones de testosterona (T), hipogonadismo, entre otras alteraciones. El eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) es el responsable del inicio de la pubertad y algunos de los genes determinantes e indispensables en la activación de este eje, y en el mantenimiento de la actividad reproductiva, son *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1*, que codifican para Kisspeptina, su receptor y para la hormona liberadora de gonadotropinas, respectivamente. Aunque los efectos del Cd han sido ampliamente estudiados en el testículo, hay pocos estudios que determinen el efecto del Cd en el hipotálamo y en los niveles de expresión de genes implicados con la pubertad. **Objetivo.** Evaluar la expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* hipotalámicos en ratas macho con retraso en la pubertad por exposición a cadmio. **Métodos.** Ratas macho fueron divididas al azar en cuatro grupos: dos grupos experimentales, tratados semanalmente con 1.0 mg/Kg de CdCl₂ por vía intraperitoneal (ip), desde el día posnatal (DPN) 1, hasta el DPN 35 y 49, respectivamente; y dos grupos control tratados semanalmente con 100 µL de solución salina por vía ip desde el DPN 1, hasta el DPN 35 y 49, respectivamente; se registró el peso corporal y la talla, la separación prepuberal (SP) se observó como indicador de inicio de la pubertad. Al término del tratamiento se aplicó eutanasia y se disecaron el hipotálamo y testículo. En hipotálamo, se evaluó la expresión génica de *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* mediante RT-qPCR y se cuantificó Cd con espectrofotometría de absorción atómica, con los testículos y el peso corporal se determinó el índice gonadosomático. Además, se colectaron

muestras de sangre para la cuantificación de Cd con espectrofotometría de absorción atómica y de T mediante *ELISA*. **Resultados.** Se confirmó el retraso de la pubertad causado por el Cd; la expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* disminuyó en los sujetos experimentales tratados con Cd, principalmente en los de mayor edad. **Conclusión.** La exposición postnatal al Cd reguló a la baja la vía *Kiss1-Gnrh1* hipotalámica, lo que apoya o confirma molecularmente el retraso en la pubertad confirmado por la SP y las bajas concentraciones de T.

ABSTRACT

The exposure to environmental pollutants such as heavy metals affect human reproductive health. Cadmium (Cd) is a heavy metal widely used in industries, which facilitates its incorporation into the environment and into the food chain. The occupational and environmental exposure to this metal increases the risk of disease in humans, even at an early age. Puberty has been reported to be highly sensitive to Cd, causing its delay, decreased testosterone (T) concentrations, hypogonadism, among other alterations. The hypothalamic-pituitary-gonad axis (HPG) is responsible for the onset of puberty and some of the determining and essential genes in the activation of this axis, and in the maintenance of reproductive activity, are *Kiss1*, *Kiss1r* and *Gnrh1*, which they code for kisspeptin, kisspeptin receptor, and for gonadotropin-releasing hormone, respectively. Although the effects of Cd have been extensively studied in the testis, there are few studies that determine the effect of Cd on the hypothalamus and on the expression levels of genes involved with puberty. **Objective.** To evaluate the expression of the hypothalamic *Kiss1*, *Kiss1r* and *Gnrh1* genes in male rats with delayed puberty due to cadmium exposure. **Methods.** Male rats were randomly divided into four groups: two experimental groups, treated weekly with 1.0 mg/Kg of CdCl₂ intraperitoneally (ip), from postnatal day (PND) 1, to PND 35 and 49, respectively; and two control groups treated weekly with 100 µL of

saline solution ip from PND 1, to PND 35 and 49, respectively; Body weight and height were recorded, the preputial separation (PS) was observed as an indicator of the onset of puberty. At the end of the treatment, euthanasia was applied, and the hypothalamus and testis were dissected. In the hypothalamus, the gene expression of *Kiss1*, *Kiss1r* and *Gnrh1* was evaluated by RT-qPCR and Cd was quantified with atomic absorption spectrophotometry, with the testes and body weight the gonadosomatic index was determined. In addition, blood samples were collected for the quantification of Cd with atomic absorption spectrophotometry and of T by ELISA. **Results.** The delay in puberty caused by Cd was confirmed; the expression of the *Kiss1*, *Kiss1r* and *Gnrh1* genes decreased in the experimental subjects treated with Cd, mainly in the older ones. **Conclusion.** Postnatal exposure to Cd down-regulated the hypothalamic *Kiss1-Gnrh1* pathway, which supports or confirms molecularly the delayed puberty confirmed by PS and low concentrations of T.

ABREVIATURAS

AG	Acicalamiento genital
ARC	Núcleo arcuato
As	Arsénico
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular
BPA	Bisfenol A
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
CdCl₂	Cloruro de cadmio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ct	Ciclo umbral
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DPN	Día posnatal
Dyn	Dinorfina
E2	Estradiol
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Eminencia media
EPE	Erecciones peneanas espontáneas
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GSH	Glutación
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
Hg	Mercurio
HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
HHT	Eje hipotálamo-hipófisis-testículo
ip	Intraperitoneal

IP3	Inositol trifosfato o 1,4,5-trifosfato
KNDy	Neurona kisspeptina-neuroquinina-dinorfina
Kp	Kisspeptina
Lep	Leptina
LH	Hormona luteinizante
MeA	Amígdala media
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MT	Metalotioneínas
NKB	Neuroquinina B
P4	Progesterona
Pb	Plomo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEN	Núcleo periventricular
POA	Área preóptica
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP3V	Región periventricular rostral del tercer ventrículo
RT	Retrotranscripción
SD	Desviación estándar
SNC	Sistema nervioso central
SP	Separación prepucial
SPN	Semana posnatal
T	Testosterona
TH	Tirosina hidroxilasa
Zn	Zinc

1. INTRODUCCIÓN

Todos los mamíferos placentarios presentan un periodo de maduración somática y sexual entre la etapa juvenil y la etapa adulta, que inicia con el incremento de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo, este periodo se denomina pubertad (Stoker y cols., 2000; Sánchez-Garrido y Tena-Sempere, 2013; Abreu y Kaiser, 2016) y es una etapa crítica en el desarrollo, donde se alcanza la capacidad reproductiva (Stoker y cols., 2000). La existencia e influencia de factores externos e internos pueden modificar el inicio y el curso de la pubertad (Castellano y Tena-Sempere, 2017).

En los últimos años, los problemas de salud reproductiva se han incrementado drásticamente, en parte debido al agravamiento de la contaminación ambiental (Zhang y cols., 2019), a consecuencia del uso indiscriminado de contaminantes industriales. Los metales pesados como plomo (Pb), mercurio (Hg), arsénico (As) y cadmio (Cd), entre otros, son de los contaminantes medioambientales más extendidos y la exposición de los sistemas biológicos a estos metales puede provocar estrés oxidante, daño al DNA, modificación de proteínas, peroxidación de lípidos, entre otros (Wu y cols., 2016). El Cd es ampliamente utilizado en las actividades industriales antropogénicas (Bimonte y cols., 2021; Zhang y Reynolds, 2019; Wu y cols., 2017) y es uno de los contaminantes más comunes en los suelos, el agua y el aire (Tian y cols., 2018); razón suficiente para encontrarnos expuestos desde etapas tempranas de la vida (Mead, 2010).

El Cd tiene efectos adversos en la reproducción masculina, pues se ha reportado que se acumula dentro del testículo y el epidídimo, produciendo efectos negativos (Arteaga-Silva y cols., 2021). De igual manera, es capaz de afectar el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (HHG) durante la pubertad de especies como la rata y el ratón, afectando el control de varios procesos del desarrollo dependientes de las gonadotropinas y de la testosterona (T) (Lamas y cols., 2017;

Ji y cols., 2010; Lafuente, 2001), efectos que se han observado, de forma similar, en humanos púberes (Interdonato y cols., 2015).

Se ha demostrado que el Cd afecta el inicio de la pubertad, las concentraciones de T y los indicadores de pubertad, en la rata macho (Yi y cols., 2021; Hernández-Rodríguez y cols., 2021); sin embargo, debe destacarse que se desconoce si las alteraciones en la pubertad causadas por el Cd pudieran deberse, en parte, a modificaciones en la expresión de neuropéptidos, como la kisspeptina (Kp) la cual se libera en el hipotálamo y rige la secreción de GnRH. La Kp, es codificada por el gen *KISS1*, tiene su efecto sobre las neuronas secretoras de GnRH, codificada por el gen *GNRH1*, que presentan en su membrana el receptor de Kp, codificado por *KISS1R*, el cual, en presencia de su ligando, estimula la producción y secreción de la GnRH, esta señalización es necesaria para el inicio de la pubertad. Por consiguiente, en el presente trabajo nos fijamos el objetivo de evaluar la expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* hipotalámicos en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho con retraso en la pubertad por exposición a Cd.

2. ANTECEDENTES

2.1. Pubertad

La pubertad es un evento de desarrollo complejo, dentro del conjunto de cambios que conducen a la maduración somática y sexual del individuo, evento durante el cual ocurren cambios endocrinos, morfológicos y fisiológicos que llevan a los individuos a alcanzar la madurez sexual y su función reproductiva (Stoker y cols., 2000). Es controlada con suma precisión, mediante una gran cantidad de señales genéticas y ambientales que afectan a los diferentes niveles del eje HHG (Sánchez-Garrido y Tena-Sempere, 2013), por lo cual, si llega a haber una alteración en la interacción de estas señales, a menudo resulta en el desarrollo inadecuado del eje reproductivo, lo que puede causar alteraciones en

el inicio de la pubertad, ocasionando una pubertad precoz, tardía o ausente (Castellano y Tena-Sempere, 2017).

La pubertad se inicia con la activación del eje HHG (Abreu y Kaiser, 2016), lo que conduce al desarrollo de los indicadores de pubertad en los roedores y de las características sexuales secundarias en los humanos. La pubertad, en las ratas macho, inicia a partir del día posnatal (DPN) 35 y se prolonga hasta el DPN 60 de vida (Ojeda y Skinner, 2005; Ji y cols., 2010; Picut y cols., 2018), mientras que en los varones ocurre entre los 9 y 14 años de edad (**Tabla 1**) (Becker y Hesse, 2019). El momento de inicio de la pubertad comienza con la activación del eje HHG, a través de la secreción pulsátil de GnRH hipotalámica que conduce a la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en la adenohipófisis, que a su vez pueden estimular el desarrollo, la estereoidogénesis y la gametogénesis en las gónadas, consolidando la capacidad reproductiva (Leka-Emiri y cols., 2017; Picut y cols., 2018; Howard, 2019).

Actualmente, se acepta que el generador de pulsos de la GnRH hipotalámica impulsa la secreción de gonadotropina basal o tónica, que es responsable de la foliculogénesis, el mantenimiento del cuerpo lúteo y la síntesis de estradiol (E2) y progesterona (P4) ováricos, en los individuos de sexo femenino; y de mantener la espermatogénesis y la secreción testicular de T, en los individuos de sexo masculino (Plant y cols., 2015). Por otro lado, en el caso de los roedores, además es necesario un componente hipotalámico adicional, una señal neural que se origina en una región anterior del hipotálamo —en el área preóptica (POA)—, la melatonina, la cual está estrechamente relacionada con los ciclos de luz-oscuridad y que junto con el generador de pulsos de GnRH desencadenan el inicio de la pubertad. La señal neuronal circadiana se transmite a la hipófisis mediante una gran descarga de GnRH (Plant, 2015). Este no es el caso para los primates, donde la pubertad tanto en machos como en hembras puede lograrse con la sola estimulación pulsátil de GnRH (Plant, 2015).

Antes del nacimiento, en los humanos, a la mitad de la gestación, ocurre una primera activación del eje HHG en el feto y es posible detectar GnRH en el

hipotálamo fetal en la semana 15 de gestación (Kuiri-Hänninen y cols., 2014). En la rata, la actividad del eje HHG se encuentra desde el día 14.5 de gestación (**Tabla 1**) (Picut y cols., 2017). Esta etapa gestacional ha sido reconocida como un tipo de pubertad endocrina intrauterina (**Figura 1**) (Becker y Hesse, 2019), y se silencia hacia el término de la gestación debido a los efectos de retroalimentación negativa que median las hormonas placentarias; sin embargo, esta restricción se elimina al nacer, lo que provoca la reactivación del eje y el aumento de las concentraciones de gonadotropinas conocido como minipubertad (**Tabla 1**) (Kuiri-Hänninen y cols., 2014).

Tabla 1. Clasificación y comparación de la duración de las pubertades endocrinas en el ser humano y en la rata.

Pubertades endocrinas	Humano	Rata macho
1. Intrauterina	Semanas 10-24 de gestación ¹	Día 14.5 de gestación ²
2. Posnatal o minipubertad	Semana 1 a los 3-4 años en niñas ¹ Semana 1 a los 4-6 meses en niños ¹	6 horas ²
3. Pubertad clásica o canónica	8-13 años en niñas, 9-14 en niños; con una duración variable de 3.5-4.5 años ¹	Del día posnatal 33 al 60 ²

¹Becker y Hesse, 2019. ²Picut y cols., 2017

El siguiente periodo de activación transitoria sexo-específica del eje HHG es conocido como minipubertad (**Figura 1**), y ocurre durante los primeros seis meses en el varón y durante los primeros años en las niñas (Becker y Hesse, 2019). En el varón, las concentraciones de LH, FSH y T se mantienen elevados durante los primeros tres meses de vida y disminuyen hacia los seis meses; sin embargo, en las niñas, las concentraciones de FSH y de E2 permanecen elevados hasta los dos a cuatro años (Becker y Hesse, 2019; Kuiri-Hänninen y cols., 2014). La minipubertad juega un papel importante en el desarrollo de los órganos genitales; la T influye en el crecimiento del pene, en el número de células

de Sertoli y en la espermatogénesis; y también parece influir en la composición corporal, pues es probable que la T tenga un efecto sobre el índice de masa corporal y el peso corporal de los niños, así como con la velocidad de crecimiento en los primeros 6 meses de vida; además, la T también tiene efecto sobre las funciones cognitivas (Becker y Hesse, 2019). En el caso de las niñas, las concentraciones elevadas de gonadotropinas dan como resultado la maduración de los folículos ováricos y un aumento en la concentración de E2 (Kuiiri-Hänninen y cols., 2014).

En el caso de la rata macho, la minipubertad ocurre durante las seis primeras horas de nacimiento y la T es producida por las células de Leydig fetales que son independientes de las gonadotropinas hasta el día posnatal 10, cuando esta condición cambia (Picut y cols., 2017).

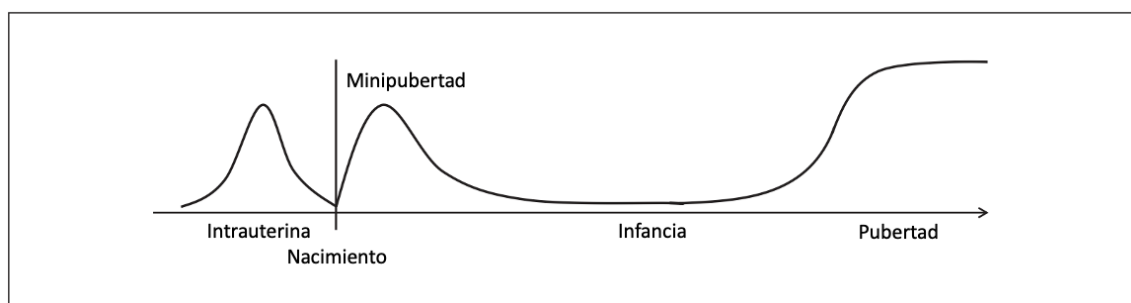


Figura 1. Periodos de actividad del eje HHG. La actividad tiene comienzo en el desarrollo fetal y cae hacia el nacimiento debido al efecto de las hormonas placentarias. Al nacer, el eje hipotalámico-hipofisario vuelve a activarse en la llamada minipubertad. Después, la actividad disminuye gradualmente y luego es baja durante la niñez hasta su nueva reactivación en la pubertad. Tomado y modificado de Kuiiri-Hänninen y cols., 2014.

2.1.1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

En los mamíferos y otras especies, los factores reguladores de la reproducción se originan y/o se integran principalmente en el denominado eje HHG (Pinilla y cols., 2012), en el que se desempeñan papeles vitales en la reproducción y en la producción de hormonas esteroides en ambos sexos. La diferenciación sexual, la maduración de los órganos reproductivos, la secreción

de hormonas sexuales, la espermatogénesis en los machos y la ovogénesis en las hembras, están reguladas por diversas hormonas reproductivas del eje HHG (Jin y Yang, 2014).

El eje HHG consta de tres niveles: el hipotálamo, la hipófisis (específicamente la hipófisis anterior o adenohipófisis) y las gónadas (testículos en los machos y ovarios en las hembras) (**Figura 2**); niveles que funcionan de una forma integral y que dependen de la interacción dinámica entre las señales neuronales y hormonales que se originan en estas tres fuentes (Harter y cols., 2018). La GnRH que se secreta en el hipotálamo, las gonadotropinas que se secretan en la hipófisis y los esteroides sexuales, incluidos los estrógenos y los andrógenos secretados en las gónadas, son los productos hormonales de este eje (Jin y Yang, 2014).

Se ha demostrado, en estudios clásicos en primates, que iniciada la etapa juvenil, la actividad del eje HHG cae en un largo periodo de quiescencia (o estado de animación suspendida), en donde el mRNA que codifica para GnRH en el hipotálamo es mínimo en comparación con la etapa adulta, en donde se presenta una secreción importante de GnRH. Esto ocurre aun cuando la distribución y las proyecciones hacia la eminencia media (EM) en la red neuronal de GnRH son similares tanto en la etapa juvenil como adulta (Plant y cols., 2015). En contraste, en las células gonadótropas o gonadotropos (células adenohipofisarias que producen y secretan las gonadotropinas), se observa poca actividad biosintética de LH y FSH, así como los niveles de mRNA de las subunidades β de las gonadotropinas, los cuales son bajos en concordancia con los bajos niveles de GnRH en circulación en esta etapa del desarrollo (Plant y cols., 2015).

Las neuronas de GnRH de los primates juveniles presentan la maquinaria celular y molecular necesaria para generar un estímulo hipofisiotrópico hacia los gonadotropos. Sin embargo, se encuentran detenidas y es necesaria la activación de una entrada aferente de las neuronas de GnRH para que se active e inicie la pubertad, es decir, todo el eje HHG se encuentra listo y no limita el inicio de la pubertad (Plant, 2015). La pausa en la liberación pulsátil de GnRH

durante el desarrollo juvenil se puede conceptualizar como un "freno" o restricción prepuberal que, durante esta etapa de desarrollo, se coloca sobre el generador de pulsos de GnRH en el núcleo arcuato (ARC) impidiendo su funcionamiento (Perera y Plant, 1992). Este "freno" es, por supuesto, conceptual y puede estar mediado por la aplicación de señales inhibitorias al generador de pulsos, a la pérdida de entradas estimulantes o a una combinación de ambas y se podría predecir que los cambios en la expresión génica en el hipotálamo son opuestos a los que están asociados con la activación prepuberal del generador de pulsos de GnRH (Plant, 2015).

Cuando llega el momento de la pubertad, el sistema de control que gobierna el inicio de ésta, puede observarse en forma de dos interruptores: el primero, apaga el generador de pulsos de GnRH activo en el infante para garantizar el estado hipogonadotrópico de la etapa juvenil; el segundo, reactiva este mecanismo hipotalámico al finalizar el desarrollo juvenil y así desencadena la pubertad (Plant, 2015). Con respecto al segundo interruptor, se ha propuesto un sistema central de seguimiento del crecimiento que, en su momento, permite la reactivación del generador de impulsos de GnRH, por lo tanto, la pubertad se sincroniza con el desarrollo somático del individuo. Esta función se ve reflejada en el peso corporal y la talla, necesarias para esta etapa. Se propone que el cerebro controla una señal endocrina o metabólica circulante que refleja el desarrollo somático y culmina con una señal que permite el resurgimiento de una pulsatilidad bien establecida de GnRH hipotalámica, justo en una etapa apropiada del desarrollo somático, este componente neuronal central que rastrea la señal somática se ha conceptualizado como un "somatómetro" (Plant et al., 1989). Cabe resaltar, que este concepto surgió desde los años 40 del siglo XX, con el trabajo y las ideas de Frisch, quien propuso que en las niñas se debía alcanzar cierta cantidad de masa grasa y masa magra, en lugar de una edad crítica, para que ocurra la menarquia (Frisch y Revelle, 1970; Frisch et al., 1973). Estas ideas se vieron reforzadas en 1994 con el descubrimiento de la leptina (Lep) (Zhang y cols., 1994), sin embargo, aunque la Lep tiene un papel permisivo

sobre el eje HHG, tanto en la etapa puberal como en la edad adulta, no tiene un papel desencadenante en el inicio de la secreción de GnRH puberal (Plant, 2008).

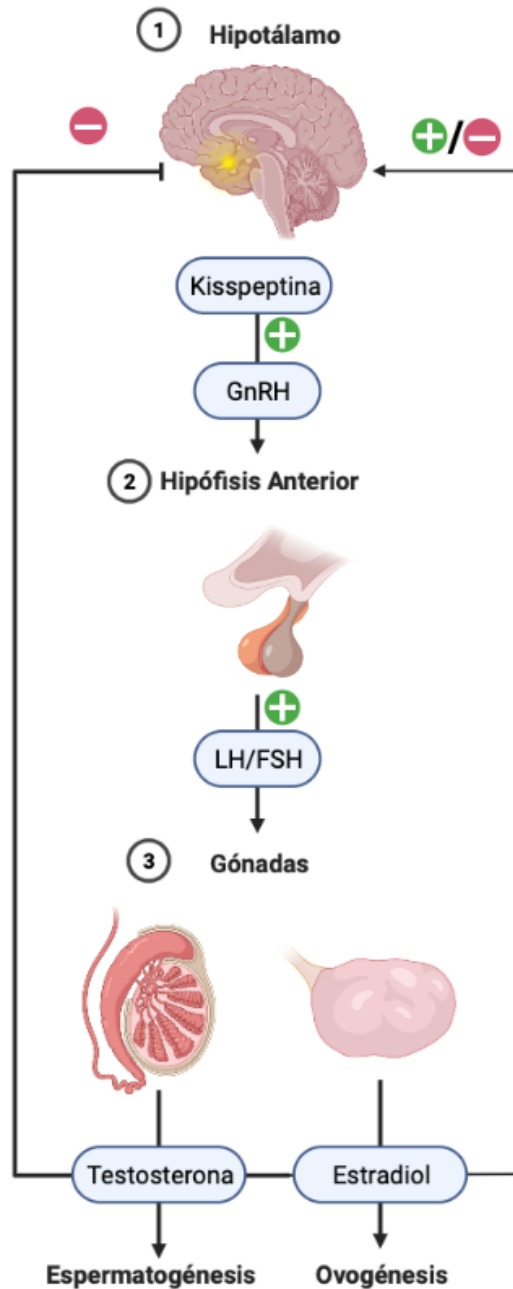


Figura 2. Reresentación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG). Consta de tres niveles que funcionan de una forma integral y dependen de la interacción dinámica entre las señales neuronales y hormonales que se originan en las tres fuentes. Esquema creado con BioRender.com.

Otro mecanismo que se ha propuesto para el momento de inicio de la pubertad es un “reloj” intrínseco cerebral, que se activa después del nacimiento de acuerdo con una programación de desarrollo específico que va a permitir al reloj avanzar y llevar un conteo del tiempo en el desarrollo del individuo. Sin embargo, el desarrollo de los cambios peripuberales en los parámetros estructurales de la maduración cerebral, como el volumen total del encéfalo y el volumen de la materia gris, ocurre mucho antes en las niñas que en los niños (Giedd, 2008). Algunos de estos cambios están asociados a cambios en el sueño, particularmente en el sueño de ondas lentas (Colrain y Baker, 2011), hecho que podría estar relacionado con el reinicio de la actividad del generador de pulsos de GnRH (Plant, 2015).

La herencia genética, es otro precursor del inicio de la pubertad y de la activación del eje HHG, por ejemplo, la ocurrencia de la menarquia tanto temprana como tardía, son rasgos que han sido reconocidos como heredables (Plant y cols., 2015). Así, el inicio de la pubertad está relacionado tanto con los cambios que ocurren a nivel cerebral, como la activación neuronal hipotalámica y con la herencia genética, sin embargo aún falta dilucidar su relación exacta (Plant, 2015).

2.2. Regulación neural de la pubertad

La regulación neural de la pubertad es un proceso dependiente de la activación de las neuronas hipotalámicas neurosecretoras de GnRH (Ojeda y Skinner, 2005), que a su vez están reguladas por la kisseptina (Kp), con un papel altamente dominante en su activación durante el proceso puberal —e incluso en los procesos de activación anteriores— y en su modulación (directa o indirecta), mediada por diversas señales reguladoras, incluso de señales metabólicas (Castellano y Tena-Sempere, 2017). Las aferencias activadoras de las neuronas GnRH incluyen no solo entradas transinápticas, sino también factores provenientes de células gliales (Ojeda y cols., 2006).

Se han identificado las regiones hipotalámicas que están implicadas en el proceso puberal en roedores adultos, por ejemplo, la Kp se expresa en sólo unas pocas regiones cerebrales, incluida una pequeña población en la amígdala media (MeA) (Kim y cols., 2011) y dos poblaciones hipotalámicas más grandes en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) y en el ARC (**Figura 3**) (Gottsche y cols., 2004; Kauffman y cols., 2007a). La población AVPV es sexualmente dimórfica, presentándose con mayor densidad neuronal en los individuos de sexo femenino (Kauffman y cols., 2007b), es importante señalar que esta región contiene varias otras subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas, que expresan la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (Simerly y cols., 1997), y las que expresan ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glutamato (Ottem y cols., 2004). Por otro lado, el receptor a Kp se expresa predominantemente en las neuronas de GnRH del área preóptica (POA) (Lee y cols., 1999, Herbison y cols., 2010) (Irwig y cols., 2004) y en el ARC (Lee y cols., 1999).

La representación de las vías aferentes neuronales que controlan la pubertad como una red neuronal con una serie de módulos funcionales entrelazados entre sí, son de ayuda para la conceptualización de su funcionamiento en las diferentes especies. Al hablar de una red neuronal muy compleja, nos referimos a aquella que integra muchas señales homeostáticas internas y externas, que gobierna el inicio de la pubertad y, posteriormente, la fertilidad. Dentro de esta red neuronal se encuentran, las neuronas de Kp, GnRH y células gliales. Aunque la naturaleza precisa y los componentes de esta red aún se siguen dilucidando, está claro que las neuronas de GnRH son las células de salida final de la red neuronal que controla la secreción de gonadotropinas en la hipófisis anterior en todos los mamíferos (Herbison, 2016).

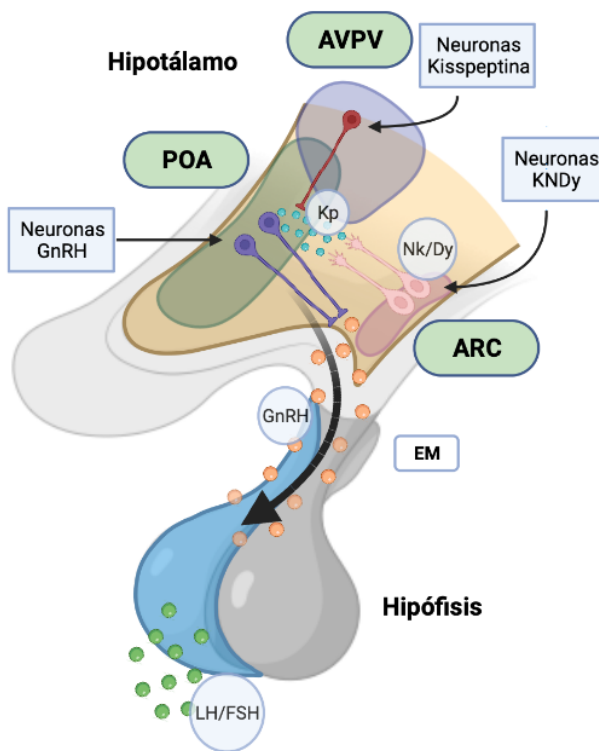


Figura 3. Circuito neural hipotalámico. En el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) es sexualmente dimórfico y contiene una población reducida de neuronas de Kp en el macho, mientras que las neuronas KNDy se encuentran en una mayor proporción en el núcleo arcuato (ARC) y son las principales encargadas de estimular a las neuronas de GnRH en el área preóptica (POA), desde donde se proyectan hacia la eminencia media (EM) para secretar GnRH hacia los gonadotropos en la adenohipófisis a través del sistema porta. Esquema creado con BioRender.com.

2.2.1. Kisspeptina (*Kiss1*)

Se sabe que el control de las neuronas GnRH es multifactorial, y se ha demostrado que numerosos neuropéptidos y neurotransmisores regulan la secreción de GnRH, sin embargo, la Kp se ha instituido en los últimos años como la señal reguladora fundamental, con un papel esencial en el control de la pubertad y de los ciclos reproductivos (Pinilla y cols., 2012). La Kp es un neuropéptido crucial en la función del eje HHG y se ha encontrado que es producida en dos poblaciones de neuronas ubicadas en el hipotálamo (Castellano y Tena-Sempere, 2017). Estas neuronas activan a las neuronas

secretoras de la GnRH, actuando a través del receptor de Kp, en el hipotálamo para estimular la secreción de GnRH.

El gen supresor del cáncer, *KISS1*, fue nombrado así por el lugar dónde se descubrió, Hershey, Pensilvania, el hogar de los famosos Kisses® de Hershey (Lee y cols., 1996; Lee y Welch, 1997). Sin embargo, se haría notar no sólo por su nombre, sino por sus funciones, sobre todo en el sistema reproductivo (Gottsch y cols., 2009).

El gen que codifica para Kp es nombrado *KISS1* en humanos y *Kiss1* en todos los demás animales, el receptor de Kiss1 fue primero nombrado como GPR54, actualmente conocido en el mundo como *KISS1R* en humanos y *Kiss1r* en todos los demás animales (Gottsch y cols., 2009). En los seres humanos, el gen *KISS1* se localiza en el cromosoma 1 y está organizado en cuatro exones y tres intrones (Pinilla y cols., 2012). En la rata *Kiss1* se localiza en el cromosoma 13. La Kp es parte de una familia de neuropéptidos resultantes de la escisión de un péptido precursor (prepro-kisspeptina) de 145 aminoácidos (Pinilla y cols., 2012; Ohtaki y cols., 2001; Lee y cols., 1996) y es activa en humanos, predominantemente, como un péptido de 54 aminoácidos (**Figura 4**) (Pinilla y cols., 2012; Ohtaki y cols., 2001).

Por otro lado, las interconexiones entre Kp y los axones de GnRH resultan ser muy estrechas, ya que se han observado contactos axosomáticos, axodrícticos y axoaxonales (Kalló y cols., 2012). Además, las neuronas GnRH expresan *KISS1R* y son muy sensibles a la kisspeptina, y las fibras tanto de la Kp como de la GnRH se encuentran en asociación extensa e íntima dentro de la EM, por lo que se ha sugerido que la secreción de GnRH está gobernada por Kp (Livadas y Chrousos, 2016). Además, estudios en el hipotálamo de rata mostraron que los niveles de *Kiss1* aumentaron entre el DPN 1–20 y el DPN 30 en las hembras, y entre el DPN 1–30 y el DPN 45 en los machos, seguido de una expresión disminuida en la edad adulta, estos estudios demostraron que los aumentos en los niveles de *Kiss1* se correlacionan con el inicio de la pubertad (Navarro y cols., 2004).

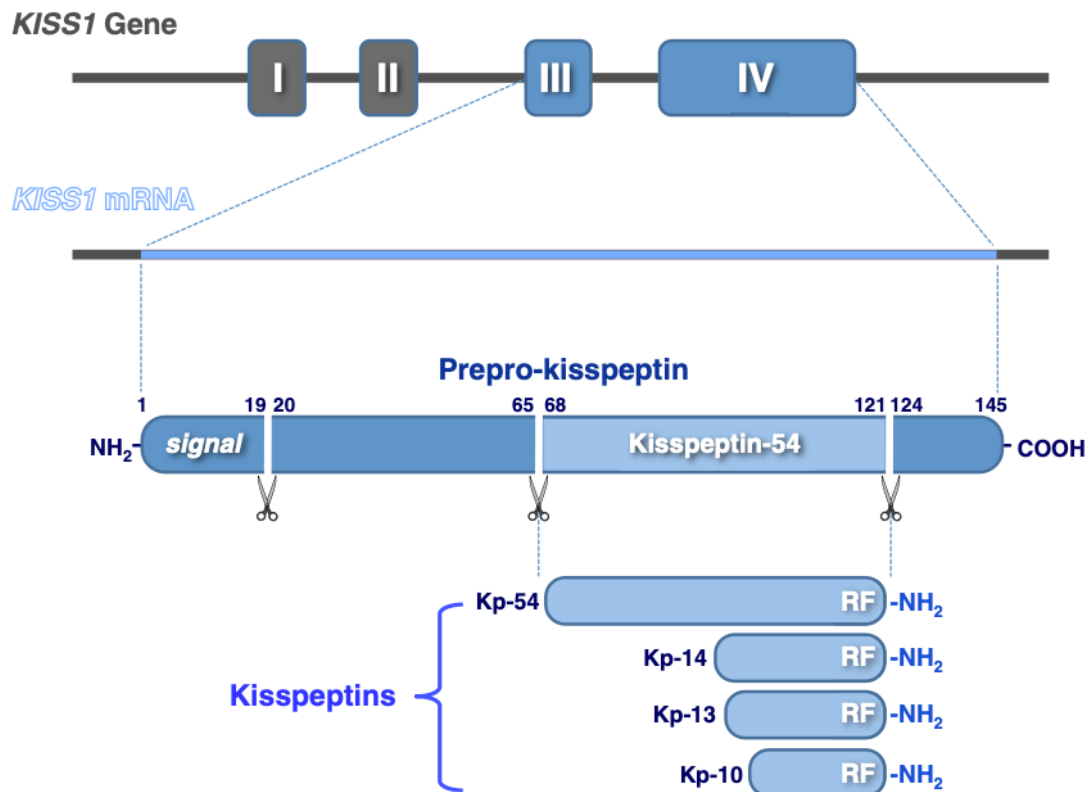


Figura 4. Gen *KISS1* y sus productos. Se generan diferentes kisspeptinas mediante escisión proteolítica que forman un precursor común, prepro-kisspeptina. En el ser humano, el gen *KISS1* está compuesto por cuatro exones, siendo los dos primeros exones no codificantes. El precursor de la kisspeptina humana (prepro-kisspeptina) contiene 145 aminoácidos, con un péptido señal de 19 aminoácidos y una región central de 54 aminoácidos, kisspeptina-54 (Kp-54; anteriormente denominada metastina). Las formas de kisspeptinas de menor peso molecular incluyen Kp-14, Kp-13 y Kp-10; el último corresponde al tramo de 10 aminoácidos COOH-terminal común que contiene el motivo RF-amida que es suficiente para activar completamente a Kiss1r (Tomado de Pinilla y cols., 2012).

Asimismo, se ha identificado la participación de los genes *KISS1* y *KISS1R* en el inicio o retraso de la pubertad, ya que al localizar alteraciones en su secuencia se ha demostrado que causan una desincronización anormal de la pubertad (Pinilla y cols., 2012; Arteaga-Silva y cols., 2015; Minabe y cols., 2019), por lo que se sugiere que la señalización de Kp a través de su receptor, juega un papel clave en la reproducción, a través de la estimulación directa sobre las

neuronas GnRH, que a su vez estimula la liberación de las gonadotropinas en mamíferos, incluidos los humanos, primates, rumiantes y roedores.

Las dos poblaciones principales de neuronas de Kp en el hipotálamo, se han caracterizado con detalle en roedores (García-Galiano y cols., 2012). La Kp fue descubierta y mapeada en el cerebro, específicamente dentro de las neuronas ubicadas predominantemente en el ARC y el AVPV (**Figura 5**) que se extiende hacia el núcleo periventricular (PEN) (Gottsch y cols., 2004), que ahora es denominada región periventricular rostral del tercer ventrículo (RP3V) (de Croft y cols., 2012). En el humano, las neuronas de Kp se encuentran en el núcleo infundibular y el POA, que son análogas al ARC y RP3V de los roedores, respectivamente (Rometo y cols., 2007).

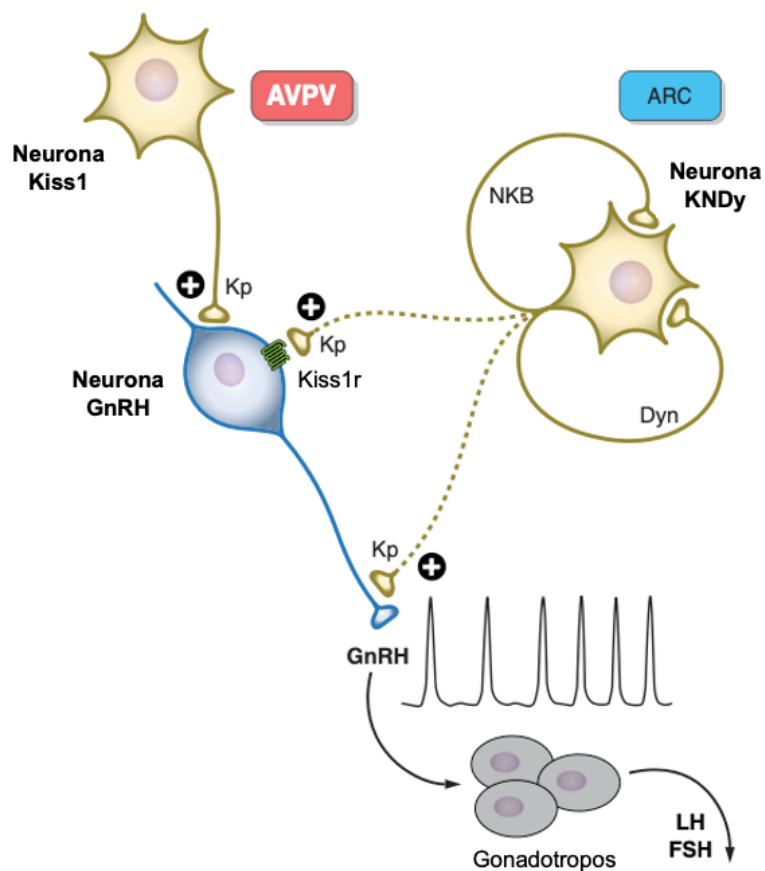


Figura 5. Representación esquemática de la red neuronal Kiss1. Esta red gobierna la secreción de GnRH y, por lo tanto, la función reproductiva. (Tomado y modificado de Pinilla y cols., 2012).

Se ha demostrado que la población del ARC, coexpresa los neuropéptidos, neuroquinina-B (NKB) y dinorfina (Dyn), que aparentemente operan como correuladores de las neuronas de Kp y eventualmente como moduladores del inicio de la pubertad (Lehman y cols., 2010; Navarro y cols., 2009) y para facilitar la referencia, el nombre de este grupo celular fue abreviado como subpoblación “KNDy” (**Figura 6**), creando un parónimo con “Candy”, en relación también con la nomenclatura de Kp que proviene de los Kisses® de Hershey’s (Lehman y cols., 2010).

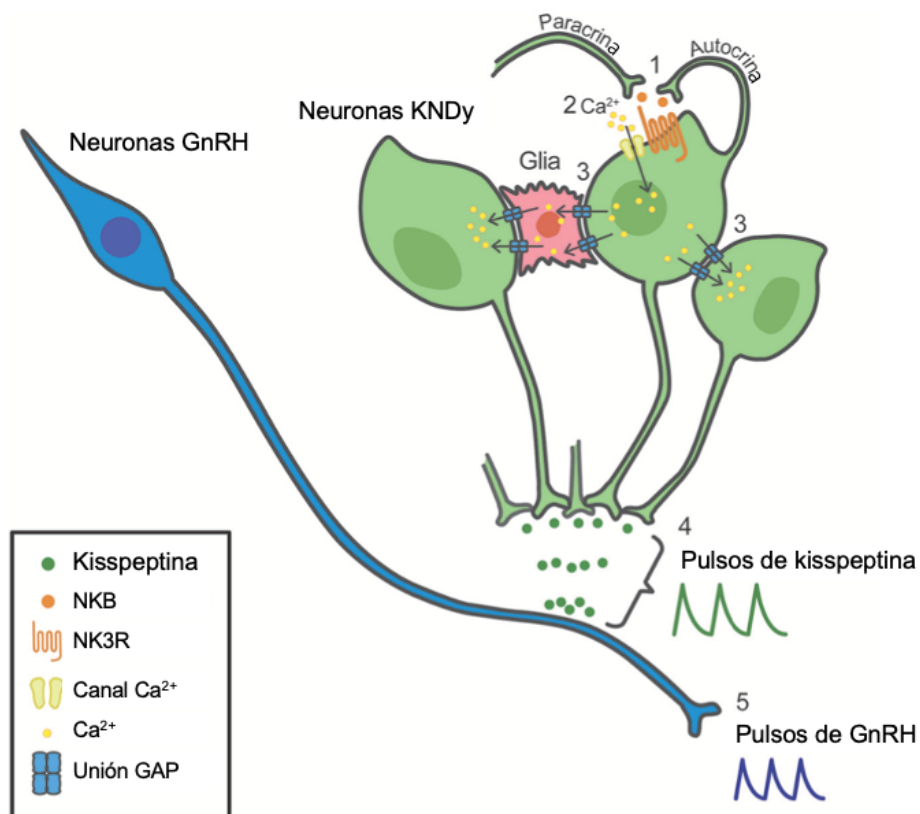


Figura 6. Representación esquemática de un modelo de neuronas KNDy del ARC y la posterior secreción de GnRH. La NKB secretada por las neuronas KNDy (verde) se une al receptor de taquiquinina NK3 (NK3R) de manera autocrina/paracrina (1), desencadenando el influjo de Ca en las neuronas KNDy que expresan NK3R (2). El Ca intracelular aumentado puede propagarse a neuronas KNDy vecinas y células gliales (rojo) a través de uniones GAP, incluso si esas neuronas no expresan NK3R (3). La propagación del aumento de Ca intracelular daría como resultado una descarga sincronizada en las neuronas KNDy que causaría la secreción pulsátil de Kp (4). La secreción pulsátil de Kp resultante controla la secreción pulsátil de GnRH en la eminencia media (5) (Tomado y modificado de Uenoyama y cols., 2019).

Por otro lado, los esteroides sexuales gonadales tienen una función estimulante en las neuronas de Kp en el AVPV, pero inhiben las neuronas de Kp en el ARC, funcionando como un mecanismo de retroalimentación positiva y negativa, respectivamente. La vía neuroanatómica por la cual se logra esta retroalimentación también era desconocida, pues resulta que las neuronas de GnRH en los mamíferos no expresan ninguno de los receptores para estrógenos (Herbison y Theodosis 1992). Tiempo después del descubrimiento de la función fundamental de la Kp sobre la reproducción, se hipotetizó que los efectos de retroalimentación podrían estar mediados por las neuronas de Kp, por lo que a través del análisis del mRNA de *Kiss1* en el ARC y en RP3V en respuesta a los esteroides gonadales, se observó un efecto desregulación, que además, resulto ser diferencial en cada región (Smith y cols., 2005), pues el E2 tuvo un efecto estimulante en las neuronas de RP3V, mientras que inhibió a las neuronas del ARC. Además, en hembras, en el momento de la elevación de la LH preovulatoria, la expresión de *Kiss1* aumentó en el RP3V y disminuyó en el ARC (Smith y cols., 2006). Así, se evidenció que las neuronas de Kp efectivamente son las mediadoras de la retroalimentación y, en la actualidad, se acepta que las neuronas de Kp en el ARC actúan como el generador del pulso de GnRH (Harter y cols., 2018).

2.2.2. Receptor de kisspeptina (*Kiss1r*)

Después del descubrimiento de la Kp, se descubrió un receptor de alta afinidad a este neuropéptido e inicialmente fue conocido como receptor acoplado a proteína G 54 (GPR54) (Lee y cols., 1999). Tiempo después se descubriría que GPR54 y su ligando endógeno, la Kp, son esenciales para la activación y regulación del eje HHG (Krsmanovic y cols., 2009). El gen GPR54 en humanos codifica a un receptor acoplado a proteína G heptahelical de 398 aminoácidos (**Figura 7**) con homología con la galanina (aproximadamente con un 28-30% de identidad de aminoácidos) y con familias de receptores opioides (Lee y cols.,

1999). La región C-terminal de la Kp es responsable de la unión al receptor. La unión de Kp o péptidos C-terminales a GPR54 conduce a la activación de la fosfolipasa C y un aumento en el inositol-(1,4,5)-trifosfato intracelular [Ins (1,4,5) P₃] y Ca²⁺, y la activación de las vías de la proteína cinasa activada por mitógenos ERK y p38 (Kotani y cols., 2001; Stafford y cols., 2002). La amidación C-terminal es necesaria para que todos los péptidos estimulen el aumento de Ca²⁺ intracelular (Ohtaki y cols., 2001).

El receptor GPR54, fue renombrado tras el descubrimiento de la importancia de la Kp en el eje reproductivo y por su importante papel en el circuito neuronal reproductivo y es actualmente conocido como *KISS1R* en humanos y *Kiss1r* en todos los demás animales (Gottsch y cols., 2009). Las mutaciones en el gen *KISS1R*, en humanos, constituyen una causa rara de hipogonadismo hipogonadotrópico congénito. Además, se han informado mutaciones graves (de sentido erróneo, inserciones, deleciones, etc.) en diferentes poblaciones y en pacientes de diferentes orígenes étnicos con falla en la secreción de GnRH, con retraso de maduración puberal y esterilidad (Moalla y cols., 2019).

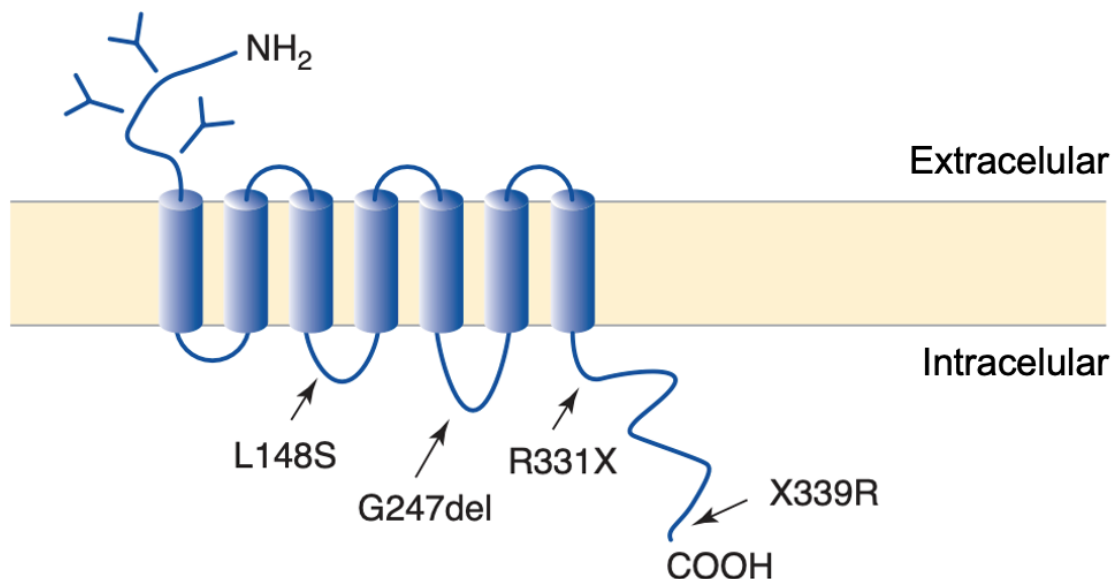


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del receptor Kiss1r. Se muestra la ubicación de los sitios en donde las mutaciones causan hipogonadismo, con la "X" se señala un codón de terminación y "del" señala la ubicación de una deleción que causan la terminación prematura del receptor (Tomado de Colledge, 2004).

El receptor Kiss1r se expresa dentro del hipotálamo de los roedores predominantemente en el POA (Lee y cols., 1999, Herbison y cols., 2010) en la gran mayoría de las neuronas de GnRH (Irwig y cols., 2004) y también en el ARC (Lee et al. 1999). Fuera del hipotálamo, el receptor se puede encontrar consistentemente en el hipocampo (Lee y cols., 1999; Ohtaki y cols., 2001; Herbison y cols., 2010).

2.2.3. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

La GnRH, fue aislada en 1971 y se conoció en un principio como hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), sin embargo, su existencia se postuló desde 1955 por Geoffrey Harris, actualmente, se acepta que el generador de pulsos de GnRH hipotalámico impulsa la secreción de gonadotropina basal o tónica, que es la responsable de la foliculogénesis, el mantenimiento del cuerpo lúteo y la síntesis de E2 y P4 ováricos en las hembras y de mantener la espermatogénesis y secreción testicular de T en el macho (Plant et al., 2015). Tres genes parálogos de GnRH (*Gnrh1*, *Gnrh2* y *Gnrh3*) han surgido a través de la duplicación genómica durante los millones de años del camino evolutivo de los vertebrados y todos los vertebrados que retienen *Gnrh1* usan sólo el decapeptido GnRH-1 para controlar la fertilidad (Okubo y Nagahama, 2008).

En los seres humanos, el gen GnRH se encuentra en el brazo corto del cromosoma 8 (8p21-p11.2) y está organizado en cuatro exones y tres intrones (Seeburg y cols., 1987). El gen codifica una prohormona de 92 aminoácidos que se escinde enzimáticamente y se modifica aún más ya que se encuentra en los gránulos secretores. El precursor consta de: (a) un péptido señal (23 aminoácidos) que dirige el empaquetamiento y la secreción intracelular, (b) el decapeptido de GnRH, (c) un sitio de procesamiento proteolítico de tres aminoácidos (Gly-Lys-Arg) y (d) una proteína asociada a GnRH (GAP) de 56 aminoácidos que se secreta junto con GnRH, pero cuya función aún no está clara (Maggi y cols., 2016).

Se sabe, que un pequeño subconjunto de neuronas del hipotálamo es la responsable de la síntesis de la GnRH. Además, que la forma de liberación de este neuropéptido es pulsátil y se libera en el sistema sanguíneo porta hipofisario, a través del cual viaja hacia la hipófisis anterior (Maggi y cols., 2016). Al unirse a su receptor específico (GnRHR) en los gonadotropos hipofisarios, la GnRH estimula la biosíntesis y la liberación de las gonadotropinas LH y FSH, regulando así la gametogénesis y esteroidogénesis gonadal en ambos sexos (Conn y Crowley, 1994; Millar, 2005). La pulsatilidad de la GnRH resulta fundamental tanto para el mantenimiento de la expresión del gen de las gonadotropinas como para el patrón fisiológico de la secreción de éstas (Maggi y cols., 2016).

Las neuronas de GnRH proyectan una o ambas de sus dendritas, que son extremadamente largas, hacia la EM, donde luego se dividen en terminales axonales cortas para permitir la secreción de GnRH en la vasculatura porta hipofisaria (Herde y Herbison, 2015). Estas proyecciones son de tipo dendrítico, ya que reciben entradas sinápticas, pero también de tipo axonal, ya que conducen potenciales de acción a las terminales neurosecretoras de GnRH en la EM (Iremonger y Herbinson, 2012). Puesto que operan con una función bivalente como dendritas y axones mezclados ("dendrones") (Herde e Iremonger, 2013). La liberación pulsátil de GnRH hacia la EM es la responsable de impulsar la secreción pulsátil de gonadotropinas en todos los mamíferos (Herbison, 2016) y hoy se sabe que el mecanismo por el cual las neuronas GnRH logran este patrón de liberación es gobernado por las neuronas de Kp.

La Kp también posee la capacidad de regular la transcripción del gen *GNRH1* y la transcripción del gen del receptor de GnRH (*GNRHR*). En ratas, se descubrió que *Otx2* es una proteína específica regulada por Kp y que juega un papel importante en la regulación de la expresión de GnRH por Kp (Novaira y cols., 2012). Se ha reportado, que la estimulación de las neuronas GnRH con Kp provoca la activación del eje HHG y la secreción de gonadotropinas en la hipófisis. Además, la expresión de Kp y de su receptor se incrementan durante la pubertad en roedores y primates, así, la administración de Kp exógena en

animales machos y hembras es capaz de estimular la secreción de GnRH y gonadotropinas y desencadenar la pubertad (Pinilla y cols., 2012).

2.3. Regulación génica de la pubertad

Se sabe, gracias a estudios de asociación de genoma completo (GWAS), que en el ser humano, el momento del inicio de la pubertad normal puede variar y está influenciado por factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos representan, aproximadamente, entre el 50-75% de la variación (Parent y cols., 2003; Palmert y Hirschhorn, 2003; Towne y cols., 2005). Esto sugiere, que algunos tipos de alteración genética, como cambios en el número de copias, interacciones gen-gen y gen-ambiente mediadas epigenéticamente, pueden ayudar a explicar la variabilidad en el inicio de la pubertad (Rzeczowska y cols., 2014).

Muchos genes han sido estudiados y relacionados con el inicio de la pubertad, entre ellos *GNRH1* que codifica para GnRH o *TAC3R* que codifica al receptor de la NKB en los que se han identificado variantes que causan hipogonadismo (Cousminer y cols., 2016). También, se ha sugerido que las mutaciones de ganancia de función en los genes que codifican a la Kp y su receptor, *KISS1* y *KISS1R*, respectivamente, son causas de pubertad precoz central (Leka-Emiri y cols., 2017). Además, una mutación encontrada en el gen *KISS1R*, fue suficiente para causar hipogonadismo hipogonadotrópico en los portadores (Seminara y cols., 2003), por lo que las variantes en la vía de la Kp pueden estar asociadas con alteraciones en la pubertad en algunos casos (Zhu y cols., 2018).

Un ejemplo más es la estimulación de la secreción de Kp por NKB, que está documentada tanto en humanos como en animales, mediante la administración de un agonista de NKB y a través de la interacción con su propio receptor (NK3R), induce la expresión de *KISS1* en las neuronas hipotalámicas, mientras que esta función no se presenta en animales *knockout* para *Kiss1*,

además las mutaciones humanas con pérdida de función del gen *TAC3* que codifica NKB o de su receptor *TAC3R* afectan el desarrollo puberal, presentándose hipogonadismo hipogonadotrópico (Grachev y O'Byrne, 2014; Yamamura y cols., 2015).

2.4. Desarrollo e indicadores de pubertad en la rata macho

Los indicadores de pubertad en la rata macho tienen lugar entre el DPN 42 y 49 (Ojeda y Skinner, 2005, Arteaga-Silva y cols., 2013), éstos incluyen cambios fisiológicos, tales como la maduración de las espermatogonias, la aparición de espermatozoides, la separación prepucial (SP), además de patrones conductuales tales como el acicalamiento genital (AG) y las erecciones peneanas espontáneas (EPE). La SP ocurre en la etapa peripuberal y se hace evidente cuando el prepucio comienza a retraerse gradualmente desde el día 41 al día 47 de vida, siendo el día 47 en donde se presenta la SP completa (Korenbrot y cols., 1977; Hernández-González, 2000).

La SP es considerada un criterio determinante de la aparición de la pubertad y puede ser utilizada para detectar compuestos endocrinos activos que operan a través de una variedad de modos de acción en el organismo y se encuentra incluido en la Serie Nivel 1 del Programa de Detección de Disruptores Endocrinos (EDSP) de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE. UU. (Stump y cols., 2014).

El AG consiste en el lamido de los testículos, pene y región anogenital. Esta conducta se presenta al inicio del destete y se incrementa en la pubertad, alcanzado su mayor manifestación a los 46 y 48 días de edad (Sachs y cols., 1984; Moore, 1986; Hernández-González, 2000). La ocurrencia con que sucede el AG es regulada por niveles hormonales de la LH y la T (Sachs y cols., 1984; Moore, 1986). Las EPE son aquellas que ocurren en ratas peripuberales hospedadas de forma individual o en grupo, pero en ausencia de estímulo proveniente de una potencial pareja sexual (una hembra receptiva).

Generalmente ocurren al final de un tren de AG y su pico de ocurrencia es alrededor de los 47 días de edad (Hernández-González, 2000).

Todas las manifestaciones fisiológicas y morfológicas anteriormente descritas durante la pubertad están altamente influenciadas por las hormonas y por factores ambientales (Stoker y cols., 2000; García Rodríguez y Díaz Loving, 2011; Juárez Flores y cols., 2013; Hernández-Rodríguez y cols., 2021).

2.5. Principales fuentes de contaminación y exposición al cadmio

La contaminación por Cd se ha convertido en una preocupación en los países industrializados y en los países en vías de industrialización, debido al elevado ritmo de las actividades industriales, que son una de las principales fuentes de producción de Cd, misma que ha ido en aumento progresivo durante décadas (de Angelis y cols., 2017).

La presencia de Cd y sus compuestos en el medio ambiente, es consecuencia de procesos tanto naturales como antropogénicos. Entre las fuentes naturales de Cd se incluyen: la actividad volcánica, el desgaste de rocas por la intemperie, los aerosoles marinos, los incendios forestales y la movilización de suelos (Faroon y cols., 2012). Como derivado de las actividades antropogénicas, el Cd y sus compuestos, como el cloruro de Cd (CdCl_2), el acetato de Cd y el carbonato de Cd, se derivan de: baterías de níquel-Cd, pigmentos, estabilizadores de plástico, pesticidas, fertilizantes, y dispositivos fotovoltaicos; y de actividades como: el procesamiento del caucho, el proceso de galvanización, la quema de combustibles fósiles y la incineración de basura (Faroon y cols., 2012). Las partículas de Cd se transportan por el aire y se pueden depositar en el suelo y el agua; las concentraciones medias totales de Cd en el aire dependen de la proximidad a la fuente industrial y pueden oscilar entre 0.1 ng/m^3 en áreas remotas y 100 ng/m^3 en la fuente de emisión; el Cd también se bioacumula en la materia orgánica al ingresar a la cadena alimenticia (IARC, 2012).

La población, en general, está sujeta a la exposición ambiental a concentraciones relativamente bajas de Cd que se encuentran comúnmente en el medio ambiente, por otro lado, los profesionales que manipulan Cd en actividades relacionadas con su trabajo están sujetos a una exposición ocupacional a altas concentraciones (Faroon y cols., 2012). Entre la población expuesta al medio ambiente, los fumadores de tabaco son de los sujetos más expuestos, ya que las plantas de tabaco acumulan grandes cantidades de Cd en sus hojas, por lo que el humo del tabaco es la principal fuente de Cd en este sector de la población (Faroon y cols., 2012). De hecho, se ha estimado que los fumadores están expuestos a aproximadamente 1.7 μg de Cd por cigarrillo, del cual el 10% se inhala, por lo tanto, los fumadores absorben alrededor de 1-3 μg de Cd al fumar una cajetilla de cigarrillos al día; como consecuencia, las concentraciones de Cd en los fumadores es de aproximadamente el doble que en los no fumadores (Faroon y cols., 2012).

Los no fumadores están expuestos al Cd por la ingesta en su dieta de alimentos contaminados (especialmente en cereales, granos, verduras, papas, etc.) y agua contaminada; de hecho, la ingesta de Cd en los vegetarianos es casi del doble, en comparación con los no vegetarianos (Faroon y cols., 2012). En la mayoría de los países, la ingesta diaria media de Cd procedente de los alimentos se sitúa entre 0.1 y 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (IARC, 2012). La exposición ocupacional se produce casi exclusivamente por inhalación de vapores o polvos contaminados con Cd y por ingesta a través de las manos contaminadas con polvo. En los sujetos expuestos ocupacionalmente, la concentración de Cd en sangre puede ser de hasta 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Faroon y cols., 2012; IARC, 2012).

2.6. Toxicidad del cadmio

Aunque el Cd juega un papel importante en la industria, es un metal tóxico. En el cuerpo humano, el exceso, por lo general conduce a una intoxicación crónica (Li y cols., 2017). Se ha catalogado al Cd como el séptimo metal pesado

más tóxico que existe, según la clasificación de la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATDSR por sus siglas en inglés) (Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 2017).

La vida estimada del Cd dentro del organismo es muy larga, de 10 a 40 años en humanos, y la tasa de excreción es muy baja, ya que alrededor del 0.007% y el 0.009% de la carga corporal de Cd se excreta en la orina y en las heces, por día, respectivamente (Faroon y cols., 2012). En consecuencia, el Cd se acumula progresivamente en el hígado y en el riñón, que son los órganos primarios de la toxicidad por Cd. Estos órganos, muestran los primeros efectos de la intoxicación por Cd. Sin embargo, los ovarios y la placenta; así como los testículos, el epidídimo, vesículas seminales y el propio semen, pueden presentar Cd (Nordberg, 2009; Akinloye y cols., 2006; Ronco y cols., 2005).

El Cd es capaz de ingresar al cuerpo humano por diferentes vías. Una de ellas es a través del olfato, donde las partículas de Cd se transportan a lo largo de las neuronas olfativas primarias y se acumula en el bulbo olfatorio (Sunderman, 2001). También puede entrar y acumularse en los pulmones, pasar a través de las células alveolares y llegar a la circulación sanguínea (Oberdörster, 1992). La absorción de Cd por ingestión de alimentos o agua, es otra de las vías principales de entrada. Una vez que se encuentra en la membrana apical de los enterocitos del intestino, el Cd es transportado por el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) (Bridges y Zalups, 2005).

Después de su absorción a través del epitelio pulmonar o intestinal, el Cd entra a la circulación sistémica, de hecho, la concentración de Cd en sangre sirve como biomarcador para conocer el nivel de exposición al Cd (Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 2017). El efecto de la exposición al Cd es estrictamente dependiente de la dosis: en dosis altas, el Cd puede provocar de manera progresiva: daño celular, muerte celular y falla orgánica. En dosis bajas, puede modular mecanismos específicos sin mostrar una toxicidad celular marcada (López y cols., 2003; Pacini y cols., 2009).

Desde fuera de las células, el Cd puede alterar la concentración intracelular de Ca, el cual es un mensajero intracelular universal y muy versátil (Berridge y cols., 2000). Dentro de las células, el Cd desregula la señalización de Ca ejerciendo efectos opuestos sobre las reservas internas de Ca, bloquea la liberación de Ca almacenado al inhibir la actividad del 1,4,5-trifosfato (IP3) y los receptores de rianodina. Por otro lado, aumenta la concentración de Ca intracelular al promover la salida de Ca del retículo sarcoplásmico (Choong y cols., 2014).

Cabe resaltar, que este metal también puede entrar en las neuronas, a través de los canales de Ca activados por voltaje (Usai y cols., 1999) y provocar una amplia gama de síntomas clínicos (Wang y Du, 2013).

Debido a la similitud de las propiedades químicas entre el Cd y otros metales esenciales, especialmente con el Ca, se facilita su entrada a la célula (Choong y cols., 2014), la cual se produce tanto por transporte activo (sistemas de eflujo mediado por ATPasa y endocitosis mediada por receptor) como por transporte pasivo (canales y transportadores) (Thévenod, 2010). Una vez dentro de la célula, la citotoxicidad inducida por Cd depende de factores como su distribución intracelular (nuclear o citoplasmática) (Rani y cols., 2014). Se sabe que el Cd afecta la proliferación y diferenciación celular, la progresión del ciclo celular, la síntesis de DNA y la apoptosis. Un efecto genómico negativo del Cd es la inhibición de la reparación del DNA (Giaginis y cols., 2006), misma que es una causa de inestabilidad genómica (Hartwig y cols., 2002), lo que contribuye a procesos como: carcinogénesis, estrés oxidante, activación de protooncogenes, cambios en los patrones de metilación del DNA y desregulación de la expresión génica (Joseph, 2009). A nivel celular, el Cd afecta la proliferación, la diferenciación, los procesos de apoptosis y otras actividades fisiológicas de las células; de entre todos estos mecanismos, la interferencia del Cd en los mecanismos de reparación del DNA, así como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), parecen ser las causas más importantes de su toxicidad celular (Branca y cols., 2018).

2.7. Cadmio y pubertad

En adolescentes (de 12 a 14 años) que vivían en una área contaminada de Milazzo-Valle del Mela, en Italia, que manifestaron bajo volumen testicular y retraso en los caracteres sexuales secundarios (Interdonato y cols., 2015), de entre las concentraciones de varios metales pesados que se midieron, sólo mostraron niveles elevados los referentes a Cd, lo que sugiere que el aumento de Cd afecta el eje HHG en los varones y retrasa la pubertad (Interdonato y cols., 2014). Así, se ha observado que el aumento de las concentraciones de Cd provoca cambios notables en las edades puberales, determinadas con las etapas de Tanner para la edad cronológica. En donde se observa una reducción del volumen testicular y los niveles de T (Interdonato y cols., 2015). En ratas macho Wistar púberes, del DPN 35 a 49 se ha demostrado que el Cd afecta el control de varios procesos del desarrollo dependientes de FSH, LH y de T (Lamas y cols., 2017). Además, puede aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y puede causar efectos neurotóxicos probablemente debido a alteraciones bioquímicas en las células y cambios funcionales en el sistema nervioso central (SNC) (Lafuente y cols., 2001; 2004).

Estudios clásicos sugieren que los gonadotropos de ratas y de monos son altamente sensibles al Cd (Allanson y Deanesly, 1962; Girod, 1964; Lafuente, 2013). Además, se sabe que el Cd podría interactuar con el Pb en el retraso de la aparición y/o progresión de la pubertad, mediante la reducción de las concentraciones séricas de inhibina B en edades peripuberales (Gollenberg y cols., 2010).

Por otro lado, se ha reportado en algunos estudios, que el Cd es capaz de alterar la frecuencia de secreción y la vida media de la LH en ratas macho púberes (Lafuente y cols., 1999). Además, se sabe que dosis de 1 mg/kg de Cd en ratones CD-1 durante la exposición puberal de 35 días de vida, disminuye, tanto el peso de los testículos, como la concentración de T (Ji y cols., 2010). Otros estudios realizados en animales púberes con administraciones de 1 a 5 mg/Kg

de Cd en periodos de hasta un mes, han demostrado, además de la disminución en la concentración de T, disminución del volumen testicular y del epidídimo (Djuric y cols., 2015; Elmallah y cols., 2017).

En un estudio de los efectos del Cd en el descenso testicular y los marcadores de pubertad como lo es la SP, en las crías machos de rata Wistar tratados con 1 mg/Kg de Cd desde el nacimiento hasta la pubertad (35 y 49 DPN), reportó un retraso en el inicio de los marcadores de pubertad y una caída en los pesos de los órganos reproductores. Además, el Cd indujo efectos diferenciales sobre el sistema redox en órganos reproductivos y concentraciones bajas de T, concluyendo que estos efectos juegan un papel fundamental en el retraso del inicio de los marcadores de la pubertad (Hernández- Rodríguez y cols., 2021), afectando el desarrollo y madurez sexual de las ratas macho.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, uno de los grandes problemas que afectan la humanidad es la crisis por la contaminación. Las actividades antropogénicas han hecho estragos en el medio ambiente y, en consecuencia, se ha afectado a la salud en general. Si bien, se han reconocido varios contaminantes ambientales con efectos nocivos en el inicio de la pubertad, los metales pesados como el Cd se bioacumulan y puede alterar la función del eje HHG, lo cual acarrea graves consecuencias en la reproducción y en el desarrollo del individuo. Diversos estudios en animales y humanos demuestran que el Cd puede afectar de manera importante la salud reproductiva; sin embargo, aún quedan varias interrogantes que responder.

Tomando en consideración que aún no es claro el efecto del Cd sobre la expresión de genes en el hipotálamo que regulan el inicio de la pubertad, este trabajo se centra en analizar la expresión diferencial de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* hipotalámicos en ratas macho con retraso en la pubertad por exposición a Cd. Estos hallazgos proporcionarán datos de cómo el circuito neuronal

hipotálamico puede ser modificado por contaminantes ambientales como el Cd, comprometiendo la salud reproductiva y la fertilidad del individuo.

Con este tipo de investigaciones en este campo del conocimiento, creemos que se puede contribuir a la sensibilización contra el uso indiscriminado del Cd en la industria y a la importancia de frenar la contaminación del medio ambiente; y, por otro lado, a generar conocimiento sobre cómo el Cd, pudiera interferir en la expresión de genes cruciales en el inicio de la pubertad y su posible relación con el retraso en la pubertad, lo que puede repercutir en edad adulta en problemas reproductivos.

4. HIPÓTESIS

La exposición posnatal al Cd en las ratas macho afectará la expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* hipotalámicos, contribuyendo con el consecuente retraso de la pubertad.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* hipotalámicos en ratas macho con retraso en la pubertad por exposición a cadmio.

5.2. Objetivos específicos

En ratas macho:

- Confirmar el efecto del Cd sobre los indicadores de pubertad.
- Determinar el efecto del Cd sobre la somatometría testicular.
- Analizar la concentración de testosterona sérica.
- Analizar la bioacumulación de Cd en el tejido hipotalámico y sanguíneo.
- Determinar el efecto del Cd en la expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* hipotalámicos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estrategia metodológica

Ratas Wistar macho fueron separadas al azar, desde el nacimiento, en cuatro grupos de 6 individuos, cada uno. En el grupo 1 y 2, los sujetos experimentales fueron llevados hasta el día posnatal (DPN) 35 y fueron separados en control y tratados, respectivamente. En el grupo 3 y 4, los sujetos experimentales fueron llevados hasta el DPN 49 y fueron separados en control y tratados, respectivamente. A los grupos controles se les administró solución salina y a los grupos tratados 1.0 mg/kg de CdCl₂, por vía intraperitoneal (ip), en intervalos semanales, desde el DPN1. Durante el tratamiento se observó semanalmente la SP para determinar el inicio de la pubertad, además del peso y la talla de los animales. Una vez que los sujetos experimentales cumplieron la edad determinada en cada uno de sus grupos, se aplicó eutanasia por decapitación y se colectaron sangre, hipotálamos y testículos. La sangre se usó para extraer el suero y determinar la concentración de T mediante ELISA, y para cuantificación de Cd mediante espectrofotometría de absorción atómica, los hipotálamos se usaron para determinar la expresión de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1*, mediante RT-qPCR y para cuantificación de Cd por espectrofotometría de absorción atómica; y en los testículos se midió su peso, su largo y ancho, para calcular el volumen testicular y el índice gonosomático, tal y como se observa en la **Figura 8**.

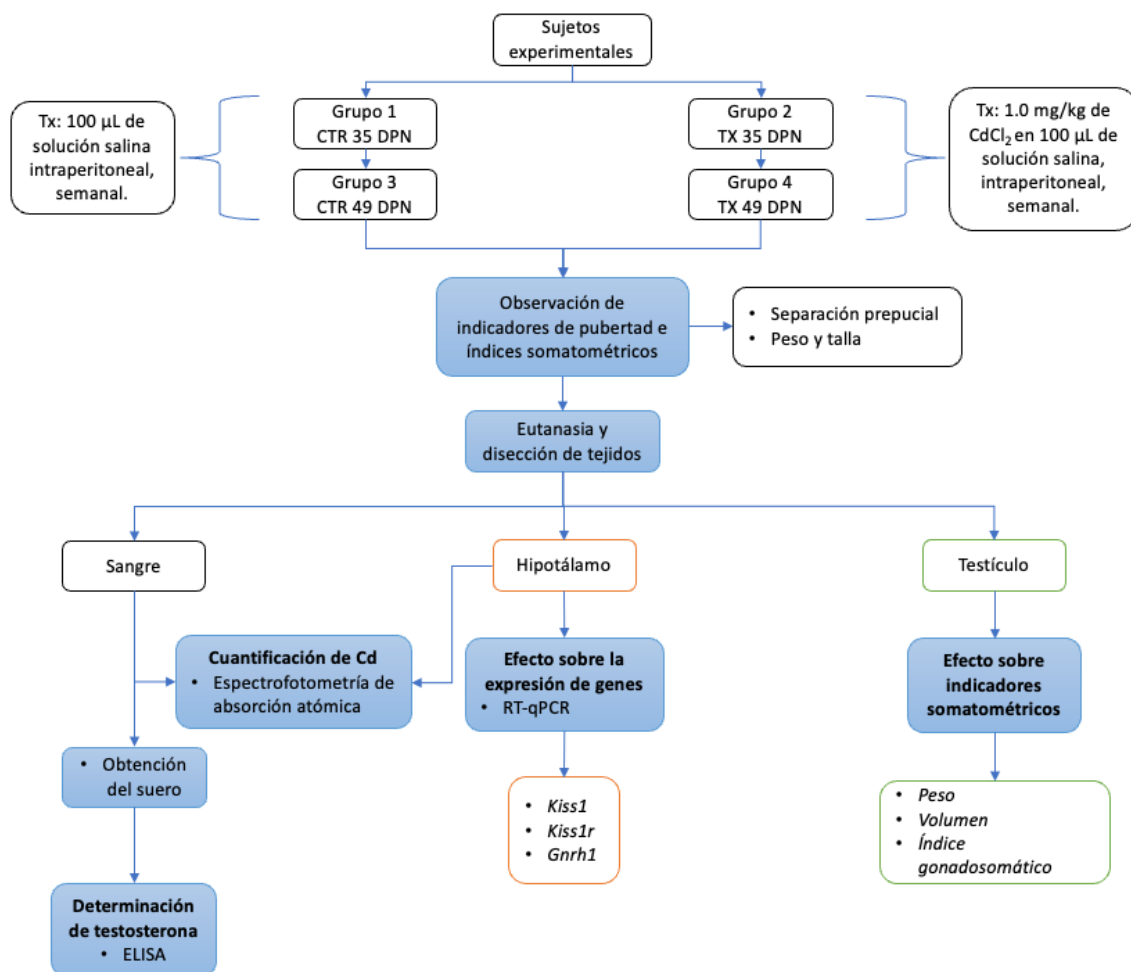


Figura 8. Diagrama metodológico. Se muestra como se dividieron los sujetos experimentales en cuatro grupos, el tratamiento y el resto de la estrategia metodológica que se siguió para completar los objetivos del estudio.

6.2. Sujetos experimentales

Ratas hembra de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de la UMADI de la DCBS de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, de cuatro meses de edad, con un parto previo y en estro natural, fueron colocadas en presencia de un macho sexualmente experto y se les permitió copular libremente. Posteriormente se revisó la presencia del tapón vaginal para asegurar que hubo eyaculación, a este día se le designó como el día 0 de gestación. A cada una de las hembras se le separó en una caja individual y fueron mantenidas en las siguientes condiciones: ciclos invertidos de luz-oscuridad de 12:12 horas (luz de

8:00 h a 20:00 h), con temperatura ambiente constante (24 °C) y con acceso *ad libitum* a comida (Purina®, Rodent Laboratory Chow) y agua.

En los días cercanos al término de la gestación, se revisaron a las hembras una vez al día, poniendo particular atención a la hora del nacimiento de las crías. Al nacimiento, las crías fueron separadas por género (sexadas) y pesadas. Los machos fueron separados en diferentes grupos y se mantuvieron con sus madres en las mismas condiciones ambientales que las hembras cuando se encontraban gestantes. Se destetaron a los 21 días, posteriormente fueron colocados en jaulas colectivas, en las mismas condiciones en las que fueron mantenidos en su infancia.

Cabe hacer mención, que todos los protocolos se realizaron con apego a lo estipulado en los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobados por el "Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Bioterio de la UAM" y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 denominada "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio".

6.3. Tratamiento

Para el esquema de administración del tratamiento, nos basamos en las etapas críticas del desarrollo posnatal de la rata, mismo que se compone por cinco periodos: neonatal, infantil, juvenil, peripuberal y madurez sexual; cada uno de los cuales tiene un cierto grado de sensibilidad a la exposición a disruptores endocrinos (Picut y cols., 2018), el presente trabajo se desarrolló hasta la etapa peripuberal. Se usó una dosis de 1.0 mg/kg de CdCl₂, que fue probada con anterioridad por Hernández-Rodríguez y cols. (2021) y que causó el retraso de los indicadores de la pubertad en la rata macho, misma que en este trabajo fue administrada en intervalos semanales –mismos que abarcan cada una de las

etapas críticas de desarrollo—. La dosis no debe llegar a ser tóxica, ni a interferir con el desarrollo de los sujetos de experimentales.

Las dosis que se usaron son las siguientes:

- Controles: 100 µL de solución salina, administrada por vía ip en intervalos semanales, desde el día uno posnatal y hasta el día de la eutanasia.
- Tratados: 1.0 mg/kg de CdCl₂, disuelto en 100 µL de solución salina, administradas por vía ip en intervalos semanales, desde el día uno posnatal y hasta el día de la eutanasia.

6.4. Asignación de grupos y administración del tratamiento

Las crías macho, al nacimiento, fueron asignadas al azar a cada uno de los siguientes cuatro grupos, para la administración del tratamiento en intervalos semanales:

- Grupo 1 = Control, inyección ip de solución salina semanal a 6 machos hasta los 35 días de vida.
- Grupo 2 = Tratado, inyección ip de 1.0 mg/kg de CdCl₂ semanal a 6 machos hasta los 35 días de vida.
- Grupo 3 = Control, inyección ip de solución salina semanal a 6 machos hasta los 49 días de vida.
- Grupo 4 = Tratado, inyección ip de 1.0 mg/kg de CdCl₂ semanal a 6 machos hasta los 49 días de vida.

6.5. Separación prepucial

Los sujetos de cada uno de los grupos, correspondientes a grupo control o tratado, fueron pesados, medidos y posteriormente inyectados en el esquema ya descrito. Durante el periodo de administración se observó y registró el momento de la SP, como indicador de pubertad. Además, se llevó un seguimiento de pesos y tallas para el posterior cálculo del índice gonadosomático.

6.6. Análisis de los parámetros somatométricos

Previo a la eutanasia y con los sujetos experimentales sedados, se procedió a pesarlos y medirlos, de la punta de la nariz a la punta de la cola. Para el análisis somatométrico testicular, se llevó a cabo la eutanasia a los sujetos en cuanto terminaron el tratamiento, de uno en uno, se decapitaron en la guillotina, la cual se dejó perfectamente limpia entre cada uno de ellos, y se mantuvieron distantes al grupo para que las demás ratas no percibieran el olor a la sangre y el peligro. Posteriormente, se disecaron los testículos, se pesó el testículo derecho de cada animal, fue medida su longitud, se midió el ancho y, posteriormente, se calculó el volumen testicular (VT) mediante la fórmula propuesta por Lambert, la cual considera al testículo como un elipsoide rotacional en el que dos de sus ejes son iguales, y la razón entre la longitud y el ancho es fija (Chipkevitch y cols., 1996; Chin y cols., 1998):

$$VT = 0.71 * (L * A^2)$$

En donde:

L = longitud del testículo (cm).

A = ancho del testículo (cm).

También se determinó el índice gonadosomático, como una relación entre el peso corporal del sujeto experimental y el peso del testículo, para analizar el efecto del esquema administrado de $CdCl_2$ sobre los sujetos experimentales. Para tal fin se utilizó la siguiente fórmula, tomadas de Paramanik y cols., 2018:

$$\text{índice gonadosomático} = \frac{\text{Peso de los testículos}}{\text{Peso corporal}} * 100$$

El análisis de los indicadores de desarrollo y de pubertad, de los parámetros somatométricos, junto con la concentración sérica de T, fueron

cruciales para la determinación de la dosis que cumplía con los requerimientos del proyecto.

6.7. Obtención de las muestras de hipotálamo

Se aplicó eutanasia por decapitación a los sujetos experimentales, una vez cumplidos los tiempos de edad y tratamiento. Se procedió a coleccionar la sangre en tubos BD Vacutainer® con EDTA K2 (REF 368171) para guardar la sangre destinada a cuantificación de Cd y en tubos BD Vacutainer® SST™ para suero con gel separador (REF 368159) para la obtención del suero sanguíneo destinado a cuantificación de testosterona.

La sangre en tubos BD Vacutainer® SST™ para suero con gel separador (REF 368159) se centrifugaron a 2,500 r.p.m. durante 10 minutos para separar el suero y se hicieron alícuotas de 400 µL, las cuales se guardaron en congelación a -20 °C para el posterior análisis de la concentración de T sérica. Para la cuantificación de Cd en tejido hipotalámico, se disecaron los hipotálamos y fueron colocados en tubos de ensayo de polipropileno, previamente tratados con ácido nítrico, se etiquetaron y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta el día de la cuantificación.

En el caso de los tejidos hipotalámicos destinados a análisis de RT-qPCR, se realizó eutanasia por decapitación sin sedación y se disecaron los hipotálamos, se congelaron en hielo seco y se conservaron en microtubos Eppendorf® de 1.5 mL a -80 °C hasta el día de la extracción de RNA total.

6.8. Determinación de testosterona en suero sanguíneo

La determinación de la concentración de testosterona en suero sanguíneo se realizó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), se empleó un kit comercial Testosterone ELISA (REF EIA-1559) de *DRG® International, Inc., USA*. La placa multipocillos se encuentra forrada con anticuerpo monoclonal anti-T. La T libre endógena de cada una de las muestras

competirá con un conjugado de T-peroxidasa de rábano para unirse al anticuerpo que recubre la placa. Después de la incubación, el conjugado no unido se elimina mediante lavado. La cantidad de conjugado de peroxidasa unida es inversamente proporcional a la concentración de T libre en la muestra. Después de la adición de la solución de sustrato, la intensidad del color desarrollado será inversamente proporcional a la concentración de T libre en la muestra.

Se procedió a descongelar el suero sanguíneo de los sujetos experimentales –previamente obtenido, mediante los métodos antes expuestos–, a temperatura ambiente; asimismo, se procedió a poner el kit a temperatura ambiente, para poder comenzar el ensayo. En la placa multipocillos forrada con anticuerpo monoclonal anti-T, proporcionada por el fabricante, se procedió a cargar 25 μ L de las soluciones estándar (0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 6.0 y 16.0 ng/mL de T), por duplicado, para la construcción de la curva estándar. Se prosiguió a cargar 25 μ L de muestra de suero por cada sujeto experimental, de cada uno de los grupos, por cada uno de los pocillos, por duplicado; se continuó a dispensar 200 μ L de *Enzyme Conjugate* a cada uno de los pocillos, se mezcló durante 10 s y se dejó incubar durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se sacudieron enérgicamente los pocillos para verter su contenido y se continuó con su lavado, agregando 300 μ L de *Wash Solution* a cada pocillo, por tres repeticiones; una vez terminados los lavados, se dio un golpe seco a la placa sobre papel absorbente, para eliminar las gotas residuales que pudieron quedar. El siguiente paso fue agregar 200 μ L de *Substrate Solution* a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática fue detenida mediante la adición de 100 μ L de *Stop Solution* a cada uno de los pocillos.

La densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo fue determinada mediante un espectrofotómetro para multiplacas Multiskan™ GO ThermoScientific™ a 450 nm, dentro de los 10 min posteriores a la adición de la *Stop Solution*. Los resultados fueron calculados mediante una curva estándar en Excel®.

6.9. Cuantificación de Cd en el hipotálamo

Para la cuantificación de la concentración de Cd en hipotálamo, a cada una de las muestras de tejido previamente conservadas en tubos de polipropileno, se les agregó una porción de X5 volúmenes de ácido nítrico, con respecto al peso de tejido, para llevarse a cabo la digestión durante 7 días, posteriormente, se tomó una alícuota de la digestión y se diluyó de la siguiente manera: a) controles, dilución 1:20 v/v (50 μ L de la digestión y 950 μ L de ácido de curva), y b) tratamientos 1.0 mg/kg CdCl₂ en una dilución 1:50 v/v con ácido de curva (20 μ L de la digestión y 980 μ L de ácido de curva), para realizar las lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica. Todos los datos fueron registrados y transformados de acuerdo con el factor de dilución empleado. Para cada análisis, se utilizó una curva de calibración construida con valores conocidos (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 μ g/L), y con un estándar de control de calidad conocido para Cd (GFAA Stock mix standard, 5 μ g/mL), que fue determinado al inicio y final de la corrida de las muestras, para optimizar las condiciones y validación de los resultados. El contenido de Cd se expresó como μ g de Cd/g de tejido húmedo. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer®, Modelo Aanalyst 600; Norwalk, CT, USA), mediante espectrofotometría de absorción atómica con un horno de grafito y un automuestreador.

6.10. Análisis de la expresión del mRNA de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1*

Extracción de RNA total, retrotranscripción y qPCR

Los hipotálamos, previamente disecados, fueron homogenizados a mano con pistilo para moler tejidos y se lisaron con QIAzol™ para, posteriormente, continuar con la extracción de RNA con un kit comercial RNeasy® de QIAGEN®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron resuspendidas en 30 μ L de agua grado biología molecular. La pureza y cuantificación de las

muestras se realizó por medio de espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific™) al medir la densidad óptica a 260 nm. La integridad fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0 %. Las reacciones de RT se realizaron con un kit comercial TaqMan™ Reverse Transcription Reagents (ThermoFisher® Scientific N8080234), 100 ng/μL de mRNA, 2.0 μL de RTBuffer (10x), 1.4 μL MgCl₂ (25 mM), 4.0 μL dNTPs (10 mM), 1.0 μL Oligo DT₁₆ (50 μM), 1.0 μL inhibidor de RNasa (20 U/μL) y 1.0 μL MultiScribe RT (50U/μL) y H₂O dd a un volumen total de 20 μL. Las condiciones del termociclador fueron a 65 °C durante 5 min, 4 °C a 2 min, 37 °C durante 30 min, 95 °C a 5 min y 4 °C. El cDNA se almacenó a -20 °C.

Por otra parte, las reacciones de qPCR fueron realizadas con kit TaqMan® Gene Expression Master Mix de *Applied Biosystems*® agregando 5 μL de Master mix, 0.5 μL sonda Taqman (específica al gen de interés), 2 μL del producto de RT y H₂O dd (libre de nucleasas) a un volumen total de 10 μL. Las reacciones fueron evaluadas en un termociclador *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.)* en las siguientes condiciones: 95 °C a 10 min, 40 ciclos de 95 °C a 15 seg y 60 °C a 1 min.

Con la amplificación obtuvimos el parámetro Ct (ciclo umbral). Este valor es el ciclo de amplificación, en el que se detecta un aumento significativo de la fluorescencia, coincidiendo en el valor “*threshold*”. La expresión génica relativa del RNA se determinó con el método comparativo Fold change: $2^{-\Delta\Delta CT}$, que permitió comparar la cantidad del control endógeno, en nuestro caso *Gapdh*, con respecto a la del gen de interés.

Tabla 2. Nombre, números de catálogo e ID de las sondas utilizadas para la presente investigación.

Catálogo	Gen	Descripción
<u>4331182</u>	<i>Kiss1</i>	TaqMan Gene Expression Assay (FAM) Target species: Rat

		ID: Rn00710914_m1
<u>4331182</u>	<i>Kiss1r</i>	TaqMan Gene Expression Assay (FAM) Target species: Rat
		ID: Rn00576940_m1
<u>4331182</u>	<i>Gnrh1</i>	TaqMan Gene Expression Assay (FAM) Target species: Rat
		ID: Rn00562754_m1
<u>4331182</u>	<i>Gapdh</i>	TaqMan Gene Expression Assay (FAM) Target species: Rat
		ID: Rn01775763_g1

6.11. Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como la media \pm desviación estándar (SD). La significación estadística para la SP se analizó mediante una t de Student no pareada, el resto se analizó usando un ANOVA de dos vías con prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism® (versión 9.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Separación prepucial

Al comparar el efecto del Cd sobre la SP y relacionarla con el peso corporal al momento de la observación, se observó el retraso de la SP de los sujetos experimentales tratados con Cd, pues al DPN 49 se encontró un retraso de una semana en la SP, en comparación con su grupo control, lo que puede observarse en el peso corporal que fue mayor en los sujetos tratados que en los sujetos controles. Cabe mencionar que no fue posible observar la SP en los grupos del

DPN 35, debido a que se les aplicó la eutanasia antes del momento de ocurrencia de la SP (**Figura 9**).

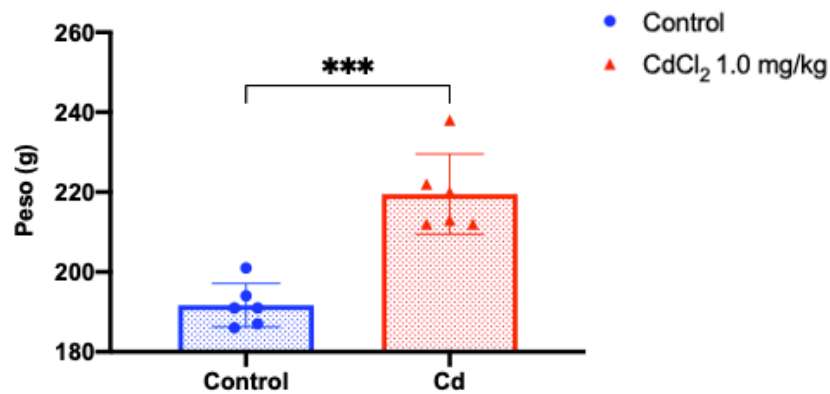


Figura 9. Efecto del Cd sobre la SP y el peso corporal al momento de la observación, al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($x \pm SD$), $n = 6$ animales por grupo. Se realizó una t de Student no pareada para observar la significancia.*** $p < 0.0001$.

7.2. Análisis de los parámetros somatométricos

En cuanto al efecto del Cd sobre el peso corporal se encontraron diferencias significativas al DPN 49 al comparar entre tratados y controles. De igual forma ocurrió al comparar entre grupos controles, en donde el mayor incremento ocurre al DPN49 cuando el peso casi se duplicó; algo similar ocurrió al comparar entre los grupos tratados, en donde el mayor incremento ocurre en el grupo de mayor edad, lo que es correspondiente al crecimiento somático de los individuos (**Figura 10A**).

En el caso de la talla, se mostraron diferencias entre los grupos para ambas edades, al comparar los sujetos tratados con sus respectivos controles; al hacer la comparación entre controles, se observaron diferencias significativas en el grupo de mayor edad; lo mismo ocurrió al compararse entre los grupos tratados, lo que corresponde al crecimiento de los individuos (**Figura 10B**).

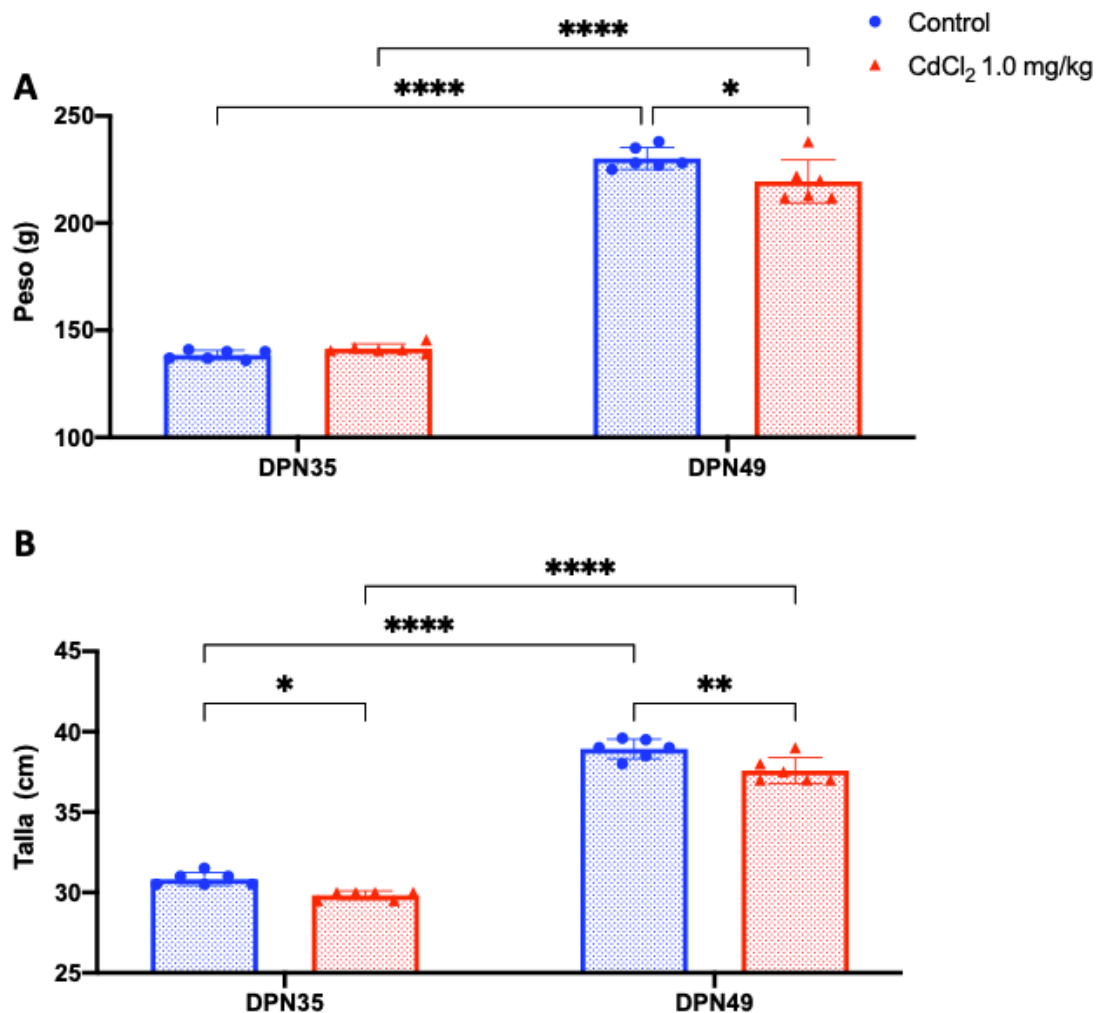


Figura 10. Peso corporal (A) y talla (B) de los sujetos experimentales al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm SD$), $n = 6$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Al observar el efecto del Cd sobre el peso testicular, encontramos diferencias significativas al DPN 49 en el grupo tratado, ya que el peso disminuyó a valores por debajo de la mitad respecto a su control; lo mismo ocurrió al compararse los sujetos controles, en donde se observa un incremento en el grupo de mayor edad. Esto mismo ocurre al compararse los grupos tratados, sin embargo, el peso es mayor al DPN 35 (**Figura 11A**).

En cuanto al volumen testicular, al DPN 49 observamos diferencias significativas en el grupo tratado respecto de su grupo control; lo mismo ocurrió

al compararse entre controles, pues hay un incremento pronunciado al DPN 49, respecto al DPN35 que corresponde al crecimiento testicular, dado por la edad de los sujetos (**Figura 11B**).

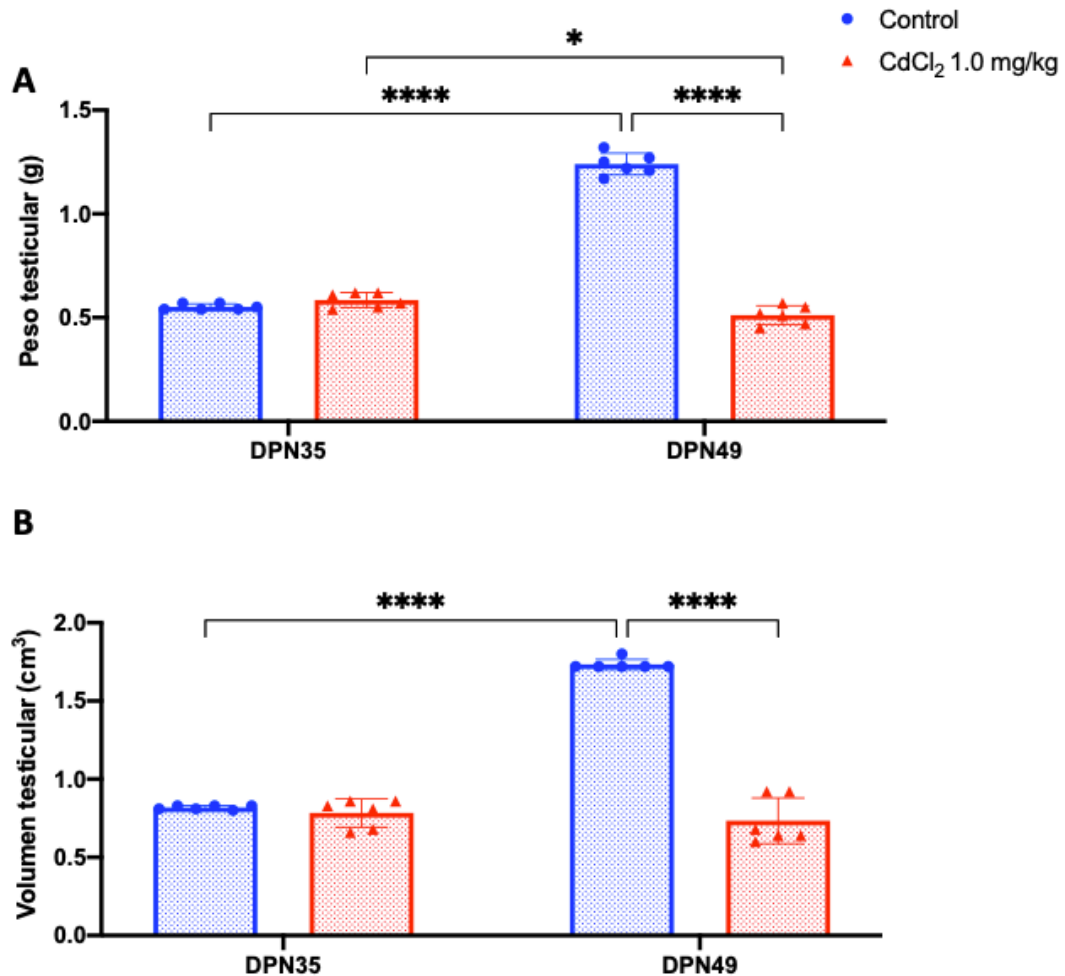


Figura 11. Efecto del Cd sobre el peso (A) y el volumen testicular (B) al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm SD$), $n = 6$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, **** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$.

Al visualizar los efectos del Cd sobre el índice gonadosomático, encontramos diferencias significativas al DPN 49 en el grupo tratado, pues el valor del índice disminuyó en comparación con su grupo control; al compararse entre controles, encontramos diferencias significativas, pues hay un incremento al DPN49. Al comparar entre los grupos tratados, se observa un efecto más

pronunciado al DPN 49, pues el índice disminuyó con respecto al DPN35 (**Figura 12**).

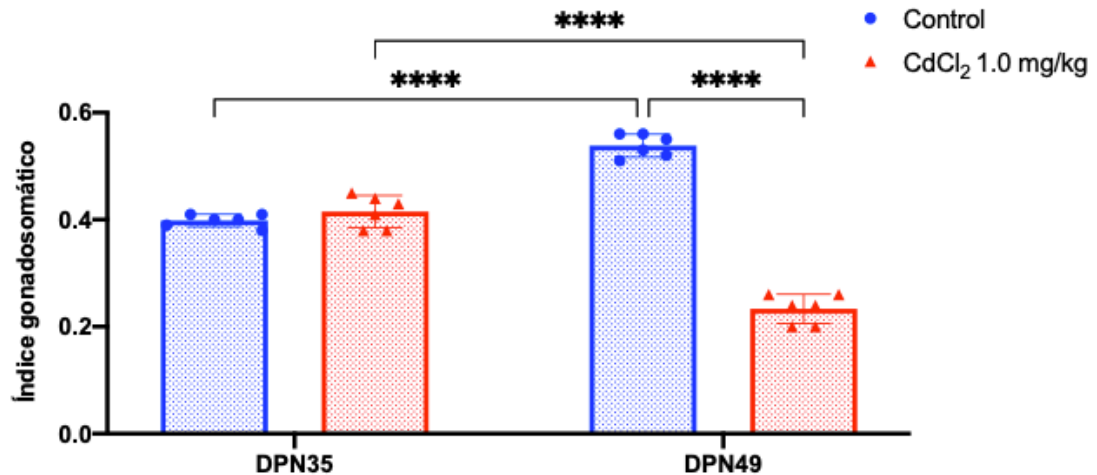


Figura 12. Efecto del Cd sobre el índice gonadosomático al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm SD$), $n = 6$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, **** $p < 0.0001$.

7.3. Concentración de testosterona en suero sanguíneo

En relación con los efectos del Cd en las concentraciones séricas de T, al DPN 35 se observa una tendencia a la baja en el grupo tratado, aunque no se encontraron diferencias significativas con su grupo control. Al DPN 49, se mostró un claro descenso de sus valores, al compararse los sujetos tratados con su respectivo grupo control. Al compararse entre controles se observó un claro incremento al DPN 49 respecto al DPN 35; lo mismo ocurre al compararse entre los grupos tratados, en donde se encontraron diferencias significativas, pues se presenta mayor concentración sérica de T al DPN 49 (**Figura 13**).

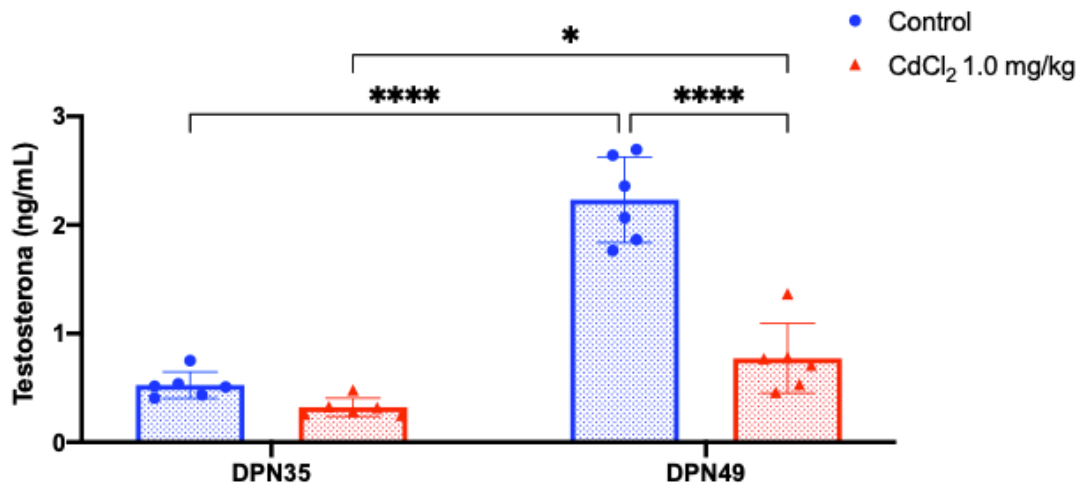


Figura 13. Efecto del Cd sobre las concentraciones séricas de testosterona al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($x \pm SD$), $n = 6$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, **** $p < 0.0001$, * $p < 0.5$.

7.4. Cuantificación de Cd en el hipotálamo y sangre

Al observar los valores referentes a las concentraciones de Cd en el tejido hipotalámico, al DPN 35 se observó claramente que la concentración fue mayor en el grupo tratado respecto a su grupo control, por lo que encontramos diferencias significativas. Lo mismo ocurrió al DPN 49, pues las concentraciones del grupo tratado tuvieron mayores concentraciones de Cd en comparación con el grupo control. Al compararse los grupos tratados, se encontraron diferencias significativas al DPN 49 con concentraciones mayores de Cd (**Figura 14A**).

Asimismo, las concentraciones de Cd en sangre del grupo tratado al DPN 35 presentó diferencias significativas con su grupo control. Esto mismo ocurrió entre los grupos al DPN 49; además, al comparar entre los grupos tratados, se encontró que al DPN 49 se observó un incremento en la concentración de Cd respecto al DPN 35 (**Figura 14B**).

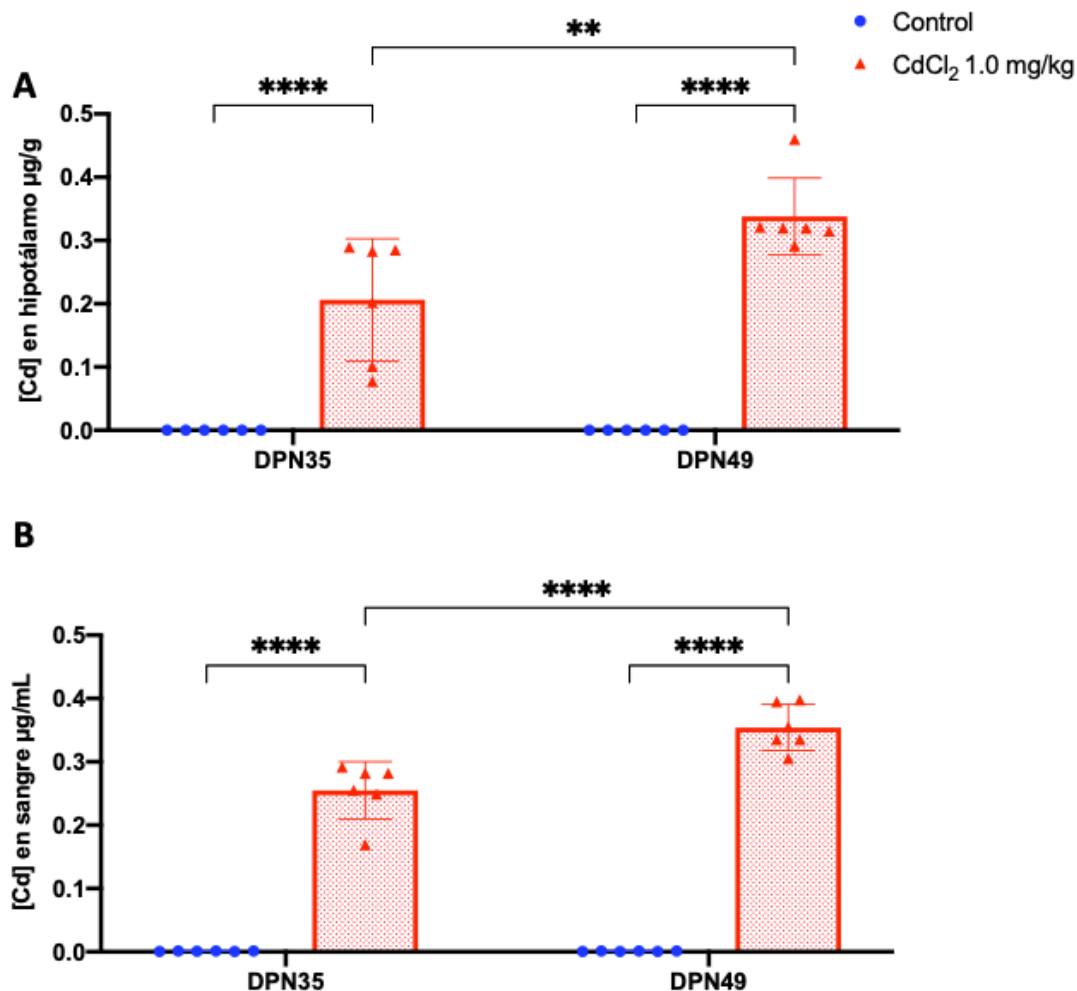


Figura 14. Concentraciones de Cd en tejido hipotalámico (A) y sanguíneo (B) al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($x \pm SD$), $n = 6$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$.

7.5. Expresión relativa del mRNA de los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1*

En el análisis de la expresión relativa del mRNA del gen *Kiss1*, se observó que al DPN 35 hubo una disminución en la expresión relativa de este gen en los sujetos experimentales del grupo tratado con Cd al compararse con su grupo control. Este mismo efecto se observó en los sujetos al DPN 49, aunque no se presentaron diferencias significativas con su grupo control. No se presentaron cambios en este parámetro con la edad (**Figura 15**).

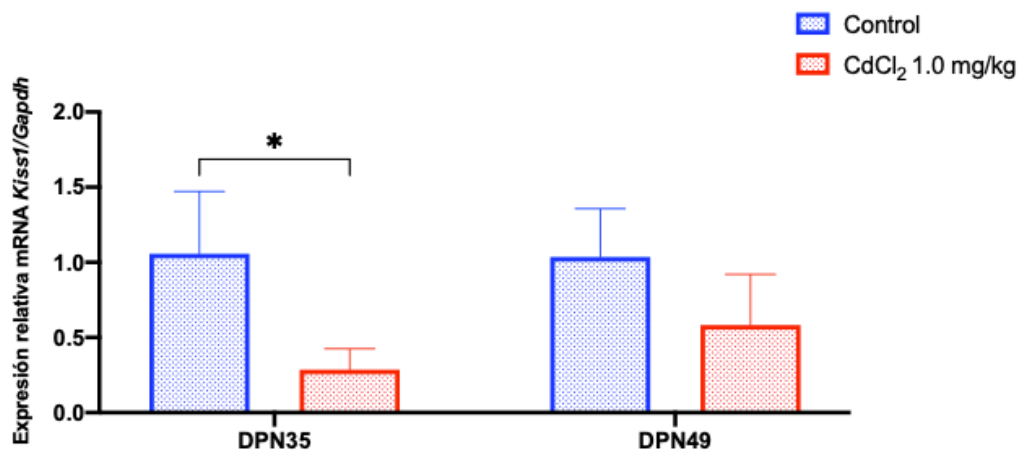


Figura 15. Expresión relativa del gen Kiss1. Se presentan los valores de la expresión al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($x \pm SD$), $n = 4$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, * $p < 0.05$.

Por otro lado, el efecto del Cd sobre la expresión relativa del mRNA del gen *Kiss1r*, se observó una tendencia a la disminución en la expresión relativa del gen al DPN 35, en los sujetos tratados con Cd. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas al compararlos con su grupo control. Al DPN 49, se observaron diferencias significativas, al presentarse una disminución en la expresión de los sujetos tratados al compararse con su grupo control (Figura 16).

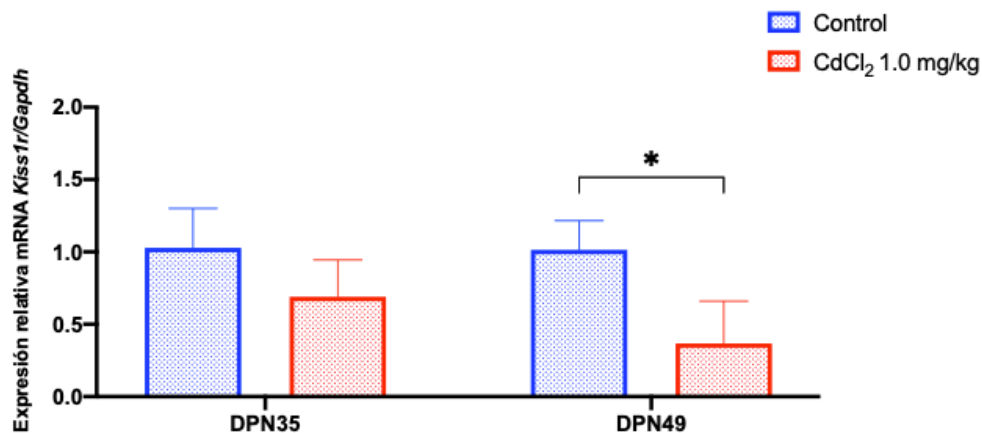


Figura 16. Expresión relativa del gen Kiss1r. Se presentan los valores de la expresión al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($x \pm SD$), $n = 4$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, * $p < 0.05$.

Con respecto al efecto del Cd sobre la expresión relativa del mRNA del gen *Gnrh1*, en el DPN 35 se observó una tendencia hacia la disminución en la expresión relativa del gen en los sujetos tratados con Cd, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al compararlos con su grupo control. Al DPN 49, de nueva cuenta y en concordancia con la caída del receptor *Kiss1r* se presentó una disminución en la expresión, pues se observaron diferencias significativas al compararlos con su respectivo grupo control (**Figura 17**).

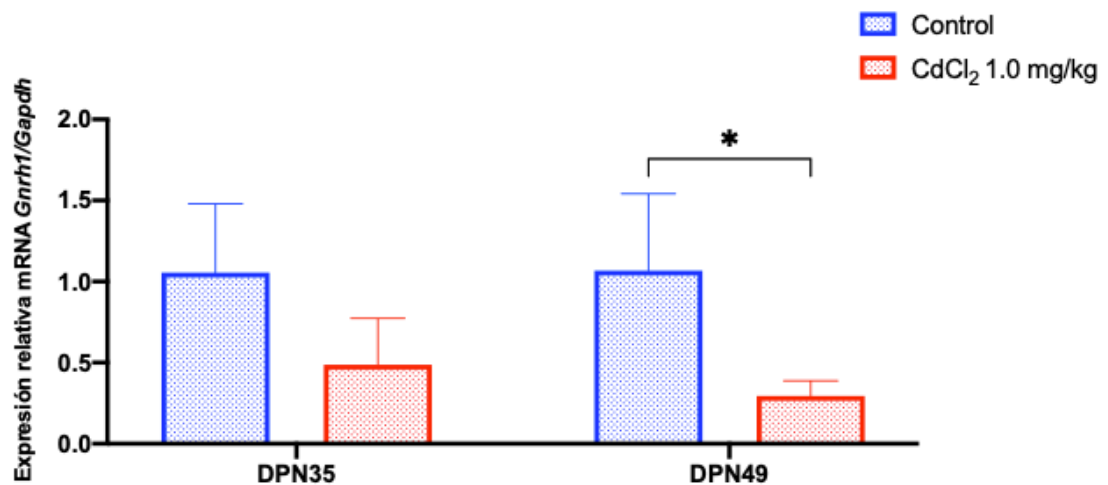


Figura 17. La exposición posnatal a Cd afecta la expresión relativa del gen *Gnrh1*. Se presentan los valores de la expresión al DPN 35 y al DPN 49. Cada columna representa la media \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm SD$), $n = 4$ animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey, * $p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

La pubertad es un evento del desarrollo que culmina con la adquisición de la madurez sexual y la capacidad reproductiva. Se sabe, que el ritmo de la pubertad está dictado por la interacción dinámica entre factores tanto genéticos como ambientales, por lo que la perturbación de dicha interacción a menudo resulta en el desarrollo inadecuado del eje HHG, lo que comúnmente conduce a

alteraciones en el inicio de la pubertad —pubertad precoz, tardía o ausente— (Castellano y Tena-Sempere, 2017).

Por otro lado, la pubertad es altamente susceptible a los efectos de los contaminantes ambientales, estas sustancias químicas se denominan disruptores endocrinos y tienen la capacidad de ejercer sus efectos a través de diferentes mecanismos como los receptores hormonales, la acción directa sobre las vías de señalización celular, acción sobre el sistema neuroendocrino; así como por la supresión de la síntesis de hormonas o por sus efectos tóxicos en los órganos relevantes (Özen y Darcan, 2011). Es importante mencionar que el Cd es considerado un disruptor endócrino (Takiguchi y Yoshihara, 2006) y se han reportado sus efectos nocivos sobre la pubertad, específicamente en el retraso de esta etapa en los humanos (Interdonato y cols., 2015) y sobre el retraso de los indicadores de pubertad en la rata macho (Hernández-Rodríguez y cols., 2021).

En el presente trabajo se observó la SP como indicador de pubertad en los sujetos experimentales, este parámetro sólo fue posible de observar en el DPN 49, ya que ocurre aproximadamente en el DPN 41 al 47 (**Figura 9**). En los individuos tratados con Cd, se tuvo un retraso de una semana en su aparición en comparación con su grupo control, estos resultados son semejantes con los resultados presentados por Hernández-Rodríguez y cols. (2021), quienes encontraron un retraso de 6 días en este índice de pubertad, en ratas macho al DPN 49 tratados con Cd.

La separación entre las superficies epiteliales de la mucosa prepucial y la mucosa del glande del pene se debe a la cornificación de las células del revestimiento epitelial, bajo el influjo de la T (Picut y cols., 2017), como se observa en la **Figura 13**, los niveles de T en el grupo tratado con Cd al DPN 49, son significativamente más bajos en comparación con su grupo control, sin embargo no son inexistentes, por lo que podemos adjudicar el retraso en la SP a los bajos niveles de T que presentan los sujetos expuestos al Cd.

Por otro lado, la exposición al Cd provocó diferencias significativas en el peso corporal de nuestros sujetos tratados al DPN 49, al compararlos con su grupo control (**Figura 10A**); este efecto que no se observó al DPN 35, lo que nos sugiere que a mayor tiempo de exposición al metal se incrementa el efecto negativo sobre el peso corporal. Sin embargo, de forma contraria, Hernández-Rodríguez y cols. (2021), no reportan diferencias significativas en el peso de sus grupos al DPN35, ni al DPN 49, con una administración de una dosis de 1.0 mg/Kg de CdCl₂, misma que se utilizó en este estudio, pero con la diferencia de que fue administrada diariamente. De igual forma, de Souza y cols., 2010, tampoco mostraron diferencias significativas en ratas Wistar macho adultas, expuestas a una dosis única de 1.0 mg/Kg de CdCl₂, a las que se les practicó eutanasia entre los días 7 a 56 postratamiento. Hwang y Wang en el 2001, reportaron diferencias significativas en el peso corporal de ratas Wistar macho expuestas a Cd en su dieta, a una dosis de 300 partes por millón (ppm), estas diferencias fueron observadas desde la segunda semana postratamiento y persistieron en la cuarta, sexta y octava semanas, en las que fueron monitoreados los pesos. Boughammoura y cols. en el 2020, estudiaron el efecto del Cd en ratas Wistar macho, expuestas desde el día de gestación (DG) 0 y hasta el DPN 21 a 50 mg/L de CdCl₂ en el agua de beber, a través de sus madres; y encontraron diferencias significativas en el peso de los sujetos expuestos a Cd al compararlos con su control al DPN 21, sin embargo, al DPN 35, 49, 63 y 70, ya no se observaron diferencias significativas en el peso, pero se mantuvo una tendencia a la baja en los animales expuestos. Luo y cols. en 2015, reportaron que en ratas Sprague-Dawley, machos y hembras, expuestas a 1 ppm (1 mg/L), 5 ppm (5 mg/L) y 10 ppm (10 mg/L) de CdCl₂ en el agua de beber, desde el DG 0 y hasta el DPN 21, observaron diferencias significativas en los sujetos expuestos a 5 ppm y 10 ppm, en la semana posnatal (SPN) 5 y 7, que corresponden a los DPN 35 y DPN 49, respectivamente, y dejaron de presentar diferencias significativas a partir de la SPN 9 y se mantuvieron así, —e incluso

llegaron a ganar más peso los sujetos que fueron expuestos al Cd— hasta la SPN 12, en la que finalizó el experimento.

Estos datos nos permiten proponer que el Cd puede tener un efecto diverso en el peso de los sujetos experimentales, que parece depender de factores tales como: la dosis, la vía de administración y el tiempo de exposición; incluso, como lo fue en este estudio, fue más evidente el efecto con un esquema de administración a intervalos semanales, —en donde los individuos expuestos al DPN35 recibieron seis dosis de 1.0 mg/Kg de CdCl₂ y al DPN 49 recibieron ocho dosis— que en un esquema de administración diario, en el que el individuo al DPN 49 recibe en total cuarenta y nueve dosis de 1.0 mg/Kg de CdCl₂. Otro efecto que resaltar es el que obtuvieron Luo y cols. 2015, quienes usaron dosis de 1 mg/L, 5 mg/L y 10 mg/L de CdCl₂, mismas que resultan ser más bajas en comparación con la dosis usada por Boughammoura y cols. 2020 de 50 mg/L de CdCl₂, y que usando un mismo esquema de administración, que abarcó la gestación y la lactancia, observándose, un efecto adverso más pronunciado sobre el peso corporal, en las dosis más bajas de Luo y cols. 2015.

Respecto a la talla, en los sujetos expuestos al Cd se observan diferencias significativas al compararlos con su control, al mostrar una disminución en este parámetro, tanto al DPN 35 como al DPN 49 (**Figura 10B**). Estos resultados son concurrentes a los mostrados por Luo y cols. 2015, quienes observaron una disminución en la talla de sus sujetos experimentales expuestos a 5 ppm y 10 ppm de Cd, a la SPN 5 y 7, que corresponden a los DPN 35 y DPN 49, respectivamente. Boughammoura y cols. 2020, muestran una disminución significativa en la longitud craneo-caudal de sus sujetos expuestos al Cd en la gestación y la lactancia, en el DPN 21, única edad en la que fue medida.

Los efectos en el peso corporal y en la talla, antes descritos, podrían deberse a que el Cd tiene un efecto adverso sobre el desarrollo óseo de los individuos expuestos, ya que se ha reportado que este metal tiene un efecto de disruptor en el metabolismo del Zinc, lo que conduce a una disminución de la transcripción de genes implicados en la formación de hueso, dando como

resultado una interrupción del crecimiento corporal, lo que podría verse reflejado en el peso y en la talla de los animales expuestos (Boughammoura y cols., 2020). Por otro lado, la T también tiene un papel muy importante en el crecimiento, desarrollo y el metabolismo de los individuos (Ren y cols., 2019). En el presente trabajo encontramos una disminución pronunciada en la concentración de T en los individuos expuestos al Cd, por lo que los efectos negativos sobre el peso y la talla, podrían estar relacionados con la baja de T; más adelante se hará énfasis en el papel del Cd sobre la T.

Por otra parte, al analizar los efectos de la exposición posnatal al Cd sobre el peso del testículo, se observó una disminución significativa al día 49 DPN al compararlo con su grupo control. No ocurrió lo mismo al día 35 DPN, en donde no se observaron diferencias significativas al compararse entre grupos (**Figura 11A**), lo que sugiere que el Cd en nuestro esquema de administración es mucho más profundo a mayor tiempo de exposición. Nuestros resultados son similares a los que obtuvieron Hernández-Rodríguez y cols. 2021, pero sólo al DPN 49, ya que ellos sí muestran diferencias significativas desde el DPN 35, lo que no ocurre en este estudio. Esta diferencia podría radicar en su esquema de administración diaria, lo que nos podría indicar que el testículo es más susceptible al daño ocasionado por una administración prolongada al Cd, sin embargo, el efecto al DPN 49 resulta ser muy semejante en nuestros resultados —Control 1.240 ± 0.052 , Cd 0.512 ± 0.046 — y en los de Hernández-Rodríguez —Control 1.612 ± 0.010 , Cd 0.785 ± 0.098 —. Ekhoje y cols. en 2013 reportaron un efecto adverso del Cd en el peso testicular de ratas Wistar macho que comenzaron el tratamiento entre las 12 y las 14 semanas de edad, en sus grupos administrados con 15mg/L, 20mg/L y 25mg/L de CdCl₂ en el agua de beber, tratados durante seis semanas, al compararlos con su grupo control observaron diferencias significativamente menores en los grupos tratados con 20mg/L y 25mg/L.

En el esquema unidosis presentado por de Souza y cols. 2010, no se muestran diferencias significativas en el peso testicular en su grupo tratado con 1.0 mg/Kg de CdCl₂ ni a los 7 días, ni a los 56 días postratamiento; en contraste

con su grupo tratado con 1.2 mg/Kg de CdCl₂, el cual sí muestra efectos y coinciden con nuestros resultados, pues en ese caso, sí observaron diferencias significativamente menores en el peso del testículo, tanto a los 7 días, como a los 56 días postratamiento. Esto demuestra que un leve incremento en la dosis de Cd es suficiente para incrementar el daño en el testículo, mismo que no es capaz de recuperarse, ni siquiera al transcurrir 56 días postratamiento, lo que resulta sumamente interesante.

Este efecto del Cd sobre el peso del testículo ha sido reportado por otros autores como Luo y cols. 2015; y por Biswas y cols. 2001; quienes encontraron efectos semejantes a los que en este estudio encontramos, independientemente del esquema de administración, la vía de administración y el tiempo de administración, los efectos sobre el peso del testículo resultan ser muy similares.

Algo parecido ocurre con el volumen testicular, pues encontramos que el Cd disminuye este parámetro al DPN 49, en el cual encontramos diferencias significativamente menores en el grupo tratado con Cd al compararlo con su respectivo control; y no ocurre lo mismo al DPN 35, pues no encontramos diferencias significativas al compararse entre estos grupos (**Figura 11B**). Ekhoje y cols., 2013, reportaron un descenso en el volumen testicular en sus grupos tratados con 15mg/L, 20mg/L y 25mg/L de CdCl₂, mostrando diferencias significativas al compararlos con su control, estos resultados son similares a los que encontramos en el presente trabajo.

En relación con el índice gonadosomático, en el cual nos referimos a una relación entre el peso del testículo y peso corporal del individuo, mismo que nos permite observar sus variaciones en el tiempo. Se observa que el Cd tiene un efecto negativo sobre este índice, pues al DPN 49 existen diferencias significativas al compararse con su grupo control. Al DPN 35 no se encontraron diferencias significativas al compararse con el control (**Figura 12**). Estos valores son consistentes a los reportados anteriormente en el peso testicular y el peso corporal de los sujetos tratados, pues se encuentran estrechamente relacionados en este parámetro. Nuestros resultados en este índice son semejantes a los

presentados por Hernández-Rodríguez y cols. 2021, quienes encontraron que al DPN 49, existen diferencias significativas en su grupo tratado con Cd, pues obtuvieron valores menores que sus controles. Sin embargo, sí encontraron diferencias significativas en su grupo al DPN 35, lo que no sucedió en nuestro grupo de la misma edad, lo que podría deberse a la diferencia en el esquema de administración. De Souza y cols. 2010, muestran, de manera similar a nuestros resultados, un índice gonadosomático con diferencias significativamente bajas en el grupo tratado con 1.2 mg/Kg de CdCl₂, que persiste tanto a los 7 días, como a los 56 días postratamiento.

Algunos reportes señalan que el daño agudo de los testículos inducido por Cd se manifiesta por la inflamación hemorrágica, su degeneración, su disfunción, aunado a la vacuolización de los túbulos seminíferos, la reducción del diámetro tubular y la disminución de su volumen (de Souza y cols., 2010). A nivel del epitelio germinal se ha observado necrosis, degeneración y desprendimiento progresivo de las células germinales de la membrana basal (Obianime y Roberts, 2009), induce apoptosis del epitelio seminífero (Herranz y cols., 2010), estrés oxidante tanto en células somáticas como germinales, afecta la integridad de la barrera hematotesticular y citotoxicidad (Wong y cols., 2005). Aunque en el presente trabajo no se realizaron evaluaciones histológicas, si se observó un bajo peso testicular, además de una reducción en el volumen del testículo.

Se ha postulado que el Cd ejerce sus efectos en el testículo gracias a sus propiedades físicas y químicas, ya que como ion Cd²⁺, es capaz de ejercer mimetismo con el Ca²⁺ y el Zn²⁺, debido a sus similitudes con estos iones; como tal, es probable que el Cd sustituya al Ca o al Zn en procesos fisiológicos cruciales que están mediados por estos iones, lo que resulta en la activación o inhibición de varias vías de señalización (Siu y cols., 2009). El Zn es importante para la actividad de muchas enzimas del cuerpo y puede prevenir el daño celular mediante la activación del sistema de defensa antioxidante (Powell, 2000; Ozturk y cols., 2003). El Cd, se ha asociado con diferentes cambios estructurales y bioquímicos en la célula, se menciona que a bajas concentraciones causa

principalmente apoptosis y, al encontrarse en concentraciones más altas, causa necrosis (Templeton y Liu, 2010). Los efectos tóxicos del Cd incluyen alteraciones en la permeabilidad de las membranas plasmáticas, daño a las membranas nuclear y mitocondrial, aumento en la condensación de cromatina y disminución del contenido total de DNA (Klimová y Mišúrová, 2003). La inhibición de los procesos de reparación del DNA ocasionada por Cd representa un mecanismo por el cual aumenta la genotoxicidad (Waisberg y cols., 2003).

Se ha reportado que el Cd tiene un efecto negativo, particularmente intenso, sobre las células de Leydig y compromete su función, como lo demuestra la reducción de las concentraciones de T en los sobrenadantes de los cultivos de las células tratadas *in vitro* (Yang y cols., 2003). Manna y cols., en 2008, en un estudio en ratones, reportaron que la administración de de 4 mg/kg Cd durante seis días, produce una reducción significativa, a nivel del testículo, de la actividad de las enzimas esteroideogénicas testiculares 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), que son las enzimas clave para la biosíntesis de T y, en consecuencia se reduce la concentración plasmática de T. Hernández-Rodríguez y cols. 2021, de igual manera, reportan una caída en las concentraciones séricas de T tanto al DPN 35, como al DPN 49 en sus grupos tratados con Cd. Ekhoie y cols 2013, también encontraron que todos sus grupos tratados con Cd presentaron una caída significativa en las concentraciones de T. Todos estos resultados son similares con los que reportamos en el presente trabajo.

Asimismo, podemos observar que en los grupos tratados con Cd al DPN 35 y al DPN 49, tienen una disminución en la concentración de T en el suero sanguíneo, sin embargo, observamos que este efecto es mucho más pronunciado al DPN 49, en el cual es posible observar diferencias estadísticamente significativas (**Figura 13**). Estos resultados hacen evidente que el Cd, en efecto, tiene un impacto negativo sobre la producción de T y sobre el testículo en general. Además, se observó que estos daños dependen del tiempo y de la cantidad de Cd a la que se encuentran expuestos los grupos

experimentales. También se observó una relación directa entre las concentraciones de T y los demás parámetros testiculares que medimos —como lo son el peso, el volumen e índice gonadosomático—, ya que al DPN 35, en el cual no encontramos significancia en la concentración de T, tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros.

El Cd también puede afectar la síntesis de T al regular negativamente la expresión del mRNA del receptor de LH, pero carece de efecto sobre la expresión de los receptores adrenérgicos $\alpha 1A$ y $\beta 2$, lo que sugiere que la influencia del Cd en la expresión génica testicular implica un efecto específico sobre el receptor de LH y no un efecto general sobre los receptores transmembrana (Gunnarsson y cols., 2007). Todos estos efectos del Cd sobre la T son de suma importancia, pues este andrógeno secretado por las células de Leydig del testículo se transporta a sus órganos diana en todo el cuerpo a través de la circulación sanguínea y promueve la diferenciación y el desarrollo de los órganos reproductivos, así como el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias masculinas, a través de la unión con los receptores de andrógenos. También desempeña un papel importante en el mantenimiento de la función sexual y del metabolismo, incluida la promoción de la síntesis de proteínas, el crecimiento óseo y la eritropoyesis (Chen y cols., 2009; Ge y cols., 2008). Además, la T ingresa a las células de Sertoli de manera paracrina y participa en la regulación de la espermatogénesis, entre muchas otras funciones (Smith y cols., 2014).

Por otra parte, al analizar los resultados sobre la acumulación de Cd tanto en el tejido hipotalámico como en el tejido sanguíneo, observamos que en ambos tejidos, tanto al DPN 35 y al DPN 49, en los sujetos tratados con Cd, el metal muestra una significativa acumulación al compararse con sus grupos controles (**Figura 14**). Nuestros resultados concuerdan con los de Lafuente y cols., que en 2001 reportaron la bioacumulación de este metal en el hipotálamo de ratas Sprague-Dawley prepuberales al DPN 30 y adultas jóvenes al DPN 60 que fueron tratadas con 50 ng/mL de $CdCl_2$ en el agua de beber. Andjelkovic y cols., en 2019,

reportaron la acumulación de Cd en sangre de ratas Wistar macho tratadas con una única dosis de 15 mg/kg y de 30 mg/kg de CdCl₂ vía oral y a las que se les aplicó eutanasia 24 h después del tratamiento, con diferencias significativamente altas respecto a su control. Estos resultados, además de ser similares a los obtenidos en el presente trabajo, son interesantes, pues muestran que el Cd tiene un ingreso, difusión y acumulación, acelerados dentro del organismo, aunque hay que notar que las dosis fueron más altas y el tiempo de eutanasia y recolección de sangre fue corto.

Los mecanismos moleculares de la toxicidad del Cd no son completamente conocidos hasta el momento. Resultados obtenidos en animales de experimentación, han demostrado que el Cd puede interactuar con transportadores de membrana involucrados en la captura de metales esenciales tales como hierro y Zn en el tracto gastrointestinal, logrando desplazar a estos metales e ingresando al citoplasma celular (Bridges y Zalups, 2005). Está documentado que la bioacumulación de Cd se debe principalmente a que no cumple con una función fisiológica dentro del organismo, dando como resultado un daño estructural o funcional, sobre todo, cuando los factores protectores son insuficientes para neutralizar la acción de los estímulos tóxicos. La mayor parte del Cd acumulado en el organismo se une a las metalotioneínas (MT), que son proteínas de unión a metales de bajo peso molecular, ricas en cisteína (de Angelis y cols., 20017). Las MT funcionan como almacenamiento de Zn y son captadores de radicales libres que son inducidas por estímulos fisiológicos y tóxicos, incluido el Cd y por otros iones metálicos. También representan una maquinaria de defensa contra la toxicidad del Cd, además, las MT se encargan de la retención de Cd en varios tejidos, secuestrando el metal en el citosol y reduciendo su biodisponibilidad para los orgánulos intracelulares (Klaassen y cols., 1999). Sin embargo, se ha observado que su expresión —y es de suponerse que su papel protector— es diferencial, pues en el testículo, después del tratamiento con bajas dosis de Cd, los niveles de MT aumentaron mucho menos que en el hígado, por ejemplo, lo que podría explicar la alta sensibilidad

de algunos órganos al metal, como lo es el testículo (Xu y cols., 2005). En nuestro trabajo, aunque no medimos la expresión de MT, es de esperarse que el efecto protector en el hipotálamo, tal como ocurre en el testículo, sea bajo, pues encontramos gran acumulación de Cd y observamos que induce una baja expresión de genes reproductivos a este nivel.

Al analizar la expresión relativa de genes implicados en la reproducción, como los son *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1*, a nivel del hipotálamo, encontramos que el Cd ocasiona una baja expresión del mRNA de estos genes. En la expresión relativa del gen *Kiss1* se observó una caída significativa en su expresión en los sujetos tratados al DPN 35, sin embargo, al DPN 49 aunque la expresión en el grupo tratado con Cd tendió a la baja, esta no fue significativa (**Figura 15**), lo que nos indica una recuperación en los niveles de expresión de *Kiss1*. Cabe recordar que la T retroalimenta negativamente a las neuronas de Kp en el ARC y debido a los efectos negativos del Cd en el testículo, sus niveles se encuentran más bajos al DPN 49, lo que podría explicar la elevación en los niveles de expresión de *Kiss1* a esta edad, por la ausencia o el bajo nivel de la retroalimentación negativa de T en el hipotálamo.

Por otra parte, observamos que la expresión relativa del gen *Kiss1r*, mismo que tiene una baja en su expresión en los sujetos tratados con Cd desde el DPN 35, pero sin llegar a presentar diferencias significativas al comprarse con su grupo control, hacia el DPN 49 el nivel de expresión en el grupo tratado baja aún más, mostrando diferencias significativas al compararlos con su grupo control (**Figura 16**). Esto nos indica que en la expresión de este gen hay una influencia directa del tiempo de exposición al Cd que afecta su expresión.

Algo semejante ocurre en el análisis del gen *Gnrh1*, en donde se observa que la expresión relativa disminuye en los sujetos expuestos al Cd desde el DPN 35, sin alcanzar diferencias significativas con su grupo control, pero presenta una marcada tendencia a la baja, que hacia el DPN 49 se hace más profusa y hace evidente que hay una expresión significativamente más baja en el gen (**Figura 17**). Este comportamiento obedece y es consecuente a la baja en la expresión

del mRNA del receptor *Kiss1r*. Con estos resultados, observamos que el Cd tiene un efecto negativo sobre el sistema Kisspeptina/Kiss1r/GnRH, lo que podría contribuir a todos los efectos negativos que hemos expuesto en el sistema reproductivo, sobre todo, en el retardo de la pubertad observado mediante el retardo en la SP de los animales tratados con Cd.

La exposición a químicos contaminantes ambientales se ha asociado con una incidencia de alteraciones reproductivas (Dickerson y Gore, 2007), como trastornos en la pubertad (Buck Louis y cols., 2008). Los productos químicos presentes en el medio ambiente incluyen compuestos inorgánicos como el Cd (Wilson y cols., 2008).

El momento de la pubertad es muy variable y está influenciado por factores ambientales y genéticos, los genes clave del inicio de la pubertad en los seres humanos son: *KISS1*, *KISS1R*, *GNRH1* y *GNRHR*; y sus alteraciones genéticas se han relacionado con perturbaciones en el inicio de la pubertad (Hwang, 2012), por lo que consideramos que hay una estrecha relación entre la baja expresión de *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* y el retardo de la pubertad en nuestro modelo, a causa de la exposición al Cd.

Bellingham y cols. en 2009 mediante la exposición de ovejas preñadas a “lodos de depuradora” —un subproducto del tratamiento de aguas residuales de fuentes domésticas, agrícolas e industriales, que contienen numerosos contaminantes orgánicos e inorgánicos, incluidos metales pesados—, reportaron que los fetos, de ambos sexos, mostraron niveles de expresión del mRNA del gen *Kiss1* significativamente más bajos en comparación con su grupo control, mientras que el gen *Kiss1r* no mostró diferencias significativas entre grupos, demostrando así, que la exposición materna a una mezcla de sustancias químicas, en concentraciones ambientales, afecta negativamente al sistema neuroendocrino kisspeptina/Kiss1r.

Qiu y cols. 2020, han reportado efectos negativos de otro disruptor endocrino, el bisfenol A (BPA), sobre *Kiss1* y *Gnrh1* en ratas Sprague-Dawley hembra que fueron expuestas a este químico a dosis 0.05, 0.5, 5 o 10 mg/kg de

BPA, vía ip. Sin embargo, el BPA induce la sobre expresión de *Kiss1* y, en consecuencia, de *Gnrh1*, en la dosis más alta, provocando una pubertad adelantada que es detectable mediante la observación de una apertura vaginal precoz —la apertura vaginal es el indicador de pubertad en las ratas hembra—. Este estudio, aunque de forma contraria a nuestros resultados y al efecto del Cd, demuestra que *Kiss1* y *Gnrh1*, son altamente susceptibles a los contaminantes ambientales, que terminarán por desregular el eje HHG y la pubertad.

Se ha mencionado que es muy probable que las vías de señalización de Kp hayan evolucionado para ayudar a coordinar el estado reproductivo con las señales ambientales, sin embargo, esto puede ser una desafortunada desventaja de un sistema perfeccionado para optimizar la aptitud reproductiva, ante la existencia de contaminantes ambientales como los disruptores endocrinos (Patisaul, 2013).

El Cd es causante de neurotoxicidad, ya que puede destruir la integridad estructural de la barrera hematoencefálica y penetrar en el cerebro (Saedi y cols., 2021). Es capaz de entrar en las neuronas a través de canales de Ca activados por voltaje (Usai et al., 1999) y su captación por las células se produce tanto por transportes activos como pasivos (Thévenod, 2010), el mimetismo de Cd^{2+} con Ca^{2+} , es un factor determinante para su entrada (Choong y cols., 2014). Se sabe que el efecto de genotoxicidad del Cd afecta la proliferación y diferenciación celular, la progresión del ciclo celular, la síntesis de DNA y la apoptosis. Además, se ha reportado que un efecto genómico importante del Cd es la inhibición de la reparación del DNA (Giaginis y cols., 2006) lo que es motivo de inestabilidad genómica (Hartwig y cols., 2002) lo que conduce a estrés oxidante, metilación del DNA y desregulación de la expresión génica (Joseph, 2009). Esto nos lleva a plantearnos que esta clase de eventos sobre el DNA podrían ser provocados por la exposición al Cd y quizá sean los causantes de la baja expresión que encontramos en los genes analizados, aunque no podemos descartar otras vías de daño, ya que muchos informes indican que los mecanismos tóxicos del Cd actúan intracelularmente, a través de la producción de ROS, lo que mantiene un

ambiente de estrés oxidante (Jomova y Valko (2011)). Para probar o descartar algún mecanismo de acción, ya sea de algún evento genómico como la metilación del DNA o eventos como el estrés oxidante es necesario cuantificar ROS y la actividad de las enzimas antioxidantes.

Saedi y cols., 2021, a través de la exposición a altas dosis de Cd, de 25 mg/kg de CdCl₂, administrados por sonda intragástrica, desde el DPN 21 hasta el DPN 34, en ratas Sprague-Dawley hembras, demostraron que existe degeneración neuronal en el hipotálamo dorsomedial (DMH) y en el ARC del grupo tratado con Cd, en comparación con sus grupo control y demostraron que la exposición prepuberal a altas dosis de Cd induce daño hipotalámico a través de la alteración del perfil del transcriptoma en ratas hembras —la secuenciación de transcriptomas es una técnica poderosa para estudiar los cambios moleculares en la expresión del mRNA que subyacen a las diferencias en las condiciones fisiológicas y la progresión de enfermedades (de Jong y cols., 2019)—. A pesar de la alta dosis de Cd que usaron, su trabajo es relevante, porque demostró nuevos mecanismos de patogénesis del Cd en el hipotálamo, ya que evaluaron el perfil del transcriptoma hipotalámico al inicio de la pubertad mediante secuenciación del RNA (RNA-seq), para investigar el efecto de la exposición prepuberal al Cd sobre la expresión del mRNA en el hipotálamo y, en total, identificaron 10,195 genes mediante RNA-seq, de estos, 742 genes (44.81%) se regularon significativamente al alza en el hipotálamo de los sujetos expuestos al Cd, mientras que 914 genes (55,19%) se regularon significativamente a la baja. Aunque en su trabajo no muestran los genes que nosotros estudiamos, estos autores proponen que el Cd tiene efecto sobre una cantidad considerable de genes. En nuestra investigación se muestra que los genes *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1* se ven afectados por la exposición a Cd.

Por otro lado, reportaron que los genes *Nts* y *Penk*, que se identificaron como los genes codificantes a los neuropéptidos neurotensina y proencefalina, respectivamente, fueron regulados a la baja en el hipotálamo en su grupo tratado con Cd. Además, se ha informado sobre la regulación al alza del mRNA de *Nts*

en el hipotálamo en respuesta a diferentes factores estresantes. También mencionan que no se han reportado estudios que muestren efectos de los metales pesados sobre los neuropéptidos en el hipotálamo y, sin embargo, está bien determinado que los factores estresantes modifican la expresión génica de los neuropéptidos en diferentes regiones del cerebro de la rata. Por lo tanto, es probable que el Cd, como factor estresante, cambie la acción de los neuropéptidos como la proencefalina y la neurotensina en el hipotálamo (Saedi y cols., 2021). Esta información resulta de gran importancia, pues cabe recordar, que la Kp y la GnRH son neuropéptidos y, en este trabajo, demostramos que el Cd provoca una baja expresión de *Kiss1*, *Kiss1r* y *Gnrh1*, aunque hacen falta más estudios para determinar el mecanismo por el cual el Cd se encuentra regulando a la baja a estos genes, ya sea por un efecto directo (daño celular, estrés oxidante, metilación del DNA) o indirectos (sobre la acción en otros genes que regulen a nuestros genes de estudio) o incluso por una combinación de ambos efectos, pues recordemos que, de por sí, el inicio de la pubertad es complejo y variable, además de estar influenciado por múltiples factores genéticos y ambientales (Parent y cols., 2003; Palmert y Hirschhorn, 2003; Towne y cols., 2005). Esto sugiere que algunos tipos de alteración genética como cambios en el número de copias, interacciones gen-gen y gen-ambiente mediadas epigenéticamente, pueden ayudar influir en la regulación de la pubertad (Rzeczowska y cols., 2014). También, es posible que sea el resultado de cientos o miles de variantes genéticas con efectos de tamaño muy pequeño (Cousminer y cols., 2016). Tomando en cuenta estos aspectos, el efecto del Cd en la expresión de los genes podría ser multifactorial.

Con los resultados obtenidos en este trabajo proponemos que el Cd puede estar entrando a las células hipotalámicas, a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CDV) y de canales pasivos (CP), debido a su capacidad de mimetizarse con el Ca y podría estar ejerciendo sus efectos a través de diferentes vías. La primera línea de defensa contra Cd requiere de la inducción de factores protectores, como las MT y glutati6n (GSH), que secuestran al Cd y

tratan de mantener la homeostasis del medio interno (**Figura 18-1**). Cuando el sistema de defensa se ve sobrepasado, el Cd intracelular aumenta y comienza a acumularse, lo que conduce a la producción de radicales libres, particularmente de ROS, mismas que van a conducir a estrés oxidante y terminarán por causar muerte celular por apoptosis (**Figura 18-2**). Por otro lado, el Cd es capaz de regular la señalización de Ca^{2+} ejerciendo efectos opuestos sobre las reservas internas, pues bloquea la liberación de Ca^{2+} almacenado al inhibir la actividad de los receptores de IP3, interfiriendo con las rutas de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), además puede competir con el Ca^{2+} para unirse a la calmodulina, interfiriendo así con los procesos fisiológicos y bioquímicos dependientes de la calmodulina, como podría ser la inducción de factores de transcripción (**Figura 18-3**). El Cd también es capaz de producir genotoxicidad, pues inhibe los mecanismos de reparación del DNA, desregula la expresión génica y puede metilar el DNA (**Figura 18-4**). El Cd tiene un efecto negativo sobre los niveles de T, por lo que podría estar inhibiendo la retroalimentación negativa que proviene del testículo, a lo que se puede deber la ligera recuperación en la expresión de *Kiss1* al DPN 49 (**Figura 18-5**).

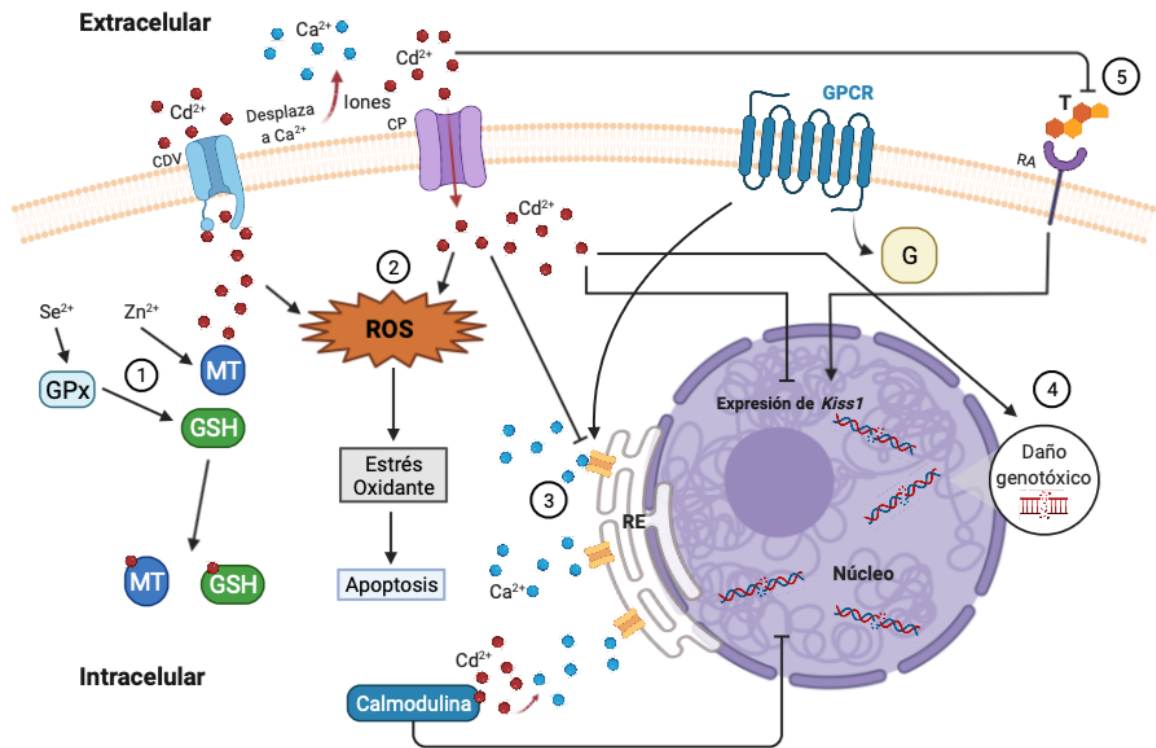


Figura 18. Representación esquemática de una neurona hipotalámica de Kp en la que se muestran los posibles efectos del Cd en el medio interno celular y en la inhibición de la expresión de los genes, en su caso, *Kiss1*. El Cd es capaz de entrar al medio intracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CDV) y de canales pasivos (CP). **1** La primera línea de defensa contra Cd son las MT y el GSH, que secuestran al Cd y tratan de mantener la homeostasis. **2** Cuando se sobrepasa el sistema de defensa el Cd aumenta y produce especies reactivas de oxígeno (ROS), que conducen a estrés oxidante y terminarán en apoptosis. **3** El Cd afecta las reservas internas de Ca^{2+} , bloquea la liberación de Ca^{2+} almacenado al inhibir la actividad de los receptores de IP3, interfiriendo con los receptores acoplados a proteína G (GPCR), además compite con el Ca^{2+} para unirse a la calmodulina. **4** El Cd produce genotoxicidad, inhibe la reparación del DNA, desregula la expresión génica y puede metilar el DNA. **5** El Cd tiene un efecto negativo sobre los niveles de T, por lo que puede inhibir la retroalimentación negativa que proviene del testículo, a lo que se puede deber la ligera recuperación en la expresión de *Kiss1* al DPN 49. Esquema creado con BioRender.com.

9. CONCLUSIÓN

La exposición postnatal al Cd reguló a la baja la vía *Kiss1-Gnrh1* hipotalámica, lo que apoya o confirma molecularmente el retraso en la pubertad confirmado por la SP y las bajas concentraciones de T.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, A. P. & Kaiser, U. B. (2016). Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinology*, 4(3): 254-264.
- Allanson, M., y Deanesly, R. (1962). Observations on cadmium damage and repair in rat testes and the effects on the pituitary gonadotrophs. *Journal of Endocrinology*, 24(4), 453–NP.
- Agency for Toxic Substance and Disease Registry USA (2017) Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA.
- Akinloye, O., Arowojolu, A. O., Shittu, O. B., & Anetor, J. I. (2006). Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reproductive biology*, 6(1), 17–30.
- Andjelkovic, M., Buha Djordjevic, A., Antonijevic, E., Antonijevic, B., Stanic, M., Kotur-Stevuljevic, J., Spasojevic-Kalimanovska, V., Jovanovic, M., Boricic, N., Wallace, D., & Bulat, Z. (2019). Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *International journal of environmental research and public health*, 16(2), 274.
- Arteaga-Silva, M., Viguera-Villaseñor, R.M., Retana-Márquez, S., Hernández-González, M., Bonilla-Jaime, H., Guzmán-García, X. & Contreras-Montiel, J.L. (2013). Testosterone Levels and Development of the Penile Spines and Testicular Tissue during the Postnatal Growth in Wistar Rats. *Advances in Sexual Medicine*, 3(2013):1-9.
- Arteaga-Silva, M., Mendoza, T., Hernández, J., Viguera, R., Montes, S., Limón, O., Bonilla, H. & Vázquez, G. (2015). La exposición postnatal al cadmio disminuye los niveles de testosterona y provoca un déficit en la motivación y ejecución sexual en ratas macho adultas. En Sanz, A. (Ed). *Neurodesarrollo de la cognición y la conducta*. Universidad de Guadalajara, 3:69-104.

- Arteaga-Silva, M., Arenas-Rios, E., Bonilla-Jaime, H., Damian-Matzumura, P., Limon-Morales, O., Hernandez-Rodriguez, J., & Marquez-Aguiluz, D. (2021). Neuroendocrine effects of cadmium exposure on male reproductive functions. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *26*, 286–326.
- Avendaño, M. S., Vazquez, M. J., & Tena-Sempere, M. (2017). Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. *Human reproduction update*, *23*(6), 737–763.
- Bellingham, M., Fowler, P. A., Amezaga, M. R., Rhind, S. M., Cotinot, C., Mandon-Pepin, B., Sharpe, R. M., & Evans, N. P. (2009). Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland. *Environmental health perspectives*, *117*(10), 1556–1562.
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *1*(1), 11–21.
- Bimonte, V. M., Besharat, Z. M., Antonioni, A., Cella, V., Lenzi, A., Ferretti, E., & Migliaccio, S. (2021). The endocrine disruptor cadmium: a new player in the pathophysiology of metabolic diseases. *Journal of endocrinological investigation*, 10.1007/s40618-021-01502-x. Advance online publication.
- Branca, J., Morucci, G., & Pacini, A. (2018). Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. *Neural regeneration research*, *13*(11), 1879–1882.
- Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology*, *204*(3), 274–308.
- Boughammoura, S., Ben Mimouna, S., Chemek, M., Ostertag, A., Cohen-Solal, M., & Messaoudi, I. (2020). Disruption of Bone Zinc Metabolism

during Postnatal Development of Rats after Early Life Exposure to Cadmium. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1218.

- Buck Louis, G. M., Gray, L. E., Jr, Marcus, M., Ojeda, S. R., Pescovitz, O. H., Witchel, S. F., Sippell, W., Abbott, D. H., Soto, A., Tyl, R. W., Bourguignon, J. P., Skakkebaek, N. E., Swan, S. H., Golub, M. S., Wabitsch, M., Toppari, J., & Euling, S. Y. (2008). Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. *Pediatrics*, 121 Suppl 3, S192–S207.
- Castellano, J. M. & Tena-Sempere, M. (2017). Kisspeptins and Puberty. *Revista Española de Endocrinología Pediátrica*, 8(2), 8-14.
- Chen, H., Ge, R. S., & Zirkin, B. R. (2009). Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and cellular endocrinology*, 306(1-2), 9–16.
- Chin, T., Liu, C., & Wei, C. (1998). Testicular volume in Taiwanese boys. *Zhonghua yi xue za zhi = Chinese medical journal; Free China ed*, 61(1), 29–33.
- Chipkevitch, E., Nishimura, R. T., Tu, D. G., & Galea-Rojas, M. (1996). Clinical measurement of testicular volume in adolescents: comparison of the reliability of 5 methods. *The Journal of urology*, 156(6), 2050–2053.
- Choong, G., Liu, Y., & Templeton, D. M. (2014). Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chemico-biological interactions*, 211, 54–65.
- Colledge W. H. (2004). GPR54 and puberty. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 15(9), 448–453.
- Colrain, I. M., & Baker, F. C. (2011). Changes in sleep as a function of adolescent development. *Neuropsychology review*, 21(1), 5–21.
- Conn, P. M., & Crowley, W. F., Jr (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual review of medicine*, 45, 391–405.
- Cousminer, D. L., Widén, E., & Palmert, M. R. (2016). The genetics of pubertal timing in the general population: recent advances and evidence

for sex-specificity. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 23(1), 57–65.

- de Angelis, C., Galdiero, M., Pivonello, C., Salzano, C., Gianfrilli, D., Piscitelli, P., Lenzi, A., Colao, A., & Pivonello, R. (2017). The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 73, 105–127.
- de Croft, S., Piet, R., Mayer, C., Mai, O., Boehm, U., & Herbison, A. E. (2012). Spontaneous kisspeptin neuron firing in the adult mouse reveals marked sex and brain region differences but no support for a direct role in negative feedback. *Endocrinology*, 153(11), 5384–5393.
- de Jong, T. V., Moshkin, Y. M., & Guryev, V. (2019). Gene expression variability: the other dimension in transcriptome analysis. *Physiological genomics*, 51(5), 145–158.
- de Souza Predes, F., Diamante, M. A., & Dolder, H. (2010). Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International journal of experimental pathology*, 91(2), 125–131.
- Dickerson, S. M., & Gore, A. C. (2007). Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 8(2), 143–159.
- Djuric, A., Begic, A., Gobeljic, B., Stanojevic, I., Ninkovic, M., Vojvodic, D., Pantelic, A., Zebic, G., Prokic, V., Dejanovic, B., Stojanovic, I., Pavlica, M., Djukic, D., Saso, L., Djurdjevic, D., Pavlovic, M., Topic, A., Vujanovic, D., Stevnovic, I., & Djukic, M. (2015). Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 86, 25–33.
- Ekhoje, E. I., Nwangwa, E. K., & Aloamaka, C. P. (2013). Changes in Some Testicular Biometric Parameters and Testicular Function in

Cadmium Chloride Administered Wistar Rats. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 3(4), 2031-2041.

- Elmallah, M., Elkhadragey, M. F., Al-Olayan, E. M., & Abdel Moneim, A. E. (2017). Protective Effect of *Fragaria ananassa* Crude Extract on Cadmium-Induced Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes Suppression, and Apoptosis in Rat Testes. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 957.
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L., & Rudisill, C. (2012). *Toxicological Profile for Cadmium*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US).
- Frisch, R. E., & Revelle, R. (1970). Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science (New York, N.Y.)*, 169(3943), 397–399.
- Frisch, R. E., Revelle, R., & Cook, S. (1973). Components of weight at menarche and the initiation of the adolescent growth spurt in girls: estimated total water, lean body weight and fat. *Human biology*, 45(3), 469–483.
- García Rodríguez, G. & Díaz Loving, R. (2011). Predictores psicosociales del comportamiento sexual. *Interamerican Journal of Psychology*, 45(3): 405.
- García-Galiano, D., Pinilla, L., & Tena-Sempere, M. (2012). Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. *Journal of neuroendocrinology*, 24(1), 22–33.
- Ge, R., Chen, G., & Hardy, M. P. (2008). The role of the Leydig cell in spermatogenic function. *Advances in experimental medicine and biology*, 636, 255–269.
- Giaginis, C., Gatzidou, E., & Theocharis, S. (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 213(3), 282–290.

- Giedd J. N. (2008). The teen brain: insights from neuroimaging. *The Journal of adolescent health: official publication of the Society for Adolescent Medicine*, 42(4), 335–343.
- Girod, C. A. (1964). Propos de l'influence du chlorure de cadmium sur le testicule; recherches chez le singe *Macacus irus f. cuv.*. *Seances Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 158: 297–299.
- Gollenberg, A. L., Hediger, M. L., Lee, P. A., Himes, J. H., & Louis, G. M. (2010). Association between lead and cadmium and reproductive hormones in peripubertal U.S. girls. *Environmental health perspectives*, 118(12), 1782–1787.
- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Seminara, S., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145(9), 4073–4077.
- Gottsch, M. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 30(1), 4–9.
- Grachev, P., Millar, R. P., & O'Byrne, K. T. (2014). The role of neurokinin B signalling in reproductive neuroendocrinology. *Neuroendocrinology*, 99(1), 7–17.
- Harter, C., Kavanagh, G. S., & Smith, J. T. (2018). The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *The Journal of endocrinology*, 238(3), R173–R183.
- Hartwig, A., Asmuss, M., Blessing, H., Hoffmann, S., Jahnke, G., Khandelwal, S., Pelzer, A., & Bürkle, A. (2002). Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food and chemical toxicology: an international journal published*

for the British Industrial Biological Research Association, 40(8), 1179–1184.

- Herbison, A. E., & Theodosios, D. T. (1992). Immunocytochemical identification of oestrogen receptors in preoptic neurones containing calcitonin gene-related peptide in the male and female rat. *Neuroendocrinology*, 56(5), 761–764.
- Herbison, A. E., de Tassigny, X. d., Doran, J., & Colledge, W. H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 151(1), 312–321.
- Herbison A. E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(8), 452–466.
- Herde, M. K., Iremonger, K. J., Constantin, S., & Herbison, A. E. (2013). GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(31), 12689–12697.
- Herde, M. K., & Herbison, A. E. (2015). Morphological Characterization of the Action Potential Initiation Segment in GnRH Neuron Dendrites and Axons of Male Mice. *Endocrinology*, 156(11), 4174–4186.
- Hernández-González, M. (2000). Prepubertal genital grooming and penile erections in relation to sexual behavior of rats. *Physiology and behavior*, 71(1-2): 51–56.
- Hernández-Rodríguez, J., López, A. L., Montes, S., Bonilla-Jaime, H., Morales, I., Limón-Morales, O., Ríos, C., Hernández-González, M., Viguera-Villaseñor, R. M., & Arteaga-Silva, M. (2021). Delay in puberty indices of Wistar rats caused by Cadmium. Focus on the redox system in reproductive organs. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 99, 71–79.
- Herranz, L.M., Teba, F., Martín, R., Ingelmo, I., Gómez, V., Codesal, J., Pozuelo, J.M., Oltra, B., Serna, E., & Santamaría, L. (2010). Quantitative

changes in rat seminiferous epithelium after chronic administration of low doses of cadmium and zinc: a stereological study. *The Open Androl. J.* 2, 27–36.

- Howard S. R. (2019). The Genetic Basis of Delayed Puberty. *Frontiers in endocrinology*, 10, 423.
- IARC, I. (2012). monographs vol. 100C. *Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer Lyon, France.*
- Interdonato, M., Bitto, A., Pizzino, G., Irrera, N., Pallio, G., Mecchio, A., Cuspilici, A., Minutoli, L., Altavilla, D., & Squadrito, F. (2014). Levels of heavy metals in adolescents living in the industrialised area of Milazzo-Valle del Mela (northern Sicily). *Journal of environmental and public health*, 2014, 326845.
- Interdonato, M., Pizzino, G., Bitto, A., Galfo, F., Irrera, N., Mecchio, A., Pallio, G., Ramistella, V., De Luca, F., Santamaria, A., Minutoli, L., Marini, H., Squadrito, F., & Altavilla, D. (2015). Cadmium delays puberty onset and testis growth in adolescents. *Clinical endocrinology*, 83(3), 357–362.
- Iremonger, K. J., & Herbison, A. E. (2012). Initiation and propagation of action potentials in gonadotropin-releasing hormone neuron dendrites. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(1), 151–158.
- Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., Gottsch, M. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80(4), 264–272.
- Ji, Y. L., Wang, H., Liu, P., Wang, Q., Zhao, X. F., Meng, X. H., Yu, T., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, Y., & Xu, D. X. (2010). Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via

disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 29(2), 176–183.

- Jin, J. M., & Yang, W. X. (2014). Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*, 551(1), 15–25.
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65–87.
- Joseph P. (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 272–279.
- Juárez Flores, D. L., Quevedo Díaz, M., Reséndiz Sharpe, A. & López González, P. (2013). Mecanismos neuroendocrinos al inicio de la pubertad. *Revista Mexicana de Pediatría*, 80(6): 240.
- Kalló, I., Vida, B., Deli, L., Molnár, C. S., Hrabovszky, E., Caraty, A., Ciofi, P., Coen, C. W., & Liposits, Z. (2012). Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones. *Journal of neuroendocrinology*, 24(3), 464–476.
- Kauffman, A. S., Park, J. H., McPhie-Lalmansingh, A. A., Gottsch, M. L., Bodo, C., Hohmann, J. G., Pavlova, M. N., Rohde, A. D., Clifton, D. K., Steiner, R. A., & Rissman, E. F. (2007a). The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(33), 8826–8835.
- Kauffman, A. S., Gottsch, M. L., Roa, J., Byquist, A. C., Crown, A., Clifton, D. K., Hoffman, G. E., Steiner, R. A., & Tena-Sempere, M. (2007b). Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, 148(4), 1774–1783.
- Kim, J., Semaan, S. J., Clifton, D. K., Steiner, R. A., Dhamija, S., & Kauffman, A. S. (2011). Regulation of Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology*, 152(5), 2020–2030.

- Klaassen, C. D., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39, 267–294.
- Klimová, Š., & Mišúrová, E. (2003). Effect of cadmium and ionizing radiation on histones in rat brain. *Trace Elements and Electrolytes*, 20, 34–41.
- Korenbrot, C. C., Huhtaniemi, I. T. & Weiner, R. I. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology Reproductive*, 17(2): 298-303.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S. N., Vassart, G., & Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), 34631–34636.
- Krsmanovic, L. Z., Hu, L., Leung, P. K., Feng, H., & Catt, K. J. (2009). The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(8), 402–408.
- Lafuente A. (2013). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 395–404.
- Lafuente, A., Alvarez-Demanuel, E., Márquez, N., & Esquifino, A. I. (1999). Pubertal dependent effects of cadmium on episodic prolactin secretion in male rats. *Archives of toxicology*, 73(1), 60–63.
- Lafuente, A., Márquez, N., Pérez-Lorenzo, M., Pazo, D., & Esquifino, A. I. (2001). Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male

rats. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 226(6), 605–611.

- Lamas, C. A., Cuquetto-Leite, L., do Nascimento da Silva, E., Thomazini, B. F., Cordeiro, G., Predes, F. S., Gollücke, A., & Dolder, H. (2017). Grape juice concentrate alleviates epididymis and sperm damage in cadmium-intoxicated rats. *International journal of experimental pathology*, 98(2), 86–99.
- Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E., & Welch, D. R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(23), 1731–1737.
- Lee, J. H., & Welch, D. R. (1997). Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *International journal of cancer*, 71(6), 1035–1044.
- Lee, D. K., Nguyen, T., O'Neill, G. P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A. D., Coulombe, N., Tan, C. P., Tang-Nguyen, A. T., George, S. R., & O'Dowd, B. F. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS letters*, 446(1), 103–107.
- Lehman, M. N., Coolen, L. M., & Goodman, R. L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151(8), 3479–3489.
- Leka-Emiri, S., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2017). The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP). *Journal of endocrinological investigation*, 40(8), 789–802.
- Livadas, S., & Chrousos, G. P. (2016). Control of the onset of puberty. *Current opinion in pediatrics*, 28(4), 551–558.

- López, E., Figueroa, S., Oset-Gasque, M. J., & González, M. P. (2003). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British journal of pharmacology*, 138(5), 901–911.
- Luo, X., Li, L., Ma, M., & Li, R. (2015). Effects of low-dose cadmium exposure during gestation and lactation on development and reproduction in rats. *Environmental science and pollution research international*, 22(14), 10569–10579.
- Maggi, R., Cariboni, A. M., Marelli, M. M., Moretti, R. M., Andrè, V., Marzagalli, M., & Limonta, P. (2016). GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human reproduction update*, 22(3), 358–381.
- Manna, P., Sinha, M., & Sil, P. C. (2008). Cadmium induced testicular pathophysiology: prophylactic role of taurine. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 26(3-4), 282–291.
- Mead M. N. (2010). Cadmium confusion: do consumers need protection?. *Environmental health perspectives*, 118(12), a528–a534.
- Millar R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal reproduction science*, 88(1-2), 5–28.
- Minabe, S., Sato, M., Inoue, N., Watanabe, Y., Magata, F., Matsuda, F., Uenoyama, Y., Ozawa, H., & Tsukamura, H. (2019). Neonatal Estrogen Causes Irreversible Male Infertility via Specific Suppressive Action on Hypothalamic Kiss1 Neurons. *Endocrinology*, 160(5), 1223–1233.
- Moalla, M., Hadj Kacem, F., Al-Mutery, A. F., Mahfood, M., Mejdoub-Rekik, N., Abid, M., Mnif-Feki, M., & Hadj Kacem, H. (2019). Nonstop mutation in the Kisspeptin 1 receptor (KISS1R) gene causes normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(6), 1273–1280.
- Moore, C L. (1986). A hormonal basis for sex differences in the self-grooming of rats. *Hormones and behavior*, 20:155 – 65.

- Navarro, V. M., Castellano, J. M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M. L., Roa, J., Sanchez-Criado, J. E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., & Tena-Sempere, M. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*, *145*(10), 4565–4574.
- Navarro, V. M., Gottsch, M. L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*(38), 11859–11866.
- Nordberg G. F. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and applied pharmacology*, *238*(3), 192–200.
- Novaira, H. J., Fadoju, D., Diaczok, D., & Radovick, S. (2012). Genetic mechanisms mediating kisspeptin regulation of GnRH gene expression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *32*(48), 17391–17400.
- Oberdörster G. (1992). Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled soluble and insoluble cadmium compounds. *IARC scientific publications*, (118), 189–204.
- Obianime, A. W., & Roberts, I. I. (2009). Antioxidants, cadmium-induced toxicity, serum biochemical and the histological abnormalities of the kidney and testes of the male Wistar rats. *Nigerian journal of physiological sciences: official publication of the Physiological Society of Nigeria*, *24*(2), 177–185.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., ... Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor

gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411(6837), 613–617.

- Ojeda, R. S. & Skinner, M. K. (2005); Puberty in the rat. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 2061-2126.
- Ojeda, S. R., Roth, C., Mungenast, A., Heger, S., Mastronardi, C., Parent, A. S., Lomniczi, A., & Jung, H. (2006). Neuroendocrine mechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts. *International journal of andrology*, 29(1), 256–290.
- Okubo, K., & Nagahama, Y. (2008). Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 193(1), 3–15.
- Ottem, E. N., Godwin, J. G., Krishnan, S., & Petersen, S. L. (2004). Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(37), 8097–8105.
- Özen, S., & Darcan, Ş. (2011). Effects of environmental endocrine disruptors on pubertal development. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 3(1), 1–6.
- Ozturk, A., Baltaci, A. K., Mogulkoc, R., Oztekin, E., Sivrikaya, A., Kurtoglu, E., & Kul, A. (2003). Effects of zinc deficiency and supplementation on malondialdehyde and glutathione levels in blood and tissues of rats performing swimming exercise. *Biological trace element research*, 94(2), 157–166.
- Pacini, S., Punzi, T., Morucci, G., Gulisano, M., & Ruggiero, M. (2009). A paradox of cadmium: a carcinogen that impairs the capability of human breast cancer cells to induce angiogenesis. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 28(1), 85–88.

- Palmert, M. R., & Hirschhorn, J. N. (2003). Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. *Molecular genetics and metabolism*, 80(1-2), 1–10.
- Paramanik, Anurag. (2018). Zinc and α -lipoic acid ameliorates testicular damage and oxidative stress in cypermethrin-intoxicated rat. *International Journal of Advanced Research*. 6. 821-832.
- Parent, A. S., Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N. E., Toppari, J., & Bourguignon, J. P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocrine reviews*, 24(5), 668–693.
- Patisaul H. B. (2013). Effects of environmental endocrine disruptors and phytoestrogens on the kisspeptin system. *Advances in experimental medicine and biology*, 784, 455–479.
- Perera, A. D., & Plant, T. M. (1992). The neurobiology of primate puberty. *Ciba Foundation symposium*, 168, 252–267.
- Picut, C. A., Ziejewski, M. K., & Stanislaus, D. (2018). Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth defects research*, 110(3), 190–227.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological reviews*, 92(3), 1235–1316.
- Plant, R.G., Fraser, T.M., Medhamurthy, R., Gay, V.L. (1989). Somatogenic control of GnRH neuronal synchronization during development in primates: a speculation. In: Delemarre-van de Waal, H.A., Plant, T.M., van Rees, G.P., Schoemaker, J. (Eds.), *Control of the Onset of Puberty III*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 111–121.
- Plant T. M. (2008). Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 719–726.

- Plant T. M. (2015). Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Frontiers in neuroendocrinology*, 38, 73–88.
- Plant, T.M., Terasawa, E., Witchel, S.F., 2015. Puberty in non-human primates and man. In: Plant, T.M., Zeleznik, A.J. (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, fourth ed. Elsevier Inc., San Diego, CA, USA, pp. 1487–1536.
- Powell S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *The Journal of nutrition*, 130(5S Suppl), 1447S–54S.
- Rani, A., Kumar, A., Lal, A., & Pant, M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research*, 24(4), 378–399.
- Ren, Y., Shao, W., Zuo, L., Zhao, W., Qin, H., Hua, Y., Lu, D., Mi, C., Zeng, S., & Zu, L. (2019). Mechanism of cadmium poisoning on testicular injury in mice. *Oncology letters*, 18(2), 1035–1042.
- Rometo, A. M., Krajewski, S. J., Voytko, M. L., & Rance, N. E. (2007). Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(7), 2744–2750.
- Ronco, A. M., Arguello, G., Muñoz, L., Gras, N., & Llanos, M. (2005). Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 18(3), 233–241.
- Sachs, B. D., Glater, G. B. & O'Hanlon, J. K. (1984). Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormonal conditions. *Anatomical Record*, 210(1): 45-52.
- Saedi, S., Jafarzadeh Shirazi, M. R., Niazi, A., Tahmasebi, A., & Ebrahimie, E. (2021). Prepubertal exposure to high dose of cadmium induces hypothalamic injury through transcriptome profiling alteration and neuronal

degeneration in female rats. *Chemico-biological interactions*, 337, 109379.

- Sanchez-Garrido, M. A., & Tena-Sempere, M. (2013). Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. *Hormones and behavior*, 64(2), 187–194.
- Seeburg, P. H., Mason, A. J., Stewart, T. A., & Nikolics, K. (1987). The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent progress in hormone research*, 43, 69–98
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Jr, Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K. M., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U. B., Slaugenhaupt, S. A., Gusella, J. F., O'Rahilly, S., Carlton, M. B., Crowley, W. F., Jr, Aparicio, S. A., & Colledge, W. H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine*, 349(17), 1614–1627.
- Simerly, R. B., Zee, M. C., Pendleton, J. W., Lubahn, D. B., & Korach, K. S. (1997). Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 14077–14082.
- Siu, E. R., Mruk, D. D., Porto, C. S., & Cheng, C. Y. (2009). Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 240–249.
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146(9), 3686–3692.
- Smith, J. T., Popa, S. M., Clifton, D. K., Hoffman, G. E., & Steiner, R. A. (2006). Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(25), 6687–6694.

- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, 2–13.
- Stafford, L. J., Xia, C., Ma, W., Cai, Y., & Liu, M. (2002). Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer research*, 62(19), 5399–5404.
- Stoker, T. E., Parks, L. G., Gray, L. E., & Cooper, R. L. (2000). Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. *Critical reviews in toxicology*, 30(2), 197–252.
- Stump, D. G., O'Connor, J. C., Lewis, J. M., & Marty, M. S. (2014). Key lessons from performance of the U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 1 male and female pubertal assays. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 101(1), 43–62.
- Sunderman F. W., Jr (2001). Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. *Annals of clinical and laboratory science*, 31(1), 3–24.
- Takiguchi, M., & Yoshihara, S. (2006). New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology*, 13(2), 107–116.
- Templeton, D. M., & Liu, Y. (2010). Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chemico-biological interactions*, 188(2), 267–275.
- Thévenod F. (2010). Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 23(5), 857–875.
- Tian, H., Chen, S., Leng, Y., Li, T., Li, Z., Chen, H., & Zhang, Q. (2018). Exposure to cadmium during gestation and lactation affects development and function of Leydig cells in male offspring. *Environmental toxicology*, 33(3), 351–360.

- Towne, B., Czerwinski, S. A., Demerath, E. W., Blangero, J., Roche, A. F., & Siervogel, R. M. (2005). Heritability of age at menarche in girls from the Fels Longitudinal Study. *American journal of physical anthropology*, 128(1), 210–219.
- Uenoyama, Y., Inoue, N., Nakamura, S., & Tsukamura, H. (2019). Central Mechanism Controlling Pubertal Onset in Mammals: A Triggering Role of Kisspeptin. *Frontiers in endocrinology*, 10, 312.
- Usai, C., Barberis, A., Moccagatta, L., & Marchetti, C. (1999). Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. *Journal of neurochemistry*, 72(5), 2154–2161.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., & Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3), 95–117.
- Wang, B., & Du, Y. (2013). Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 898034.
- Wilson, V. S., Blystone, C. R., Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., & Gray, L. E., Jr (2008). Diverse mechanisms of anti-androgen action: impact on male rat reproductive tract development. *International journal of andrology*, 31(2), 178–187.
- Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental science and pollution research international*, 23(9), 8244–8259.
- Wu, X., Guo, X., Wang, H., Zhou, S., Li, L., Chen, X., Wang, G., Liu, J., Ge, H. S., & Ge, R. S. (2017). A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Scientific reports*, 7(1), 6337.
- Xu, L. C., Sun, H., Wang, S. Y., Song, L., Chang, H. C., & Wang, X. R. (2005). The roles of metallothionein on cadmium-induced testes damages in Sprague-Dawley rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 20(1), 83–87.

- Yamamura, T., Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Navarro, V. M., & Okamura, H. (2015). Effects of intravenous administration of neurokinin receptor subtype-selective agonists on gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and luteinizing hormone secretion in goats. *The Journal of reproduction and development*, 61(1), 20–29.
- Yi, L., Dai, J., Chen, Y., Tong, Y., Li, Y., Fu, G., Teng, Z., Huang, J., Quan, C., Zhang, Z., Zhou, T., Zhang, L., & Shi, Y. (2021). Reproductive toxicity of cadmium in pubertal male rats induced by cell apoptosis. *Toxicology and industrial health*, 37(8), 469–480.
- Yin, W., Mendenhall, J. M., Monita, M., & Gore, A. C. (2009). Three-dimensional properties of GnRH neuroterminals in the median eminence of young and old rats. *The Journal of comparative neurology*, 517(3), 284–295.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432.
- Zhang, Y., Li, S., & Li, S. (2019). Relationship between cadmium content in semen and male infertility: a meta-analysis. *Environmental science and pollution research international*, 26(2), 1947–1953.
- Zhang, H., & Reynolds, M. (2019). Cadmium exposure in living organisms: A short review. *The Science of the total environment*, 678, 761–767.
- Zhu, J., Kusa, T. O., & Chan, Y. M. (2018). Genetics of pubertal timing. *Current opinion in pediatrics*, 30(4), 532–540.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00100

Matrícula: 2192802147

Expresión de los genes Kiss1, Kiss1r y Gnrh1 hipotalámicos en ratas macho con retraso en la pubertad por exposición al cadmio.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 10 del mes de enero del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión de Posgrado:

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR
DR. SERGIO MONTES LOPEZ
DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

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

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: EDUARDO MIGUEL CORNEJO DE LA CONCHA

EDUARDO MIGUEL CORNEJO DE LA CONCHA

ALUMNO

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

aprobar

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

VOCAL

DR. SERGIO MONTES LOPEZ

VOCAL

DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA

SECRETARIO

DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella