



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

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

**"ALTERACIONES REPRODUCTIVAS EN RATAS MACHO Y HEMBRA
ESTRESADAS PRENATALMENTE. CONDUCTA SEXUAL, CICLO ESTRAL
Y CALIDAD ESPERMÁTICA.**

T E S I S

Para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal
presenta:

I.B.I. Dulce Diana García Vargas

Directora:

Dra. Ma. Del Socorro Imelda Retana Márquez

Asesoras:

Dra. Irma Leticia Jiménez Morales

Dra. Wendy Portillo Martínez

Mexica, D.F. 15 de Diciembre de 2014

CÓMITÉ TUTORAL:

Directora:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Profesora Titular.

Departamento de Biología de la Reproducción

Asesoras:

Dra. Irma Leticia Jiménez Morales

Profesora titular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Dra. Wendy Portillo Martínez

Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Dedicatoria:

A mi hijo Paulo Mateo por llegar a mi vida y llenarla de alegría, dándome la fuerza e inspiración para concluir este proyecto y brindarme la satisfacción de sentirme plena cada día de mi vida.

A amado esposo José David por motivarme para iniciar este posgrado, por tenerme paciencia en los momentos más difíciles dibujándome una sonrisa cuando más lo necesite y por ser un ejemplo de pasión hacia las cosas que amas.

A mi hermanita Eva Pamela por darme su amor, apoyo incondicional y regalarme una sonrisa siempre que lo necesito.

A mi madre María Antonieta a quien debo gran parte de lo que soy como ser humano, por sus consejos, amor, paciencia y gran ayuda para realizar los proyectos que me he propuesto a lo largo de mi vida.

A mi padre Antonio García por ser un ejemplo de fuerza y perseverancia, por motivarme y apoyarme en mi formación académica demostrándome que siempre debemos seguir luchando por lo que nos proponemos.

A mis hermanos Iván Jonathan y Luis Adán por escucharme y alentarme a seguir adelante a lo largo de mi vida.

A mis suegros Antonia y José por su cariño, amistad, confianza y gran apoyo hacia mi pequeña familia.

Agradecimientos:

Agradezco a todas las personas e instituciones que participaron en la realización y conclusión de esta tesis:

Al posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por lo beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

A mi directora de Tesis la Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez por su apoyo, ayuda e instrucción en la realización del trabajo experimental y la escritura de la tesis.

A mis asesoras la Dra. Irma Jiménez Morales y la Dra. Wendy Portillo Martínez por el apoyo en la realización de este trabajo.

A mi compañera de laboratorio la M. en B.E. Adriana Lizbeth Juárez Rojas por el apoyo en la realización de técnicas experimentales requeridas para este trabajo de tesis.

JURADO DE EXAMEN

Dra. Irma Leticia Jiménez Morales

Presidenta

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Dra. Wendy Portillo Martínez

Secretaria

Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. Edith Arenas Ríos

Vocal

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Vocal

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Lista de Abreviaturas

ABP	: Proteína unidora de andrógenos
ACTH	: Hormona adrenocorticotrópica
ADN	: Acido desoxirribonucleico
ARC	: Núcleo arcuato
AVPV	: Área ventral periventricular
ARs	: Receptores a andrógenos
BST	: Cama de la estría terminal
CRH	: Hormona liberadora de corticotropina
CON	: Control
DAG	: Diacilglicerol
DHT	: Dihidrotestosterona
DMH	: Núcleo dorsomedial hipotalámico
E2	: Estradiol
EP	: Estrés prenatal
FSH	: Hormona folículo estimulante
GC	: Glucocorticoides
GnRH	: Hormona liberadora de gonadotropinas
GnIH	: Hormona inhibidora de las gonadotropinas
GR	: Receptor a glucocorticoides
GPR54	: Receptor a kisspetina
HCG	: Gonadotropina coriónica humana
HHA	: Hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHG	: Hipotálamo-hipófisis-gónada
IP3	: Inositol trifosfato
KiSS-1R	: Receptor a kisspetina
LH	: Hormona lueinizante
LQ	: Cociente lordótico
MPOA	: Área preóptica media

NVM	: Núcleo ventromedial
NPV	: Núcleo paraventricular
NSQ	: Núcleo supraquiasmático
nPGi	: Núcleo paragigantocelular
PAG	: Sustancia gris periacueductal
PBS	: Buffer de fosfatos
PIP2	: Fosfatidil inositol bifosfato
PKC	: Proteincinasa C
POA	: Área preóptica
SAM	: Simpático-adreno-medular
SNA	: Sistema nervioso autónomo
SNC	: Sistema nervioso central
ST	: Estría terminal
T	: Testosterona
11 β -HSD	: 11- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa

Resumen

El estrés es una reacción fisiológica del organismo en el que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante o demanda incrementada. La intensidad y duración del estresor son determinantes en la respuesta de dicho organismo, por lo que la exposición prolongada a un factor estresante puede traer como consecuencia una respuesta patológica. Alteraciones en el ambiente intrauterino durante la etapa fetal puede influir en la susceptibilidad a enfermedades de tipo neurológico, metabólico o endocrino de la descendencia en la edad adulta. El estrés prenatal se ha relacionado con alteraciones permanentes sobre algunos patrones reproductivos de las crías en la edad adulta, pero aún se requiere mayor información al respecto. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del estrés prenatal sobre algunos parámetros reproductivos de las ratas machos y hembras y su repercusión en la fertilidad. Se utilizaron ratas gestantes de la cepa Wistar y se dividieron en dos grupos: Control (CON) y estrés prenatal (EP). El grupo CON se mantuvo sin perturbación. El grupo EP se sometió a estrés por inmersión en agua fría del día 16 al 21 de gestación, dos veces al día. Una vez que nacieron las crías, se homogenizaron las camadas, se destetaron y se determinó el sexo el día 22 de edad. A los tres meses de edad, se inició la evaluación de parámetros reproductivos. En las hembras estresadas prenatalmente, las concentraciones de corticosterona fueron mayores que en las hembras control; el porcentaje de hembras EP que presentaron ciclos estrales anormales fue mayor que en el control, así como mayores niveles de estradiol en las etapas de estro y proestro. El cociente lordótico de las hembras EP fue similar al grupo CON, pero la intensidad de lordosis fue menor. El peso ovárico en las etapas de proestro fue menor en el grupo EP. En el caso de los machos, el porcentaje de sujetos que eyacularon fue menor en los EP; las latencias de monta e intromisión fueron mayores que las del grupo CON. El peso testicular y los niveles de testosterona fueron menores en los machos EP;

el número de células de Leydig y células germinales en apoptosis, así como el porcentaje de túbulos con células apoptóticas fue mayor en los machos EP. La viabilidad, la movilidad y la concentración espermática fueron menores en los machos EP en comparación a los machos control. Así mismo, en los machos EP la concentración de corticosterona fue más alta que en los control. La tasa de fertilidad tanto en los machos como en las hembras EP fue menor que en los grupos control. Finalmente, las hembras EP tuvieron un menor número de crías por camada. Los resultados de este trabajo muestran que el estrés prenatal altera diversos aspectos reproductivos en la descendencia, probablemente a través de los elevados niveles de glucocorticoides maternos a los que se exponen los fetos. Todo ello repercute en una menor fertilidad, tanto en los machos como en las hembras en la edad adulta.

Abstract

Stress is a physiological reaction of the body which allows coping with a situation that is perceived as threatening. The intensity and duration of the stressor are important determinants in the response of the organism, so that prolonged exposure to a stressor may result in some pathology. The intrauterine environment on fetus may also influence susceptibility to neurological, metabolic or endocrine diseases in adulthood. Prenatal stress has been linked to early programming of brain function, because it causes permanent changes on some reproductive patterns of offspring in adulthood, so more information is required. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of prenatal stress on some reproductive parameters in males and females and its consequences in fertility. Pregnant Wistar rats were used and assigned to one of two groups: Control (CON) and prenatal stress (PS). The CON group remained undisturbed. The EP group underwent stress by immersion in cold water from day 16 to 21 of gestation, twice daily. After birth the litters were homogenized; they were sexed and weaned at 22 days. At three months of age, reproductive parameters mentioned assessment began. Female offspring showed higher corticosterone levels than control; the percentage of PS females with abnormal estrous cycles was higher than in control females, as well as higher estradiol levels in Proestrus and Estrus. Lordotic quotient in PS females was similar to the control group, but the intensity of lordosis was lower. Ovarian weight in proestrus stage was lower in PS group. Regarding males, The percentage of ejaculating males was lower in PS; mount and intromission latencies were higher than in controls Testicular weight and testosterone levels were lower in PS males. The number of apoptotic Leydig and germinal cells, as well as percentage of apoptotic cell per tubule were higher in PS males. Sperm viability, motility and count were lower than in controls.

Likewise, corticosterone levels were higher in PS males compared with control males. Fertility rate in both PS males and females was lower than in the control groups. Finally, PS females had fewer pups per litter. The results of this work show that prenatal stress disrupts several reproductive patterns in offspring, probably by exposing them to high levels of maternal glucocorticoids, leading to a decreased fertility, both in males and females in adulthood.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Reproducción	1
1.2 Neuroendocrinología reproductiva de la rata hembra	2
1.3 Neuroendocrinología reproductiva de la rata macho	10
1.4 Diferenciación sexual del Sistema Nervioso Central (SNC) en la rata	21
1.5 Diferencias morfológicas de núcleos hipotalámicos relacionados con la conducta reproductiva entre la rata macho y hembra.	22
1.6 Concepto de estrés	27
1.7 Respuesta al estrés	27
1.8 Efectos fisiológicos de los glucocorticoides	29
2. ANTECEDENTES	31
2.1 El estrés prenatal y la programación fetal.	31
2.2 Glucocorticoides en la etapa fetal	33
2.3 Efectos del estrés prenatal en ratas macho.	34
2.4 Efectos del estrés prenatal en ratas hembra.	35
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
4. JUSTIFICACIÓN	36
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	36
6. HIPÓTESIS	36
7. OBJETIVO GENERAL	37
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
9. MATERIALES Y MÉTODOS	37
10. DISEÑO EXPERIMENTAL	37
10.1 Método inductor de estrés prenatal	38
10.2 Evaluación de parámetros reproductivos en las hembras	38
10.2.1 Ciclo estral	38
10.2.2 Conducta sexual femenina	39
10.2.3 Órganos reproductores femeninos	40
10.2.4 Concentración sérica de estradiol, progesterona y corticosterona	40
10.3 Evaluación de parámetros reproductivos en los machos	41
10.3.1 Conducta sexual masculina	41
10.3.2 Órganos reproductores masculinos	42
10.3.3 Análisis espermático	42
10.3.4 Apoptosis en células testiculares por TUNEL	43

10.3.5 Cuantificación de testosterona y corticosterona	45
10.4 Pruebas de fertilidad en machos y hembras	46
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
12. RESULTADOS	46
12.1 Corticosterona en hembras gestantes	46
12.2 Descendencia femenina y masculina	47
12.3 Hembras	47
12.3.1 Ciclo estral	47
12.3.2 Conducta sexual femenina	52
12.3.3 Peso corporal	54
12.3.4 Órganos reproductores de las hembras	54
12.3.5 Estradiol y progesterona	55
12.3.6 Corticosterona	56
12.3.7 Fertilidad y número de crías	57
12.4 Machos	59
12.4.1 Conducta sexual masculina	59
12.4.2 Peso corporal	61
12.4.3 Órganos reproductores de los machos	62
12.4.5 Parámetros espermáticos	62
12.4.6 Morfología espermática	63
12.4.7 Apoptosis en células testiculares	64
12.4.8 Testosterona	67
12.4.9 Corticosterona	67
12.4.10 Fertilidad	68
13. DISCUSIÓN	68
14. CONCLUSIONES	78
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Reproducción

La reproducción es un proceso biológico que permite la creación de nuevos organismos, siendo una característica común de todas las formas de vida conocidas, asegurando así, la perpetuación de la especie y el incremento en el número de individuos para aumentar la capacidad colonizadora de dicha especie (López, 2008). La reproducción consiste en una serie de mecanismos encaminados a lograr un nuevo individuo mediante la transmisión de información genética. Cada nuevo individuo se genera a partir de una nueva dotación genética. El nuevo genoma puede conseguirse por réplica del material genético de un solo individuo (reproducción asexual); o también puede existir intercambio, o fusión del ADN, procedentes de individuos distintos (reproducción sexual) (López, 2008).

Los mamíferos, incluida la rata, se reproducen de manera sexual, en donde intervienen células especiales originadas por procesos de meiosis, los gametos masculino (espermatozoide) y femenino (ovocito), caracterizados por contar con una carga genética haploide. Los gametos son producidos en las gónadas tanto masculinas (testículos) como femeninas (ovarios). Para que se genere una nueva vida, debe producirse la interacción entre los gametos en donde el espermatozoide puede fecundar a un ovocito (fertilización) (López, 2008). La producción de gametos se lleva a cabo cuando un organismo alcanza la madurez sexual, en la rata esto ocurre alrededor de los 3 meses de edad presentando un periodo de vida media de 3 años aproximadamente y un periodo de vida reproductiva de 1 año (Hafez, 1970). Tanto en machos como en hembras, esta producción de gametos es controlada por un sistema neuroendocrino.

1.2 Neuroendocrinología reproductiva de la rata hembra

La reproducción en las hembras está sujeta a un fino control de eventos neuroendocrinos que tienen como finalidad la producción de células germinales femeninas susceptibles a ser fecundadas para generar nuevos individuos. La producción de estos gametos femeninos está bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y se activa a través de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH o GnRH I en mamíferos) (Anjum et al., 2009). Es un decapeptido producido por una red de neuronas hipotalámicas y tiene un papel fundamental en la regulación del control neuroendocrino de la reproducción, ya que es la principal señal cerebral responsable de la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Gore et al., 2000; Smith y Jennes, 2001; Pawson et al., 2003). La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario inicia con la secreción pulsátil de GnRH desde las neuronas parvicelulares neurosecretoras localizadas en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular y el área preóptica (Tanriverdi et al., 2003). Se ha reportado que los neuropéptidos como la kisspeptina regulan la secreción de GnRH en el hipotálamo. Este es un péptido secretado principalmente por las neuronas del Área Ventral Periventricular (AVPV) y estimula la secreción de la GnRH en el hipotálamo, participando tanto en el inicio de la pubertad como en el funcionamiento normal del eje reproductivo (De Roux et al., 2003, Seminara y Kaiser, 2005; Messenger, 2005a; Messenger, 2005b; Tena-Sempere, 2005; Aparicio, 2005; Vogel, 2005; Popa et al., 2005; Dungan et al., 2006). La kisspeptina actúa a través de un receptor acoplado a proteína G, llamado GPR54 o KiSS-1R, localizado en la membrana plasmática de las neuronas GnRH (Stafford et al., 2002). Aproximadamente el 90% de estas neuronas expresan el receptor GPR54 (Han et al., 2005). La unión de la Kisspeptina a su receptor Kiss-1R activa a la proteína Gq y a la fosfolipasa C para romper el 4,5 fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (d'Anglemont de Tassigny y Colledge, 2010). El IP₃ causa la liberación

intracelular de calcio desde el retículo endoplásmico y activa a la proteína cinasa C (PKC) y una cascada de fosforilación para la estimulación de tres proteínas cinasas (RAF Y MEK) que actúan de forma secuencial y que culmina con la activación de la MAP cinasa también denominada como ERK (vía de cinasas activadas por mitógenos). La despolarización de la neurona GnRH es causada por la activación de un canal de cationes no selectivo (TRPC-receptores denominados TRP por sus siglas en inglés Transient Receptor Potential Cation Channel, están constituidos por proteínas transmembrana que forman un canal por donde puede transitar el calcio y otros cationes) así como a la inhibición de la entrada de potasio mediante el DAG. La liberación de Kisspeptina es pulsátil y controla así la secreción de la GnRH (d'Anglemont de Tassigny y Colledge, 2010). La GnRH liberada del área preóptica es transportada a los axones localizados en la eminencia media y es liberada hacia el sistema porta-hipofisario, a través del cual es transportado hasta llegar a la adenohipófisis, donde se une a receptores membranales acoplados a Proteína G en los gonadotropos adenohipofisarios. Esta neurohormona estimula a su vez la síntesis y liberación de LH y FSH al torrente sanguíneo (Tanriverdi et al., 2003). La amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH, junto con la retroalimentación por parte de la progesterona y estrógenos, controlan los procesos de síntesis y secreción de LH y FSH desde los gonadotropos adenohipofisarios. Una baja frecuencia y alta amplitud de pulsos de GnRH lleva a la liberación de FSH, mientras que los pulsos de alta frecuencia y baja amplitud estimulan la liberación de LH. Sin embargo, en la hembra la frecuencia de los pulsos de GnRH varía durante el ciclo estral, siendo más alta durante la oleada pre-ovulatoria de LH y más baja durante la fase luteal del ciclo estral (Herbison, 1997; Turkstra y Meloen, 2006).

La FSH actúa sobre las células de la granulosa en el ovario y estimula el crecimiento y el desarrollo de los folículos, los cuales durante su crecimiento sintetizan estradiol (Turkstra y Meloen, 2006). La LH estimula a las células de

la teca para producir andrógenos, los cuales son captados por las células de la granulosa para ser aromatizados a estrógenos, por medio de la enzima aromatasa. Los estrógenos actúan a dos niveles: 1) hipotalámico, estimulando y aumentando la descarga de GnRH, y 2) a nivel de adenohipófisis, aumentando la sensibilidad de los gonadotropos a la GnRH, lo que resulta en un aumento importante en la descarga de LH, disparando así la ovulación (Redondo, 2003; (Turkstra y Meloen, 2006). De esta manera, el aumento en el nivel sanguíneo de estradiol proveniente del folículo maduro tiene un efecto de retroalimentación positiva directamente sobre las neuronas Kisspeptinérgicas en el AVPV del hipotálamo y sobre los gonadotropos adenohipofisarios, induciendo la liberación de GnRH y en consecuencia, la oleada preovulatoria de LH. Adicionalmente, los esteroides gonadales pueden inhibir la secreción de kisspeptina actuando sobre las neuronas localizadas en el núcleo arcuato para inhibir su secreción y por lo tanto la liberación de GnRH, dando como resultado efectos de retroalimentación negativa (d'Anglemont de Tassigny y Colledge, 2010; Smith y Jennes, 2001; Turkstra y Meloen, 2006). Además de la Kisspeptina, que tiene un efecto estimulante en la secreción de GnRH, recientemente se ha identificado en aves y otros vertebrados e invertebrados, un pequeño péptido hipotalámico de 12 aminoácidos, el cual actúa directamente sobre la hipófisis inhibiendo la síntesis y liberación de gonadotropinas, por lo que se le denominó hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) (Tsutsui et al., 2000). La GnIH pertenece a la familia de péptidos RFamida (péptidos que tienen en común una terminal c: arg-fen-NH₂ y que están involucrados en la reproducción de vertebrados), que está presente tanto en invertebrados como en vertebrados (Tsutsui et al., 2000; Tsutsui y Ukena, 2006; Tsutsui et al., 2007) (Figura 1). Este neuropéptido se sintetiza en forma de un precursor que, en los mamíferos, contiene la secuencia de dos péptidos de la familia RFamida (Tsutsui y Ukena, 2006).

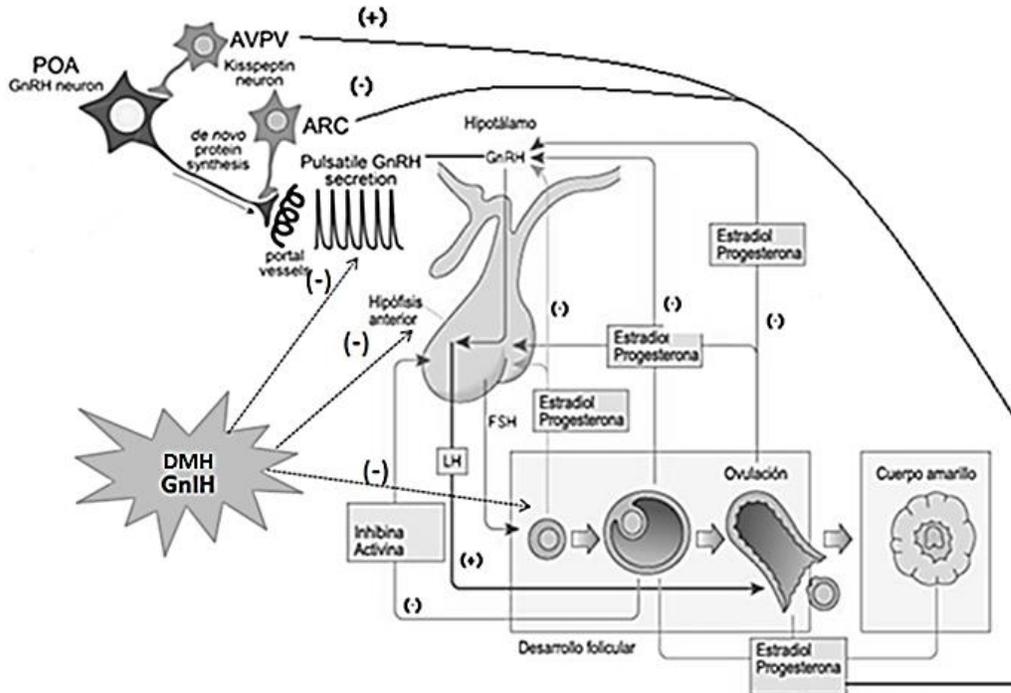


Fig. 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Estimulación de los pulsos de GnRH por parte de la kisspeptina en el Área Ventral Periventricular (AVPV). Retroalimentación positiva por parte de los esteroides ováricos sobre las neuronas del AVPV para estimular la secreción de kisspeptina. Retroalimentación negativa por parte de los esteroides ováricos para inhibir las neuronas kisspeptinérgicas en el núcleo arcuato (ARC). Inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-ovario por parte de la GnIH en el núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH) (Modificado de: Han, 2013).

La distribución de fibras de GnIH en el cerebro es particularmente evidente en el núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH), la eminencia media hipotalámica, en el telencéfalo (septum y paleoestriaovenral), en el área preóptica (POA), en el techo óptico y en el bulbo raquídeo (Tsutsui y Ukena, 2006). En el área preóptica, las fibras de GnIH aparecen en el entorno de las células GnRH-I, así como en la proximidad de las fibras GnRH-I presentes en la eminencia media (Bentley et al., 2003). Estas evidencias sugieren que la GnIH puede modular la síntesis y liberación de GnRH en el hipotálamo, además de ejercer efectos inhibitorios directos sobre la secreción de gonadotropinas hipofisiarias. De esta forma, el efecto en general de GnIH, es inhibir la reproducción a nivel del hipotálamo, hipófisis y ovarios (Kriegsfeld, 2006; Tsutsui et al., 2007). Por lo tanto, función reproductiva de la hembra de mamífero está bajo el control de

todas estas hormonas y péptidos liberados por el hipotálamo y la adenohipófisis, regulando así la función del ovario, del útero, de las glándulas mamarias y del epitelio vaginal (Freeman, 2006). De esta manera, los cambios hormonales a lo largo del ciclo reproductivo femenino se reflejan en la progresión del ciclo estral.

Ciclo estral

El ciclo sexual o ciclo estral es un fenómeno rítmico, con períodos regulares pero limitados de receptividad sexual, asociado, en la mayoría de los casos, con la liberación de óvulos capaces de ser fertilizados (Freeman, 2006). En la rata, el ciclo estral dura 4 días aproximadamente y consta de las siguientes etapas: proestro con duración de 12 horas, estro con duración de 12 horas, metaestro con duración de 21 horas y diestro con duración de 65 horas aproximadamente (Freeman, 2006). La corta duración del ciclo estral en las ratas permite que esta sea una especie ideal para la investigación de los cambios que se producen durante el ciclo reproductivo (Marcondes et al., 2001).

Durante el proestro, las células de la granulosa del ovario secretan inhibina, un complejo proteico compuesto por un subunidad beta y una alfa que pertenece a la familia TGF- β (Factores de crecimiento), este complejo regula a la baja la síntesis de FSH inhibiendo su secreción. Al final del proestro, se produce el pico de FSH y LH debido al aumento significativo de estrógenos y en el estro se desencadena la ovulación y los niveles de LH y estrógenos bajan a sus niveles mínimos basales (Figura 2). En esta etapa los estrógenos también estimulan el epitelio vaginal y la queratinización del mismo, presentándose en la etapa de proestro un proceso de proliferación en el que se observa una gran cantidad de células nucleadas en el exudado vaginal. En la etapa de estro a través de frotis vaginales se pueden observar células de forma irregular y queratinizadas. En el útero, los estrógenos producen hiperemia (aumento en la irrigación del útero) y acumulación de fluido. Después de la ovulación, bajo el estímulo de la LH las

células de la granulosa y de la teca se luteinizan formando el cuerpo lúteo (fase de metaestro y diestro) que produce progesterona, la cual a su vez inhibe la secreción de GnRH y en consecuencia de LH y FSH (Tanriverdi et al., 2003). En la etapa de metaestro o diestro 1 (fase lútea temprana) comienzan a detectarse un aumento en los niveles de progesterona (producida por el cuerpo lúteo). Hay presencia de leucocitos que realizan una función protectora al impedir la presencia de otras bacterias y hongos; y también se observan células queratinizadas en el exudado vaginal. Durante el diestro los niveles hormonales permanecen bajos durante la mayor parte del ciclo. El cuerpo lúteo secreta progesterona y en menor grado estrógenos. La progesterona induce la mucificación del epitelio vaginal. En el útero se inicia la degeneración epitelial presentándose en el exudado vaginal una gran cantidad de leucocitos. Si no hay gestación, el cuerpo lúteo inicia su regresión como resultado de la producción de sustancias luteolíticas (prostaglandinas) en el útero (Turkstra y Meloen, 2006). El nivel de progesterona en la sangre disminuye, estimulando al hipotálamo para que produzca GnRH, que actúa sobre la adenohipófisis y causa nuevamente secreción de FSH y LH, reiniciando el ciclo. Si la hembra queda gestante, el cuerpo lúteo permanece, crece y se convierte en el cuerpo lúteo de la gestación, y continúa secretando progesterona hasta el final de la preñez (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002; Redondo, 2003; Turkstra y Meloen, 2006) (Figura 2).

La secreción de esteroides ováricos durante el ciclo estral también influye sobre la conducta sexual de la hembra. Durante las etapas de estro y proestro la hembra presenta una conducta receptiva, lo cual permite la aceptación del macho para copular. En las etapas de metaestro y diestro la hembra no presenta una conducta receptiva (Hafez, 1970).

Conducta sexual femenina

La mayoría de los animales, especialmente las hembras, son selectivos al copular. La elección de la pareja sexual refleja consideraciones relacionadas con

el éxito reproductivo. El cortejo permite que los animales se evalúen previamente antes de copular (Kirkpatrick, 1996).

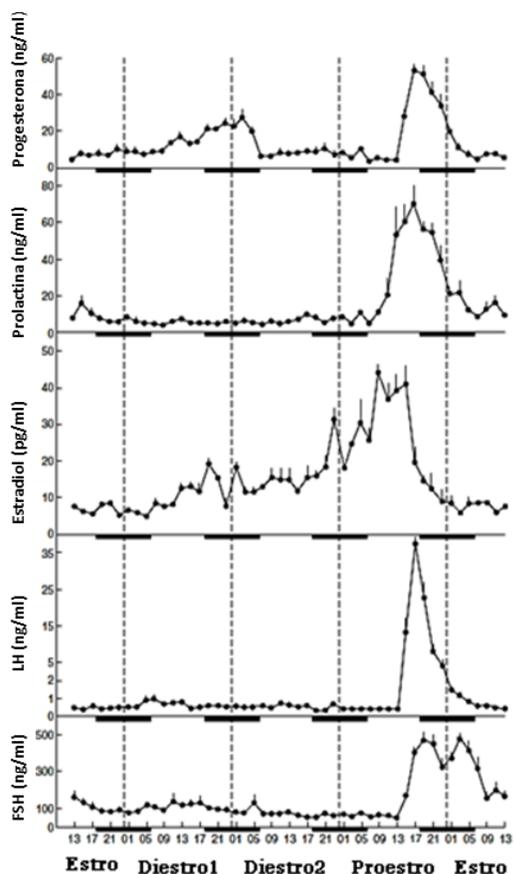


Figura 2. Secreción de hormonas hipofisarias y ováricas a lo largo del ciclo estral de la rata. Se muestran las concentraciones de progesterona, prolactina, estradiol, LH, y FSH en plasma periférico obtenido a intervalos de 2 horas durante cada día del ciclo estral. Cada punto representa la concentración de la hormona media (\pm SE). Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en el cuarto de los animales (06: 00-18: 00) y los números por debajo de ellas representan la hora del día en términos del reloj de 24 horas (Modificado de Freeman, 2006)

La conducta sexual de la hembra es regulado por un circuito neurológico complejo, en el cual está involucrada el núcleo ventromedial (NVM) y se muestra en la Figura 3. El NVM se encuentra presente en el hipotálamo y participa de manera importante en el reflejo de lordosis, esta respuesta es mediada por altos niveles de estrógenos y progesterona (Davis et al., 1979; Pfaff y Sakuma, 1979).

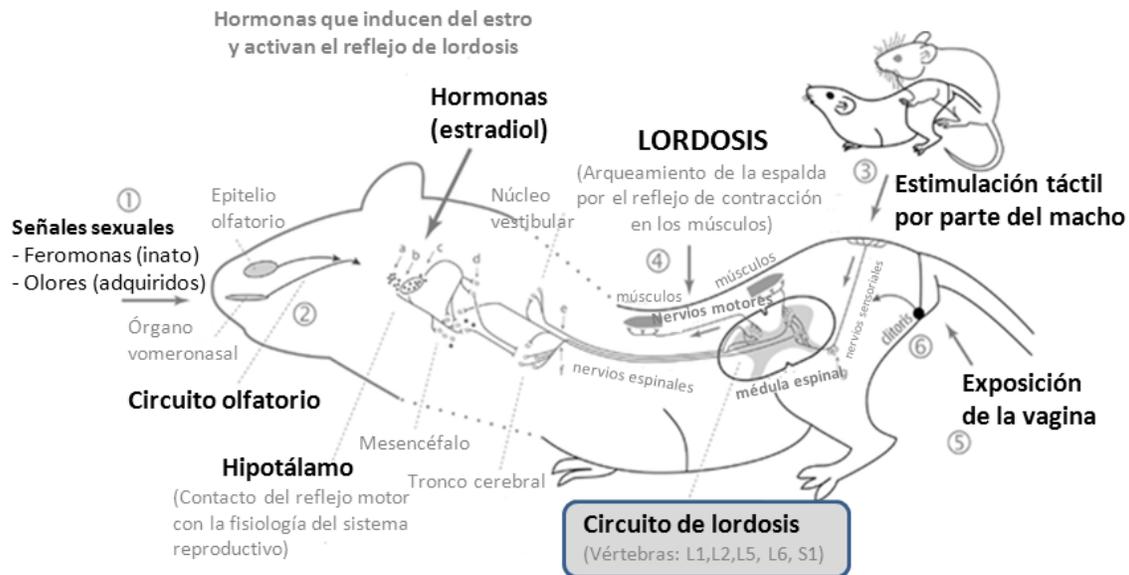


Figura 3. Circuitos neurológicos del reflejo sexual de lordosis en la rata. La lordosis es indispensable para llevar a cabo la cópula. Este reflejo sexual está integrado por la médula espinal, la cual recibe aferencias moduladoras del cerebro anterior que responden a estrógenos y progesterona. a) núcleo preóptico medial; b) núcleo anterior hipotalámico; c) núcleo hipotalámico ventromedial; d) formación reticular mesencefálica; e) vías del vestibulo-espinal; f) tracto retículo-espinal; g) raíces dorsales L1, L2, L5, L6 y S1. NB: el circuito neural es bilateral (Tomado de: González-Flores et al., 2007; Kow et al., 2007; Knobil and Neill, 2005 y Haga et al., 2010).

Sobre la conducta sexual pueden influir las condiciones del medio ambiente externo (fotoperiodo, temperatura, alimentos, depredadores, etc.) así como procesos reguladores intrínsecos que afectan por separado a cada individuo (madurez sexual, ovulación y gametogénesis) y procesos reguladores extrínsecos que afectan a los dos individuos a la vez (cada comportamiento sexual individual es una fuente de señales para el compañero). En la conducta sexual podemos distinguir dos componentes. En primer lugar, aparece una conducta precopulatoria (procesos previos a la copulación). Esta conducta implica en el animal la “motivación sexual”. En el sistema nervioso central se produce la integración de todos los estímulos sensoriales como son los olfateos

ano-genitales, las vocalizaciones ultrasónicas por parte del macho, así como el contacto de los cuerpos entre sí cuando el macho persigue a la hembra. Además, existe una influencia hormonal, en donde las feromonas liberadas por parte del macho estimulan sexualmente a la hembra (Mora y Cabrera, 1994), todos estos estímulos dan como resultado la motivación sexual de la rata. En la hembra, esta conducta precopulatoria, se conoce como conducta proceptiva. La hembra durante este período estimula visualmente al macho presentando movimientos rápidos de las orejas, correr en zig-zag o dar pequeños saltos. La duración de la conducta precopulatoria es variable, puede ser extremadamente corta (escasos segundos) o larga (algunos minutos) (Madlafousek y Hlíňák, 1997). En segundo lugar se produce la conducta copulatoria, la cual implica la ejecución de diversas posturas y movimientos que permiten la inserción peneana y la expulsión seminal. La hembra presenta un reflejo conocido como lordosis, que consiste en el arqueamiento del dorso que se acompaña de la elevación de la cabeza y grupa y desviación lateral de la cola (Madlafousek y Hlíňák, 1997).

1.3 Neuroendocrinología reproductiva de la rata macho

Las neuronas GnRH (productoras de GnRH) representan la ruta de salida final de la red neural que integra diversas señales internas y ambientales que regulan la secreción de LH y FSH desde la adenohipófisis (Smith y Jenness, 2001). La descarga neuronal pulsátil de GnRH, regulada en amplitud y frecuencia, es esencial para el mantenimiento de los perfiles séricos de gonadotropinas requeridos para la esteroidogénesis y gametogénesis normales (Conn y Crowley, 1994). La Kisspeptina se libera de forma pulsátil y estimula a su vez la secreción pulsátil de la GnRH, sin embargo, el área AVPV que contiene neuronas que secretan kisspeptina es mucho menor en los machos en comparación con las hembras, por tanto, existe una menor estimulación de GnRH por parte de la kisspeptina (Gottsch et al., 2004; Clarkson y Herbison,

2006). En los machos la GnRH es secretada en pulsos a una frecuencia constante (Herbison, 1997; Turkstra y Meloen, 2006).

La FSH y la LH liberadas en respuesta a la estimulación de GnRH juegan un papel fundamental en la espermatogénesis. La LH actúa sobre la membrana de las células de Leydig mediante un receptor acoplado a proteínas G. La unión al receptor activa señales de transducción mediante el AMP cíclico y el sistema inositol trifosfato y fosfolipasa C. Esta activación estimula la síntesis de las enzimas necesarias para la síntesis de testosterona (T). Como el resto de los esteroides, su estructura deriva de la molécula del ciclopentanoperhidrofenantreno, hidrocarburo policíclico de 17 átomos de carbono, constituido por cuatro anillos: un ciclopentano y tres anillos, resultado de la saturación del fenantreno (Ferrán, 2011). De esta estructura se deriva la molécula de colesterol, que es captado por las células de Leydig a través de receptores de lipoproteínas de baja densidad o lipoproteínas de alta densidad, o generado *ex novo* mediante vías de síntesis o a partir de ésteres de colesterol. En el retículo endoplásmico liso, el colesterol es transformado sucesivamente por enzimas mitocondriales en pregnenolona, 17-hidroxi-pregnenolona, dihidroepiandrosterona, androstenodiol y androstenodiona, y finalmente en testosterona, cuya molécula está formada por 19 átomos de carbono, con una doble ligadura entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C17 (Ferrán, 2011) (Figura 4).

Por otra parte, FSH se une a receptores de membrana en la célula de Sertoli y en las espermatogonias, estimulando la adenilciclase con aumento de AMP cíclico, con activación de proteincinasas y fosforilación de varias proteínas involucradas en esta vía de señalización (Dufau, 1998). La FSH es responsable del inicio de la espermatogénesis, y en adultos puede participar, junto con la testosterona producida por las células de Leydig, en el mantenimiento de la producción espermática. La FSH actúa en varios niveles: estimula la mitosis de

células de Sertoli, por lo que aumenta su cantidad durante la pubertad, y promueve la maduración y el desarrollo de las denominadas uniones estrechas entre las células de Sertoli. El efecto en las células de Sertoli se evidencia en un aumento en la producción de proteína unidora de andrógenos (ABP), así como de transferrina, inhibina, aromatasa y activador del plasminógeno, así como un incremento en la captación de glucosa y su conversión a lactato (McLachlan et al., 1996)

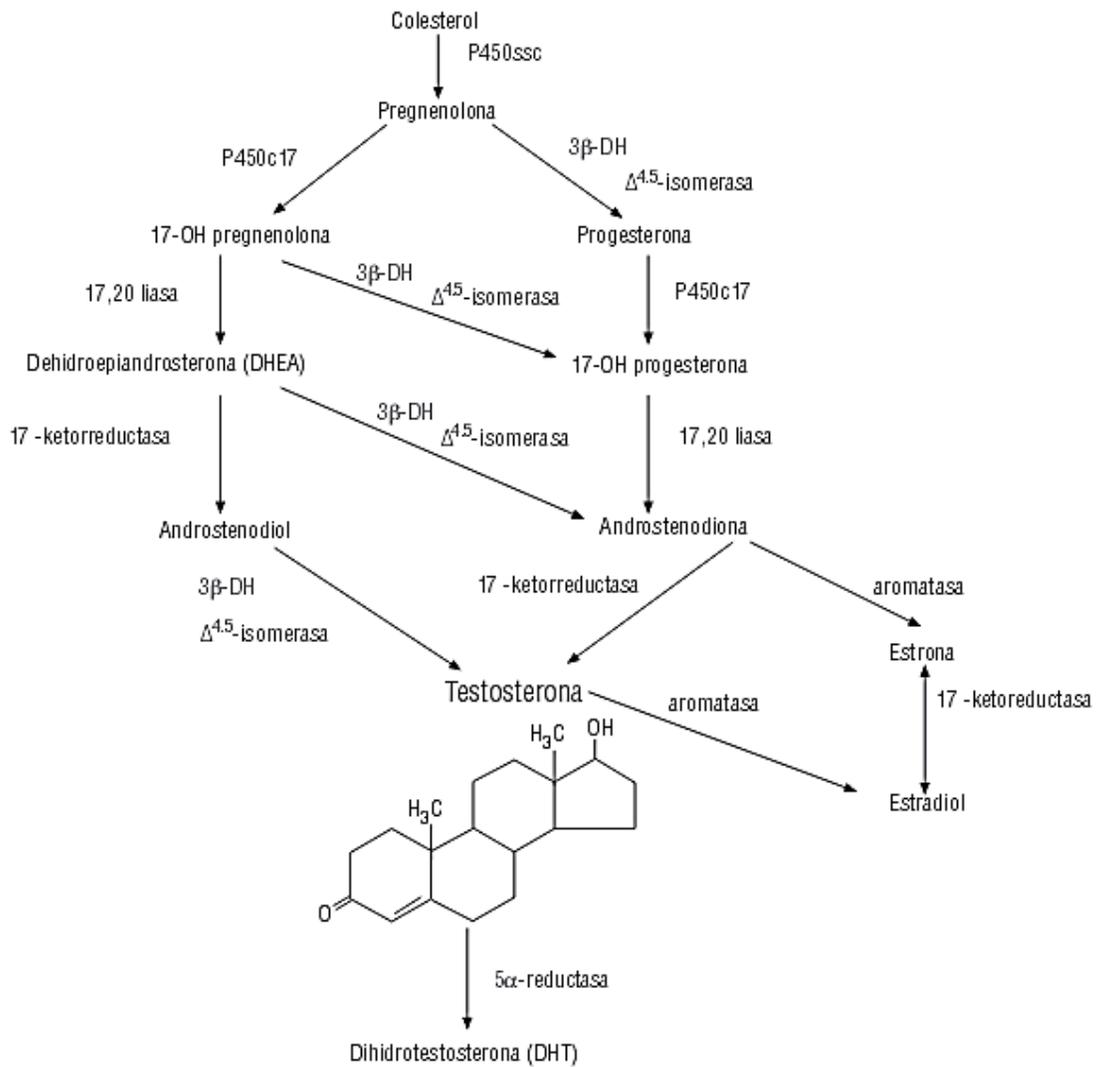


Figura 4. Biosíntesis de andrógenos (Tomado de Ferrán, 2011).

Las células de Sertoli, por estimulación de FSH, aromatizan parte de la testosterona procedente de las células de Leydig convirtiéndola en estradiol. El

estradiol también se ha postulado como necesario para el desarrollo de la espermatogénesis, ya que se ha demostrado que estimula la multiplicación de las células madre en animales experimentales. La deficiencia del receptor α estrogénico causa una marcada disminución de la espermatogénesis (Eddy et al, 1996). También se ha demostrado un efecto estrogénico en la secreción de inhibina B por las células de Sertoli. Es probable que dicha acción estrogénica sea importante para el desarrollo celular y función de las células de Leydig (O'Donnell et al., 2001). La ABP fija la testosterona en el testículo, facilitando su acción en la espermatogénesis y sirve como transportadora de la misma en el plasma. Del 97 al 99% de la testosterona circulante se encuentra unida ABP, el resto se encuentra libre y es metabolizada (Stocco y McPhaul, 2006). Una pequeña parte es transformada en estrógenos, otra es transformada en un derivado mucho más potente, la 5 dihidrotestosterona (5-DHT) y el resto es metabolizado a 17-cetosteroides (androsterona, epiandrosterona y eticolanolona) con un 20% menos de actividad (Stocco y McPhaul, 2006). La excreción se hace por la orina, donde los 2/3 son de origen suprarrenal y el resto testicular (Kahn et al., 2002). Altos niveles de testosterona inhiben la secreción de LH por un mecanismo de retroalimentación negativa que actúa sobre el núcleo arcuato (secretor de Kisspeptina) en el hipotálamo, inhibiendo así la liberación de GnRH (Figura 5). Por su parte, la inhibina es el principal regulador de la liberación de FSH, ya que tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la adenohipófisis; cuando hay suficiente, la adenohipófisis deja de producir FSH. Por otro lado la activina actúa sobre la adenohipófisis pero estimulando la liberación de FSH (Haughian y Wiltbank, 2002; Turkstra y Mueloen, 2006).

La GnIH modula la síntesis y liberación de GnRH en el hipotálamo, además de ejercer efectos inhibitorios directos sobre la secreción de gonadotropinas hipofisiarias. Experimentos con aves, demostraron que la GnIH también es capaz de inhibir el desarrollo gonadal, la síntesis de esteroides y la actividad

espermatogénica, lo que sugiere que este neuropéptido puede actuar a distintos niveles del eje reproductivo masculino (Tsutsui et al., 2007) (Figura 6)

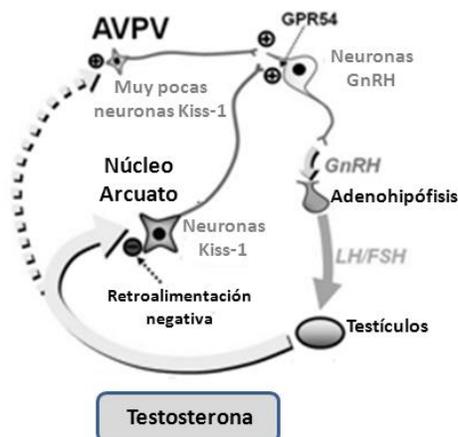


Figura 5. Mecanismo de retroalimentación negativa por parte de la testosterona que actúa sobre el núcleo arcuato (secretor de Kisspeptina) en el hipotálamo para inhibir la liberación de GnRH (Tomado de: Kauffman et al., 2007).

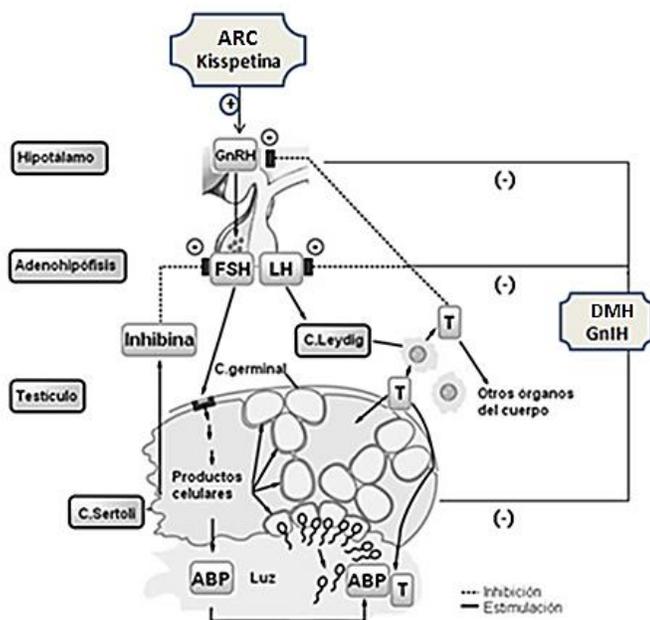


Figura 6. Retroalimentación entre las hormonas testiculares y el eje hipotálamo-hipófisis. Estimulación de la GnRH por parte de las kisspeptinas liberadas en el núcleo arcuato (ARC). Inhibición a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-testículo por parte de GnIH liberada en el núcleo dorsomedial hipotalámico:

http://202.207.136.56/kcsb/yundongshenglixue/picture/Image_Bank/CH23/FG23_11.jpg

Las principales funciones de los andrógenos son estimular las primeras etapas de la espermatogénesis (espermatocitogénesis) y aunado a esto, la función del epidídimo es andrógeno dependiente (O'Donnell et al., 2006). En la espermatogénesis se presentan 3 etapas. 1) La etapa de espermatocitogénesis: reducción cromosómica de células diploides en la fase espermatogónica, 2) la fase espermatocítica, y 3) la espermiogénesis: formación de células haploides (Chenoweth, 1997). En la fase espermatogónica, las espermatogonias tipo A se dividen solo para formar otra espermatogonia idéntica y las espermatogonias tipo B2 se diferencian para formar espermatocitos primarios. Los espermatocitos primarios a través de una primera división meiótica (meiosis I) originan dos espermatocitos secundarios en la fase espermatogónica. Los espermatocitos secundarios llevan a cabo la segunda división meiótica (meiosis II), de esta división resultaran cuatro espermátidas. Las espermátidas siguen el proceso de maduración conocido como espermiogénesis, donde en dicha fase las espermátidas se convierten en espermatozoides sufriendo las siguientes transformaciones: el núcleo se hace más pequeño y denso (compactación del ADN), el acrosoma se dispone en el extremo apical, se reduce el citoplasma; tanto el núcleo como el acrosoma forman la cabeza del espermatozoide y se forma el flagelo o cola del espermatozoide (Hafez, 1989) (Figura 7).

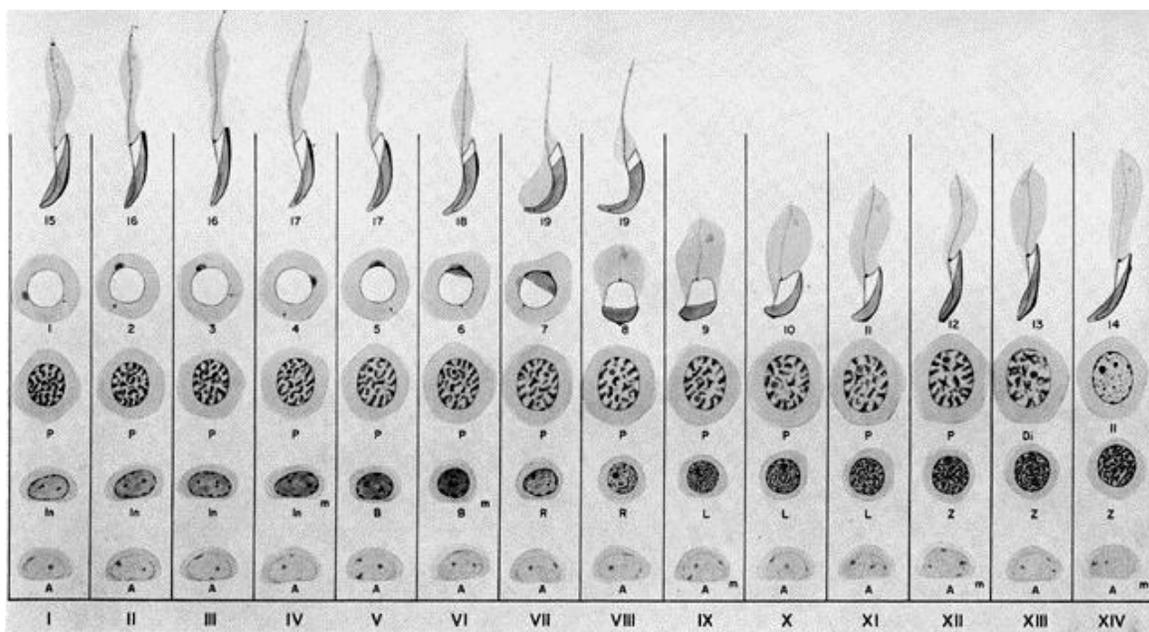


Figura 7. Etapas de la espermatogénesis en la rata. Cada columna vertical muestra la secuencia de las generaciones en las células germinales que se observan en un corte histológico de un túbulo seminífero de la rata en cada etapa. I-XIV (las 14 etapas). Espermatogonias: A (tipo A), In (intermedia), B (tipo B), R ("reposo", el tiempo de replicación del ADN final), m (etapas durante las cuales se produce la mitosis de espermatogonias). Espermatocitos primarios: L (leptoteno), Z (zygoteno), P (paquiteno), Di (diacinesis). II (espermatocono secundario). 1-19 (fases de diferenciación de espermátidas = espermiogénesis) (Tomado de Perey et al., 1961).

Cuando ya se ha completado la formación de los espermatozoides, estos abandonan el testículo y pasan al epidídimo para adquirir la maduración y ser capaces de fertilizar a un ovocito. Una vez que los espermatozoides adquieren la maduración son liberados del epidídimo y se mezclan, antes de llegar a la uretra, con las secreciones de las glándulas accesorias; el conjunto de estas secreciones con los espermatozoides constituye el semen. El líquido seminal sirve de vehículo pero también proporciona sustancias necesarias para el metabolismo energético del espermatozoide. Durante la cópula el semen es depositado directamente dentro del útero, formando un tapón vaginal gelatinoso que impide la salida del semen de la vagina. La eyaculación es consecuencia de las contracciones de la musculatura uretral, estimuladas por las contracciones de la vagina (Hafez, 1989). La testosterona también es responsable de promover el crecimiento, el desarrollo y la actividad secretora de los órganos sexuales accesorios del macho, como la próstata, las glándulas seminales, las glándulas bulbouretrales, el conducto deferente y los genitales externos (Stocco y McPhaul, 2006).

Conducta sexual masculina

El Área preóptica media (MPOA, por sus siglas en inglés) es un sitio integrador fundamental para el comportamiento sexual de la rata macho. Las conexiones del MPOA permiten modificar el procesamiento de la información sensorial. (Hull et al., 2006). Por otra parte, el MPOA y sus principales aferentes contienen receptores a esteroides que proporcionan los medios para una entrada sensorial y así favorecer estímulos sexuales (Hull et al., 2006). Las

conexiones eferentes desde el MPOA son críticos para el inicio y el patrón de la cópula. Las conexiones proyectan al hipotálamo, mesencéfalo, y núcleos del tronco cerebral que regular los patrones autonómicos o somato-motriz y estados motivacionales (Yahr, 1995).

Los receptores a hormonas esteroides sexuales, principalmente T y estradiol (E_2), se localizan principalmente en:

- ⊙ MPOA
- ⊙ Amígdala (Los núcleos cortical medial y posteromedial también tienen receptores abundantes de andrógenos y estrógenos).
- ⊙ También se concentran en los núcleos de la línea media de la zona preóptica e hipotálamo
- ⊙ En el bulbo olfatorio los receptores se localizan preferentemente en los subnúcleos anteriores.
- ⊙ Cama de la estría terminal (BST) tiene abundantes receptores de esteroides

Diversos estudios demuestran que la administración de T restaura la conducta sexual en ratas castradas actuando de forma inmediata en el cerebro (Davidson, 1966). Sin embargo, los estrógenos en el MPOA también estimulan la actividad sexual en ratas machos castradas (Resko et al., 1999). El principal metabolito de T es la dihidrotestosterona (DHT), que se forma por la enzima 5α -reductasa. Aunque tanto la T y la DHT se unen a receptores de andrógenos (ARs), éstos tienen aproximadamente cinco veces una mayor afinidad por DHT (Wilbert et al., 1983). Por otra parte, la DHT no puede ser aromatizada a E_2 , y por lo tanto se considera que ésta tiene una acción androgénica "pura". La "Hipótesis de aromatización" establece que la aromatización de T a E_2 que es fundamental para el mantenimiento o la restauración de la cópula en las ratas macho (Kaplan y McGinnis, 1989). Sin embargo, E_2 no es suficiente para mantener todos los aspectos de la conducta sexual. La mayoría de los machos castrados y que fueron tratados con E_2 fueron incapaces de eyacular o tenían menos eyaculaciones que los machos tratados con T o con una combinación de

La erección y eyaculación están controladas por circuitos de neuronas localizadas en la médula espinal. Los mecanismos cerebrales ejercen un control excitador e inhibitor sobre estos circuitos. El circuito encargado de la respuesta eyaculatoria, MPOA-PAG-nPGi-médula espinal (MPOA- área preóptica medial, PAG- sustancia gris periacueductal , nPGi - Núcleo paragigantocelular, neuronas que inervan al bulbo cavernoso y músculo isquiocavernoso, esenciales para la eyaculación) (Hull et al., 2006) (Figura 9).

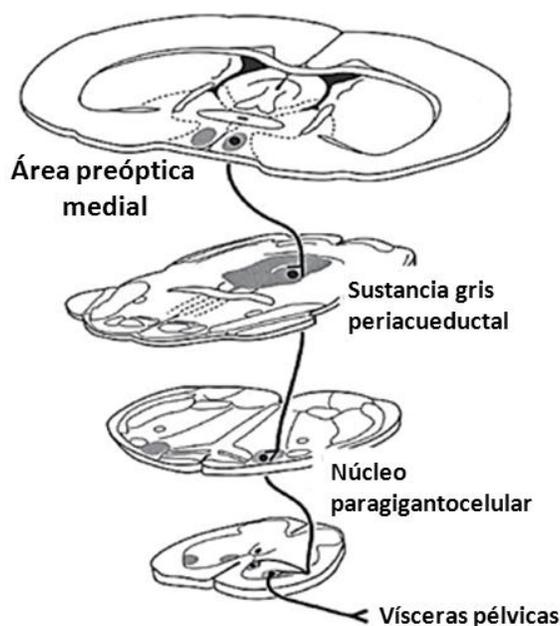


Figura 9. Circuito MPOA-PAG-nPGi- médula espinal. PAG- sustancia gris periacueductal, nPGi - Núcleo paragigantocelular. Las neuronas inervan el bulbo cavernoso y musculo isquiocavernoso, y son esenciales para la erección del pene y la eyaculación (Tomado de Hull et all., 2006).

La conducta sexual masculina se divide en conductas que se reconocen como precopulatorias, copulatorias y postcopulatorias. Durante la conducta precopulatoria, el macho realiza numerosos olfateos ano-genitales y vocalizaciones ultrasónicas (Lucio y Tlachi-López, 2008). El macho persigue a la hembra repetidamente. En algunos casos, puede rozar a la hembra, pasar debajo de ella o por encima. La conducta copulatoria implica diversas posturas y movimientos que permiten la inserción peneana y la expulsión seminal. Tales

movimientos copulatorios se identifican como patrones conductuales copulatorias. El patrón copulatorio de la rata macho es innato y está compuesto de secuencias de actividad estereotipada. Este patrón consta de montas e intromisiones repetidas que culminan con la eyaculación. En la monta, el macho abraza con sus miembros anteriores los flancos de la hembra y presenta movimientos pélvicos rítmicos de empuje, finalizando cuando el macho la desmonta lentamente (Lucio y Tlachi-López, 2008). La intromisión implica la monta más la inserción del pene en la vagina, la monta se caracteriza por movimientos pélvicos más prolongados y profundos, luego del cual el macho desmonta a la hembra, rápida y bruscamente hacia atrás y se acicala el pene. Después de varias intromisiones se produce la eyaculación (Lucio y Tlachi-López, 2008). La eyaculación es una intromisión que termina con un movimiento pélvico profundo e intenso, mantenido por algunos segundos. El acto de desmontar a la hembra es lento y se caracteriza por un movimiento lateral de las patas delanteras. La expulsión del líquido seminal y espermatozoides está asociada con contracciones espasmódicas de los músculos esqueléticos, especialmente de la cadera, la región perineal así como de los cuartos delanteros y traseros (Lucio y Tlachi-López, 2008). Durante la conducta copulatoria el macho puede presentar o no montas, y el número de intromisiones varía entre 6 y 12 antes de eyacular (Lucio y Tlachi-López, 2008). Un macho sexualmente experto puede eyacular en menos de 5 minutos después de aparearse con una hembra receptiva, completando así una serie eyaculatoria. La eyaculación es seguida por un período refractario, denominado intervalo posteyaculatorio (conducta postcopulatoria), en el que el macho entra a una etapa de inactividad sexual, presentando muy poca locomoción y acicalamiento genital, donde comúnmente permanece echado lejos de la hembra. Este período dura de 5 a 10 minutos después de la primera eyaculación y se prolonga de 1-2 minutos más con cada eyaculación sucesiva de manera regular. Después del período refractario, el animal puede reiniciar la cópula y completar así una serie copulatoria. Los patrones copulatorios que

conforman una serie copulatoria son: Latencia de monta (tiempo en segundos desde la introducción de la hembra a la jaula hasta la primera monta), latencia de intromisión (tiempo en segundos desde la introducción de la hembra hasta la primera intromisión), latencia de eyaculación (tiempo en segundos desde la primera intromisión hasta la primera eyaculación) y el intervalo posteyaculatorio (tiempo que transcurre entre la eyaculación hasta que se presenta la monta o intromisión de la siguiente serie eyaculatoria) (Lucio y Tlachi-López, 2008).

La conducta sexual tanto del macho como de la hembra, está relacionada con la diferenciación sexual que ocurre en etapas prenatales. El sexo cromosómico de un individuo se establece en el momento de la fertilización, con la aportación por el espermatozoide de un cromosoma X o un Y. El cromosoma determina si la gónada embrionaria se diferenciará hacia un ovario o un testículo. Las etapas subsiguientes del proceso de diferenciación sexual derivan de la acción de las hormonas. Si un cromosoma Y está presente, se desarrollan los testículos y su secreción hormonal conducirá al desarrollo de un fenotipo masculino. Si sólo están presentes los cromosomas X, se desarrollan los ovarios y aparecerá un fenotipo femenino. Una vez que se ha llevado a cabo la diferenciación gonadal, posteriormente ocurre la diferenciación sexual del sistema nervioso central (SNC) (Kandel et al, 1997).

1.4 Diferenciación sexual del Sistema Nervioso Central (SNC) en la rata

Las diferencias sexuales en el SNC son el resultado de la secreción de hormonas por parte de las gónadas durante periodos críticos del desarrollo prenatal (Neil et al., 1981). Dicho proceso conocido como diferenciación sexual cerebral, se lleva a cabo por la secreción de testosterona en el testículo fetal (Kandel et al., 1997) en donde las células de Leydig se activan por estimulación de la HCG para sintetizar y liberar la testosterona. Sin embargo, esta activación ocurre durante un corto periodo en la etapa de gestación, el cual se conoce como un periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral, ocurre en

los días 18 y 19 de gestación. Una vez que se ha liberado la testosterona, dicha hormona será aromatizada a estradiol mediante la enzima aromatasa en el SNC, por tanto, el estradiol es el responsable de diferenciar un cerebro sexualmente masculino (Neil et al., 1981). La mayoría de los circuitos dimórficos del cerebro son parte del hipotálamo o están íntimamente relacionados con él. El hipotálamo representa una interfase anatómica y funcional entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. De hecho, la mayor concentración de los receptores para las hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona) en el cerebro se encuentra en el hipotálamo. La hormona considerada como principal responsable de las diferencias estructurales y bioquímicas en el hipotálamo entre machos y hembras es el estradiol (Pfaff et al., 1988).

En el SNC de machos y hembras se encuentran diferencias estructurales y funcionales. El dimorfismo sexual en el SNC es un conjunto de diferencias morfológicas, bioquímicas y conductuales entre machos y hembras que son mediados por la acción de estradiol durante el periodo crítico antes mencionado, y que al interactuar entre sí en condiciones normales, son capaces de establecer estructuras sexualmente dimórficas en etapas tempranas del nacimiento (Neil et al., 1981). En el SNC se presentan diferentes núcleos y áreas que muestran dimorfismo sexual y que pueden relacionarse directamente con la fisiología y la conducta reproductiva, estos son: el área preóptica (APO), el núcleo ventromedial (NVM), el núcleo paraventricular anteroventral (NPV-AV), el núcleo supraquiasmático (NSQ), la amígdala y la estría terminal (ST) (Goy y McEwen, 1980; Dölher et al., 1986).

1.5 Diferencias morfológicas de núcleos hipotalámicos relacionados con la conducta reproductiva entre la rata macho y hembra.

Los estudios realizados en ratas hembras y machos han demostrado que las áreas cerebrales relacionadas con el control de la conducta sexual, así como con

la regulación del ciclo reproductivo en las hembras presentan diferencias entre los machos y las hembras. Dentro de éstas se pueden mencionar las siguientes:

El tamaño de APO es seis veces mayor en los machos que en las hembras (Gorski, 1978) (Fig 10). El Área Preóptica (APO) es un área del hipotálamo que es considerada como el sitio donde probablemente reside el mecanismo de regulación diferencial de las características dimórficas relacionadas con el sexo, incluyendo el control de la conducta sexual masculina, la liberación cíclica del factor liberador de gonadotrofinas y el mecanismo necesario para la ovulación en las hembras (Montano et al., 1995). Se ha demostrado el papel fundamental que juega esta área en el establecimiento de la conducta y fisiología reproductiva de la rata (Montano et al., 1995). Las conexiones del área preoptica medial (MPOA) permiten modificar el procesamiento de la información sensorial mediante la estimulación de receptores a esteroides sexuales (T y E2), los cuales están presentes en el MPOA, favoreciendo así, la estimulación sexual, por lo que estas conexiones eferentes desde el MPOA son críticos para el inicio y el patrón de la cópula (Hull et al., 2006). Por lo tanto, el MPOA es esencial para la cópula, y también contribuye a la motivación sexual. Se ha demostrado que las lesiones del MPOA eliminan la cópula en ratas macho, haciéndolos incapaces de montar a una hembra receptiva (Agmo et al., 1977; Bermond, 1982; Brackett y Edwards, 1984; Chen y Bliss, 1974; Edwards y Einhorn, 1986).

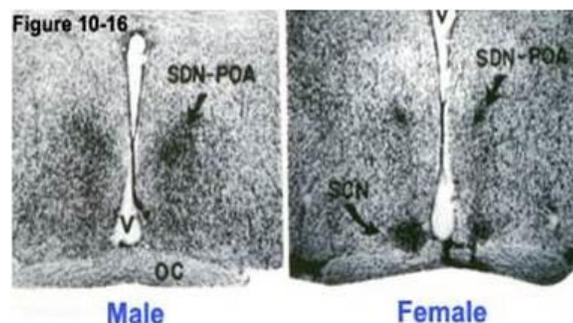


Fig. 10. Área preóptica en el macho y en la hembra. Núcleo sexualmente dimórfico-área preóptica (SDN-POA) <https://brainandgender.wordpress.com/neuroanatomy/>

El dimorfismo sexual en el núcleo ventromedial (NVM) se debe a la estructura neuronal. En los machos, la densidad sináptica en este núcleo es menor que en las hembras (Miller y Aokí, 1991) (Fig. 11).

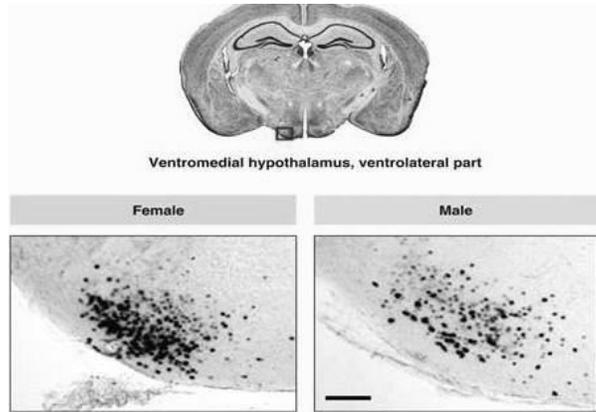


Fig. 11. Núcleo ventromedial en la rata. <http://www.cell.com/>

El área ventral periventricular (AVPV) es mayor en las hembras que en los machos (Fig. 12). Este núcleo se caracteriza por presentar una amplia distribución de las neuronas que liberan kisspetina. Interesantemente, se ha llegado a establecer que existen diferentes grupos neuronales kisspeptinérgicos que interaccionarían con los somas o terminales de las neuronas GnRH, demostrándose, que las neuronas originadas del AVPV realizan sinapsis con las neuronas GnRH ubicadas en la eminencia media (Gottsch et al., 2004; Clarkson y Herbison, 2006).

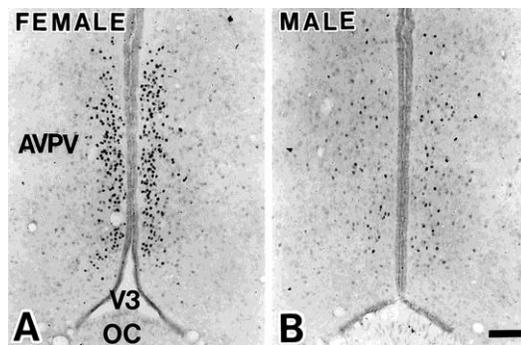


Fig. 12. Área ventral periventricular (AVPV) en la rata hembra y macho. (Tomado de Orikasa et al., 2001).

En el núcleo supraquiasmático (NSQ) el tamaño del núcleo de las neuronas, así como el volumen del área supraquiasmática, son aproximadamente dos veces más grandes en la hembra (Dörner y Staudt, 1968; Robinson et al., 1986) (Fig. 13). El NSQ regula los ritmos cíclicos o ritmos circadianos del organismo, por tal motivo, es de suma importancia en la fisiología reproductiva de la hembra. Este núcleo genera y coordina ritmos hormonales, fisiológicos y conductuales con una periodicidad que puede ser de horas hasta días o meses. Este núcleo está bajo el control de las hormonas sexuales (Sördersten et al., 1981)

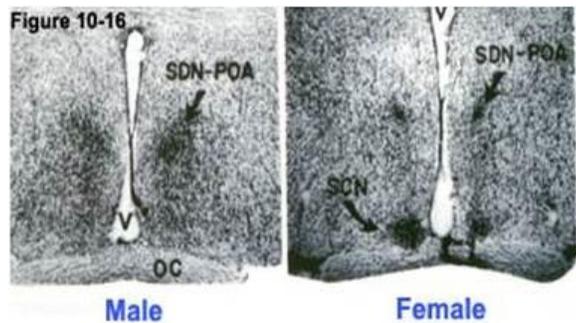


Fig.13. Núcleo supraquiasmático (SCN) en ratas hembras y machos. Se observa en posición superior al quiasma óptico (QC). <https://brainandgender.wordpress.com/neuroanatomy/>

La amígdala medial es 85% mayor en los machos que en las hembras (Hines et al., 1992) (Fig. 14). La amígdala es considerada como el centro de las emociones y regulador de las reacciones de agresividad, miedo y ansiedad. La amígdala está subdividida en varios núcleos, en donde la porción anterior aumenta la receptividad en las ratas hembras, mientras que la porción posterior del núcleo lateral reduce la receptividad. (Masco y Carrer, 1980).

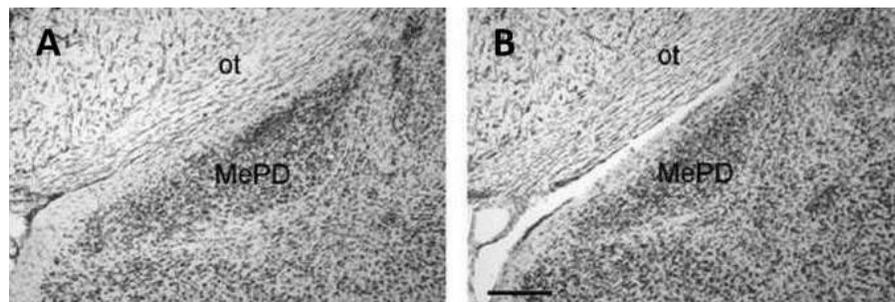


Fig. 14. Amígdala posterodorsal medial (MePD). Su volumen es 1.5 veces mayor en el macho (A) que en la hembra (B). Tomado de Morris et al., 2004

Se ha demostrado que la amígdala medial contribuye a la excitación sexual del macho por el incremento de erecciones espontaneas sin algún contacto sexual (Kondo et al., 1997).

La estría terminal (ST) es 97% más grande en volumen en el cerebro de los machos que en el de las hembras (Hines et al., 1992) (Fig. 15). La ST es la conexión eferente principal de la amígdala, se puede dividir en varias regiones: la porción basal de la ST, que incluye los núcleos de la cama de la estría terminal (BST). En las ratas, la lesión de BST altera la secuencia de copulación en machos, aumentando el número de intromisiones antes de la eyaculación e incluso los machos no eyaculan (Liu et al., 1997).

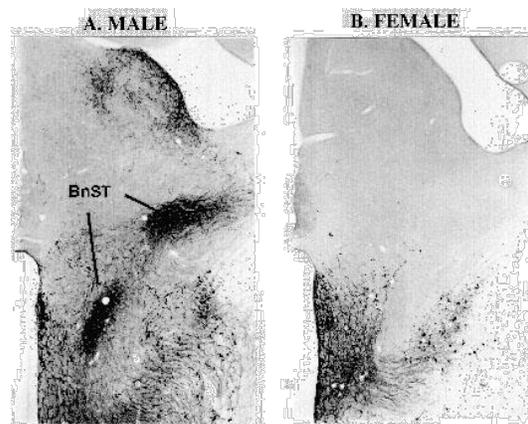


Figura 15. La estría terminal (ST) tiene un volumen mayor (97%) en el macho en comparación con las hembras.

<http://www.int-ornith-union.org/files/proceedings/durban/Symposium/S14/S14.2.htm>

Las estructuras mencionadas anteriormente están relacionadas principalmente con el control neuroendocrino de los ejes ovárico y testicular, así como con el control de la conducta sexual tanto femenina como masculina. Se ha establecido que la exposición a situaciones estresantes puede influir en la aparición y el desarrollo de diversas patologías, alterando aspectos psicológicos y fisiológicos como el crecimiento, el sistema inmunológico y la función reproductiva (Chrousos y Gold, 1992)

1.6 Concepto de estrés

El estrés (del inglés *stress*, ‘tensión’) es una reacción fisiológica del organismo en el que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante o de demanda incrementada, la cual se conoce como estresor (Valdés y Flores, 1990). En los vertebrados, una situación de estrés involucra inicialmente al hipotálamo, que integra la información procedente de las vías sensoriales y viscerales, este a su vez activa dos rutas paralelas: el eje Simpático-Adreno-Medular (SAM) y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) (Sirera et al., 2006).

1.7 Respuesta al estrés

Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)

El eje HHA está compuesto por el hipotálamo, que es una glándula situada en la base del cerebro por debajo del tálamo que actúa como enlace entre el sistema endocrino y el sistema nervioso autónomo, estimula la hipófisis por medio de la liberación de hormonas; la hipófisis es una glándula situada también en la base del cerebro, que actúa en respuesta al hipotálamo liberando hormonas que estimulan a distintos órganos blanco presentes en todo el cuerpo; y las glándulas suprarrenales, que se encuentran sobre el polo superior de cada uno de los riñones y que están compuestas por la corteza y la médula (Valdés y Flores, 1990). Para la activación del sistema HHA, los estímulos estresantes activan la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el hipotálamo, particularmente en el núcleo paraventricular (NPV). La CRH desencadena en el lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis) la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que, por vía sanguínea actúa sobre la corteza de las glándulas adrenales, lo que hace que éstas liberen las hormonas corticosteroideas específicamente los glucocorticoides (Rosenzweig y Leinman, 1992; De Kloet, 2000). Los glucocorticoides ejercen retroalimentación negativa

(Harbuz et al, 1999) a nivel de la hipófisis y del hipotálamo, de esta manera pueden ayudar a finalizar la respuesta al estímulo estresante y permitir la adaptación y la preparación del organismo para enfrentar futuras situaciones similares (De Kloet, 2000) (Fig. 16).

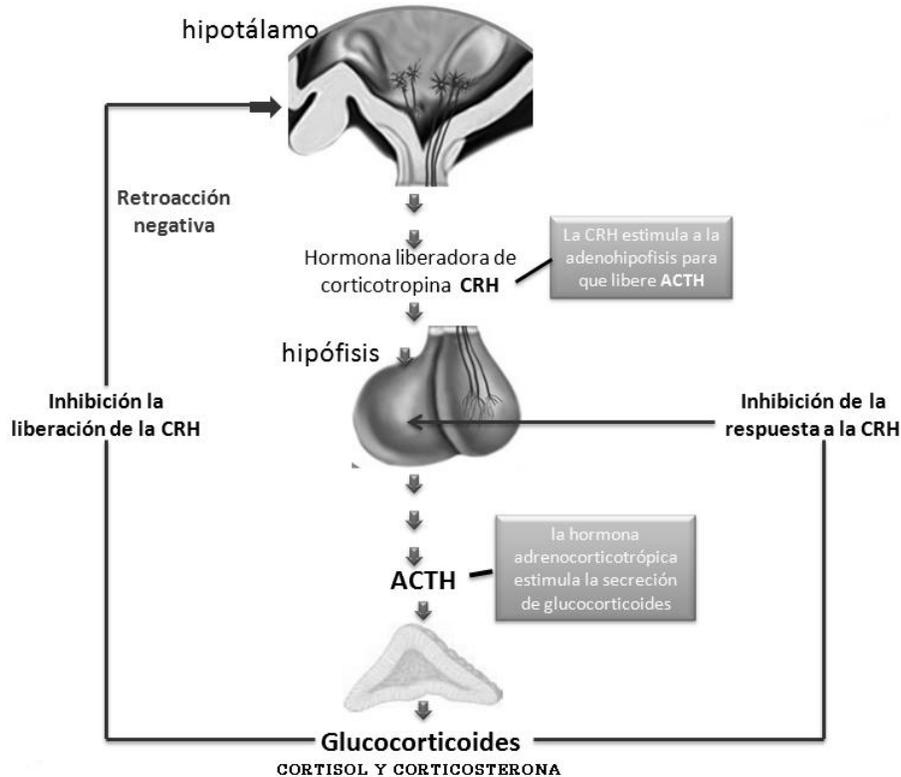


Fig. 16. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y su regulación por retroalimentación negativa. CRH-Hormona liberadora de corticotropina, ACTH-Hormona adrenocorticotrópica
<http://victorgrupo5.blogspot.mx/2014/03/eje-hipotalamo-hipofisis-suprarrenal.html>

La intensidad y duración del estresor son determinantes en la respuesta de un organismo, por lo que la exposición prolongada a un factor estresante puede traer como consecuencia una respuesta patológica (Angelucci, 2000). Por ejemplo, se ha reportado que la exposición crónica al estrés puede tener efectos negativos ocasionando supresión de la reproducción y del crecimiento, así como problemas en la función de la tiroides y del sistema inmune, lo cual puede aumentar la vulnerabilidad a enfermedades tales como la obesidad (síndrome metabólico X), el hipertiroidismo y la diabetes mellitus (Pasquali et al., 2006). Además, se ha relacionado la disfunción del eje HHA y la secreción elevada de

glucocorticoides, con el aumento en la susceptibilidad a los trastornos depresivos y de ansiedad (Holsboer, 2001).

1.8 Efectos fisiológicos de los glucocorticoides

Metabolismo proteico-glucídico. Los GC inhiben la utilización periférica de glucosa, estimulan la gluconeogénesis y activan el catabolismo proteico, principalmente en el músculo. El receptor tipo 2 o glucocorticoide (GR, por sus siglas en inglés) interviene en estas acciones. La unión de los glucocorticoides con su receptor (GR) estimula todas las fases del proceso: movilización de proteínas a partir del músculo, entrada de los aminoácidos liberados en la vía gluconeogénica hepática, conversión de piruvato en glucógeno y eliminación del amonio liberado por el metabolismo de los aminoácido precursores (Serra et al., 2012). La presencia de cortisol o corticosterona es indispensable para mantener los niveles plasmáticos de la glucosa y para la supervivencia durante el ayuno prolongado (Serra et al., 2012).

Metabolismo lipídico. Los GC facilitan el efecto lipolítico de las catecolaminas, con el consiguiente aumento de los ácidos grasos libres en plasma. El cortisol representa también un complejo papel en el metabolismo de las grasas. La presencia de cortisol permite la movilización máxima de las grasas por la hormona de crecimiento, la adrenalina y otros factores lipolíticos durante el ayuno (Serra et al., 2012).

Procesos inflamatorios. Los GC tienen influencia sobre el número de leucocitos circulantes y las células inmunes accesorias. Los GC suprimen la activación inmunológica de estas células, inhiben la producción de citoquinas y otros mediadores de la inflamación, y producen resistencia a las citoquinas. Los glucocorticoides disminuyen o previenen la respuesta de los tejidos a los procesos inflamatorios (Chrousos, 1995).

Efectos conductuales. Los GC generan diversas acciones indirectas sobre el sistema nervioso central (SNC) mediante la conservación de la presión arterial, de la concentración plasmáticas de glucosa y de electrolitos. El receptor tipo 1 para los glucocorticoides está presente en todo el encéfalo y en mayor concentración en el hipocampo, la sustancia reticular activadora y los núcleos autonómicos del tronco encefálico. El cortisol modula el funcionamiento perceptual y emocional. La deficiencia de cortisol acentúa la agudeza aditiva, olfatoria y gustativa; estas acciones sugieren que esta hormona puede tener normalmente un efecto amortiguante (Berne, 1998). Generalmente los glucocorticoides son estimulantes, provocando insomnio, excitación, euforia, y muy raramente confusión y alucinaciones (psicosis corticoides) (Serra et al., 2012).

Por otro lado, la secreción prolongada de GC puede desencadenar numerosos desórdenes (Charmandari et al., 2005). La función reproductiva es una de las más afectadas durante el estrés crónico disminuyendo la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Selye, 1946). En ratas macho sometidas a estrés crónico, disminuye la secreción de testosterona (T) afectando negativamente la motivación sexual y el patrón de ejecución de la conducta sexual (Retana-Márquez et al., 2003), la espermatogénesis (Almeida et al., 2000) y la fertilidad (Phillips et al., 1989). Asimismo, el estrés durante el periodo de gestación puede afectar los procesos de diferenciación sexual en el cerebro fetal, ocasionando alteraciones en la edad adulta de la descendencia tales como la feminización de la conducta sexual masculina (Clarke et al., 1994; Weinstock, 1997; Huizink, 2000).

El estrés se puede presentar en cualquier etapa de la vida, por ejemplo, durante la gestación. Diversos estudios han demostrado que situaciones estresantes durante el periodo de gestación, puede traer como consecuencia alteraciones metabólicas (Barker, 1998; Seckl, 1997), neuroquímicas, neuroendocrinas, de tipo conductual (Seckl, 2001) y sobre la función

reproductiva (Chen et al, 2013) de las crías en la edad adulta. Se ha propuesto que el mecanismo mediante el cual el estrés prenatal puede afectar el desarrollo del cerebro fetal y programarlo para desarrollar diversas patologías en la edad adulta (Barbazanges et al., 1996, Welberg y Seckl, 2001) es a través del acceso de corticosterona proveniente de la madre hacia el feto, el cual está regulado por la enzima 11- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (11 β -HSD) presente en la placenta, la cual inactiva rápidamente a la corticosterona (en ratas) y el cortisol (en seres humanos) convirtiéndola en sus metabolitos inactivos (11- dehidrocorticosterona y cortisona respectivamente) para brindar protección al feto (Seckl y Meaney, 2004). Sin embargo, en situaciones de estrés gestacional crónico, la actividad de la enzima 11 β -HSD disminuye (Welberg et al., 2005). En tal condición los glucocorticoides pueden atravesar la barrera placentaria y el feto queda expuesto a niveles excesivos de glucocorticoides maternos (Sampath-Kumar et al., 1998).

2. ANTECEDENTES

2.1 El estrés prenatal y la programación fetal.

De acuerdo a la teoría desarrollada David Barker, el concepto de “programación fetal” está vinculado con los acontecimientos que se producen durante la gestación y pueden afectar la salud del individuo a largo plazo, así como diferentes aspectos de su desarrollo (Barker y Osmond, 1986).

El estrés gestacional da lugar a una tasa de recambio celular más lenta, con una disminución de los procesos de muerte celular y de la proliferación en el eje hipocampo-hipotálamo-hipófisis, afectando así procesos de aprendizaje y memoria a corto plazo en la etapa adulta (Baquedano et al., 2011). Un evento fundamental en la respuesta de estrés es la alta secreción de corticosterona, este esteroide se ha convertido en un buen candidato para el papel de “factor de

programación" en el paradigma del estrés prenatal. Algunos estudios proponen que la exposición prenatal a las hormonas ACTH y corticosterona dan como resultado una programación anticipada en el cerebro fetal que conlleva a desarrollar enfermedades en la etapa adulta (Dupouy et al., 1980). Por ejemplo, en los seres humanos se ha estudiado la relación que hay entre el estrés materno y el déficit en el comportamiento de los niños (Weinstock, 2005; Austin et al., 2005; Van den Bergh et al., 2005). Muchos estudios demuestran que los hijos de madres que experimentaron algún tipo de estrés durante el embarazo, presentan un mayor riesgo de que sus hijos experimenten trastornos de ansiedad (O'Connor et al., 2003; Van Den Bergh y Marcoen, 2004), déficit de atención y trastornos de hiperactividad (TDAH) (O'Connor et al., 2003; Huizink et al., 2007).

Partiendo de la hipótesis de que un estresor intenso causa reducción en las hormonas que tienen efectos virilizantes, se realizó un estudio en hombres adultos para determinar si el estrés prenatal al que estuvieron expuestos tuvo repercusión en su preferencia sexual. Se hizo una comparación de los hijos de madres alemanas de la ciudad de Berlín que durante los años 1944 y 1945 estuvieron embarazadas y sufrieron los continuos bombardeos durante la segunda guerra mundial, y madres alemanas de otros lugares que no estuvieron expuestas a los bombardeos, pero que estuvieron embarazadas durante los mismos años. Los resultados mostraron que el número de hijos homosexuales de las madres que estuvieron sometidas a los bombardeos fue mucho mayor que el de los hijos de las madres que no estuvieron sometidas a ese estrés (Dörner, 1980). La diferenciación del cerebro depende de las hormonas sexuales así como de neurotransmisores. Si existen concentraciones anormales de alguno de ellos durante el periodo crítico del desarrollo cerebral, puede llevar a discapacidades del desarrollo permanentes en los procesos básicos de la vida (Dörner, 1981).

Considerando que no es posible desarrollar estudios aplicando algún tipo de estresor en mujeres gestantes, debido a cuestiones éticas y a las graves consecuencias sobre la salud que esto podría traer, se han desarrollado modelos animales, principalmente roedores, para estudiar los efectos de la exposición al estrés durante del desarrollo prenatal. Debido a que la mayoría de los estudios se han realizado en la descendencia masculina, esto ha representado una limitación, ya que las diferencias de sexo son muy importantes al evaluar las alteraciones endocrinas que genera el estrés prenatal y otras manipulaciones en el ambiente fetal.

2.2 Glucocorticoides en la etapa fetal

Los glucocorticoides pueden ocasionar alteraciones en el desarrollo del cerebro fetal que afectan la función reproductiva. Existe evidencia de que el estrés prenatal durante la última semana de gestación en las ratas ocasiona una disminución en el volumen del área preóptica media (núcleo sexualmente dimórfico) en la descendencia en la edad adulta. Asimismo, se han encontrado niveles reducidos de testosterona (T) en el plasma de los machos estresados prenatalmente (Chen et al., 2013). Estos hallazgos se han atribuido a la supresión del pico de T por efecto de los glucocorticoides durante el desarrollo prenatal, lo que conduce a una masculinización incompleta o incluso a la desmasculinización del área preóptica media en las ratas macho (Kerchner y Ward, 1992). En contraste, se ha reportado que el estrés prenatal no ocasiona alteraciones sobre el tamaño del área preóptica de la descendencia femenina en la edad adulta (Anderson et al., 1985).

La diferenciación sexual del cerebro depende de la presencia o ausencia de andrógenos durante las primeras etapas del desarrollo perinatal. En el ser humano, dichas etapas se manifiestan en el primero y segundo mes de gestación, en estos meses empieza a funcionar el sistema circulatorio,

formación de órganos sensoriales y canal medular de las vesículas cerebrales y óptica (Sadler, 2007). En la rata, el pico de testosterona en los días 18-19 de gestación es crítico para la diferenciación y el comportamiento sexual de los machos en la etapa adulta (Ward y Weisz, 1980). Se ha demostrado que la diferenciación sexual en el cerebro fetal está íntimamente relacionada con los niveles de estradiol derivados de la aromatización de la testosterona, siendo el estrógeno el principal responsable de dicha diferenciación (Chantal et al., 1996).

2.3 Efectos del estrés prenatal en las ratas macho.

Se han estudiado los efectos de diferentes métodos de estrés materno sobre el comportamiento sexual en la descendencia masculina. El método de estrés más comúnmente utilizado, es el de inmovilización combinada con una iluminación intensa (Dörner et al., 1983; Ward 1972; Dunlap et al., 1978); pero también hay informes sobre la eficacia de otros estresores como el frío (Dahlof et al., 1978), la malnutrición (Rhees et al., 1981), e incluso factores de estrés leves, tales como la manipulación (Peters, 1989). Se ha reportado que los animales estresados prenatalmente (monos y ratas) muestran retraso en el desarrollo motor en la edad adulta, exploración reducida, problemas conductuales adaptativos, reacciones de ansiedad en un ambiente desconocido, deterioro de las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria), así como alteraciones en el comportamiento social y sexual, como es la feminización de la conducta sexual masculina (Clarke et al, 1994; Weinstock, 1997; Huizink, 2000). Otros hallazgos han demostrado que las situaciones de estrés durante el último tercio de la gestación inducen cambios en el comportamiento sexual de la descendencia en la edad adulta de la rata. Estos cambios se caracterizan por la disminución del comportamiento sexual masculino (desmasculinización), así como facilitación del patrón de lordosis (feminización) (Ward, 1972). Asimismo, el estrés prenatal ocasionado por inmovilización combinada con luz intensa

causa reducción de la motivación sexual y la actividad copulatoria en la descendencia masculina adulta (Wang et al., 2006).

Por otro lado, se ha documentado que el estrés prenatal afecta la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) del feto, provocando así la reducción en el tamaño de las gónadas masculinas en la edad adulta (Rodríguez et al., 2007). En relación con lo anterior, se ha observado también que el estrés prenatal por inmovilización aumenta los niveles de corticosterona e inhibe al eje HHG, ya que se han reportado valores bajos de hormona luteinizante (LH) y de T en el plasma de los machos estresados prenatalmente (Chen et al., 2013). Además, se ha reportado aumento en la apoptosis de las células testiculares, lo cual podría causar disminución de la fertilidad en los machos adultos (Chen et al., 2013).

2.4 Efectos del estrés prenatal en las ratas hembras

Existen pocos estudios acerca de los efectos del estrés prenatal en las hembras. En los primeros reportes se menciona que el estrés prenatal por inmovilización no causa alteración en la progresión del ciclo estral de ratas hembras al compararlas con las control (Lars-Gösta et al, 1977). Sin embargo, Lorraine y col. encontraron que el estrés inducido durante la gestación genera aumento significativo en la duración del ciclo estral en las ratas hembras adultas, debido principalmente al alargamiento de las etapas estro y metaestro (Lorraine et al, 1978). En otros estudios se ha observado que la incidencia y la intensidad de la lordosis disminuye en las hembras estresadas prenatalmente (Frye y Orecki, 2002). Estos hallazgos indican que el estrés prenatal también puede alterar el entorno hormonal del feto femenino durante una etapa crítica de la diferenciación sexual del hipotálamo (Lorraine et al., 1978).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés prenatal es considerado hoy en día como un problema implicado en la programación fetal de trastornos relacionados con aspectos reproductivos en los mamíferos. La actividad reproductiva es esencial para la perpetuación de las especies, incluido el ser humano, Por lo tanto, los factores que impidan o perturben dicha actividad pueden repercutir en la fertilidad de hembras y machos, de ahí que los estudios en este tema sean importantes en la actualidad.

4. JUSTIFICACIÓN

Es importante investigar las consecuencias que genera el estrés materno en la descendencia, ya que los estudios en animales y en humanos muestran que el estrés prenatal puede inducir el desarrollo de alteraciones metabólicas, neuroquímicas y conductuales en la edad adulta. Asimismo, es probable que la exposición del feto a niveles excesivos de glucocorticoides maternos durante el estrés sean los responsables de las alteraciones sobre la reproducción tales como la infertilidad.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tiene el estrés prenatal sobre la actividad reproductiva y la fertilidad de ratas hembras y machos en la etapa adulta?

6. HIPÓTESIS

El estrés prenatal afecta la regulación endocrina de la función reproductiva en la descendencia, causando así alteraciones en distintos parámetros reproductivos, tales como la conducta sexual, el ciclo estral, la espermatogénesis, apoptosis en células testiculares y la concentración plasmática de hormonas sexuales, lo que repercute en una menor fertilidad de las hembras y los machos en la edad adulta.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el estrés prenatal causa alteraciones en los parámetros reproductivos de ratas macho y hembra.

8. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las alteraciones que el estrés prenatal ocasiona en la fisiología reproductiva de la rata hembra y sus consecuencias en la fertilidad.
- Determinar las alteraciones que el estrés prenatal ocasiona en la fisiología reproductiva de la rata macho y sus consecuencias en la fertilidad.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar con una edad de 3 meses y peso en hembras de 250 g y 300 g en los machos. Los animales fueron mantenidos en un cuarto con ciclo invertido de luz/oscuridad (la luz se apaga a la 09:00). El alimento y el agua estuvieron *ad libitum*. La temperatura del cuarto estuvo a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Los procedimientos utilizados en este trabajo se realizaron de acuerdo con la Guía para el estudio y uso de animales de laboratorio, de la Comisión de Ética de la DCBS de la UAM-Iztapalapa y con la Reglamentación Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

10. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las hembras (n=16) adultas copularon con machos sexualmente expertos, los cuales eyacularon en dos ocasiones para preñar a las hembras. Las hembras gestantes se alojaron en jaulas individuales. Se dividieron en dos grupos: control (CON, n=7) y estrés prenatal (EP, n=9). El día de la cópula se consideró el día 0 (EP 0) de la gestación, en el día 16 de gestación (EP 16) se inició la

exposición al evento estresante dos veces por día. Las exposiciones al estrés fueron desde el EP 16 hasta el EP 21 de gestación, debido a que a partir del día 16 al 21 de gestación se considera un periodo crítico para la diferenciación sexual por la secreción de testosterona en el testículo fetal. Las hembras gestantes del grupo control se mantuvieron en sus cajas, sin perturbación. Las crías se destetaron en el día 22 después del nacimiento y fueron separadas hembras y machos. Se obtuvo una n= 37 hembras CON y n=39 hembras EP; n=28 machos CON y n=36 machos EP. Una vez que nacieron las crías, las camadas se homogenizaron en número. A partir de los 3 meses de edad se inició la evaluación de parámetros reproductivos ya que es la edad en la que alcanzan completamente la madurez sexual (Hafez, 1970).

10.1 Método inductor de estrés prenatal

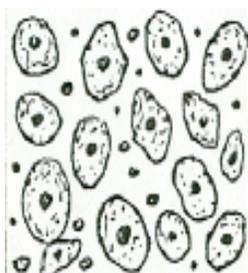
El método de estrés que se utilizó es el de inmersión en agua fría, el cual se ha utilizado en trabajos anteriores de nuestro laboratorio ya que se considera un estresor tanto físico como psicológico, y se ha demostrado que tiene efectos más nocivos sobre la conducta sexual de la rata macho (Retana-Márquez et al., 1996). La hembra gestante se colocó a en una caja de acrílico con agua a una temperatura de 15°C y con una altura de 15.5 cm. Inmediatamente después de introducir a la hembra en el agua, se cerró la caja con una reja de acero por un tiempo de 15 minutos. Después del tiempo transcurrido, las hembras se secaron con una franela y se dejaron en sus jaulas habituales. La exposición al estrés realizó 2 veces por día (a las 09:00 y a las 15:00 de la etapa de oscuridad del cuarto de alojamiento)

10.2 Evaluación de parámetros reproductivos en las hembras

10.2.1 Ciclo estral.

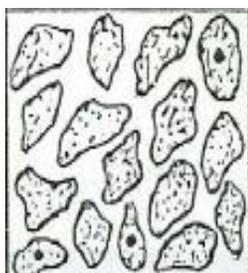
Se tomaron frotis vaginales diariamente por 3 semanas y se realizó una tinción con hematoxilina-eosina para identificar los tipos de células observadas al

microscopio. Procedimiento: se esterilizó un asa bacteriana, se enjuagó con agua destilada y se tomó solución salina. Inmediatamente se tomó el frotis vaginal y se colocó en un portaobjetos. Las preparaciones se tiñeron con hematoxilina por 15 minutos, se enjuagó con agua, se tiñeron con eosina por 5 minutos y se lavaron nuevamente con agua. Finalmente, se lavaron con alcohol absoluto por 5 minutos y se dejaron secar. Los frotis se observaron en un microscopio óptico (OLYMPUS modelo CX41), a un aumento de 400X y se determinó la etapa del ciclo estral en base al tipo y porcentaje de células observadas:



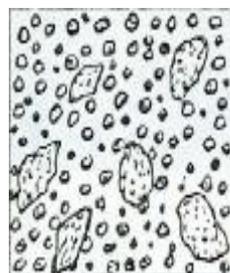
Proestro
80-100%

Células epiteliales nucleadas



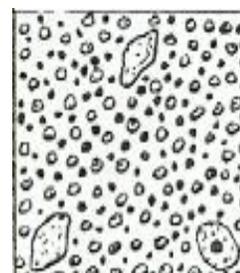
Estro
80-100%

células epiteliales queratinizadas



Metaestro

50% Leucocitos
50% células epiteliales queratinizadas



Diestro

80-100%
Leucocitos

10.2.2 Conducta sexual femenina

Para las evaluaciones conductuales, se utilizaron hembras que estuvieron en Proestro natural. Las hembras se pusieron en contacto con machos sexualmente expertos, a los cuales se les permitió montar en 10 ocasiones a las hembras. Se cuantificó el número de veces que la hembra realizó lordosis y se obtuvo el cociente lordótico (LQ), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$LQ = (\text{número de lordosis} / \text{número de montas}) \times 100$. Asimismo, se evaluó la intensidad de la lordosis (de acuerdo al grado de dorsiflexión) de acuerdo con la escala propuesta por Erskine et al., 2004. La evaluación de la intensidad de lordosis se estableció de acuerdo con el grado de flexión del dorso y del grado con el que la cabeza coincide con el plano vertical. La clasificación se basa en

una escala de: no dorsoflexión (0); ligera dorsoflexión acoplada con un ligero movimiento de la cabeza hacia el plano vertical (1); dorsoflexión moderada, acoplada con el movimiento vertical de la cabeza (2); dorsoflexión extrema acoplada con el movimiento vertical de la cabeza (3).

10.2.3 Órganos reproductores de las hembras

Se determinó el peso corporal de cada uno de los animales. Posteriormente las hembras fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 60mg/kg de peso. Una vez anestesiadas se realizó una incisión en la línea media del abdomen inferior y se identificó el aparato reproductor de la hembra. Los ovarios y los cuernos uterinos fueron extraídos de la cavidad. Los órganos fueron pesados y se realizó el conteo de folículos maduros en los ovarios. Simultáneamente se realizó un corte en la cavidad torácica para sacrificar al animal y realizar la extracción de sangre directamente del corazón para la evaluación de hormonas.

10.2.4 Concentración sérica de corticosterona, estradiol y progesterona.

Se cuantificó la concentración de corticosterona en el plasma de las hembras que estuvieran en las etapas del ciclo estral: proestro, estro, metaestro y diestro. La concentración de estradiol se cuantificó en las fases de proestro y estro ya que son las fases en las que se encuentran los mayores niveles de estradiol. La progesterona se cuantificó en el plasma de las hembras que estaban en metaestro y diestro debido a que en estas fases, los niveles de progesterona se encuentran en su máxima concentración. Para las tres hormonas se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Procedimiento cromatográfico.

A 1ml de plasma se le agregan 100 µl de 19-Nortestosterona como estándar interno. Los esteroides se extrajeron con 5 ml de éter dietílico-diclorometano (60:40, v/v) y se agitaron en vórtex. Se centrifugaron a 1000 g durante 5 min. Se obtuvo la fase orgánica y se mezcló con 1 ml de agua HPLC. Después de agitarla mezcla, se centrifugó a 1000 g durante 5 min y se extrajo nuevamente la fase orgánica. Ésta se evaporó con nitrógeno a temperatura ambiente. El residuo se redisolvió en 100 µl de agua-metanol (60:40 v/v). Para la evaluación de los esteroides, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución, utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua (65:35 v/v) con un flujo de 0.4 ml/min. Las separaciones se realizaron a temperatura de 40°C, en una columna Symmetry C18 fase reversa (2.0 x 150 mm, Waters Co., USA). Para bombear la fase móvil se utilizó un sistema controlador marca Waters 600-MS

Los esteroides se evaluaron con un detector de absorbancia UV visible marca Waters. La detección de progesterona y corticosterona se utilizó una λ de 245 nm; para estradiol la λ fue de 210 nm. Los resultados se analizaron con una estación de trabajo Milenium 32 marca Waters.

10.3 Evaluación de parámetros reproductivos en los machos

10.3.1 Conducta sexual masculina.

Para la evaluación conductual, los machos se colocaron con hembras receptoras, previamente ovariectomizadas y tratadas con estradiol (10 µg) y progesterona (2 mg, 4 horas antes de la prueba de conducta). Los machos se colocaron en redondeles de acrílico transparente de 3mm de espesor, se dejaron durante 5 minutos para permitir que el animal se habituara al lugar. Se registró la latencia de monta (tiempo que el macho tarda en realizar la primera monta), latencia de intromisión (tiempo que el macho tarda en realizar la primera intromisión), latencia de eyacuación (tiempo transcurrido desde la primera

intromisión hasta la eyaculación), número de montas (número de montas antes de cada eyaculación), número de intromisiones (número de intromisiones antes de cada eyaculación), número de eyaculaciones que los machos presentaron durante el tiempo de prueba. Se obtuvo el porcentaje de animales que copularon y el porcentaje de animales que eyacularon. Se realizaron 4 sesiones de conducta sexual una vez por semana, con duración de 30 minutos cada una. .

10.3.2 Evaluación de órganos reproductores en los machos

Se obtuvo el peso de cada uno de los animales. Posteriormente los machos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 60mg/kg de peso. Después de que la anestesia tuvo efecto se realizó una incisión en la línea media del abdomen inferior, inmediatamente ambos testículos, las glándulas seminales y la próstata fueron disectados cuidadosamente y pesados de inmediato. Inmediatamente se realizó un corte en la cavidad torácica para sacrificar al animal y realizar la extracción de sangre directamente del corazón para la evaluación de hormonas

10.3.3 Análisis Espermático

Obtención de espermatozoides

Inmediatamente después de extraer los órganos reproductores, se obtuvo la cauda del epidídimo, se le realizaron dos cortes para obtener los espermatozoides en 1 ml de solución salina, atemperada a 37°C. Se realizó el análisis espermático analizando los siguientes parámetros..

Movilidad. Se tomaron 10 µl de la suspensión de espermatozoides y se colocaron en un portaobjetos atemperado a 37°C, se colocó un cubreobjetos y se observaron con un microscopio de campo claro, a un aumento de 400X. Se contaron los espermatozoides móviles (con movilidad progresiva) e inmóviles. La movilidad se expresó en porcentaje de espermatozoides móviles del total de espermatozoides contados (200 por preparación).

Viabilidad. La viabilidad espermática se determinó por el método aprobado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). Se tomaron 10 μ l de la suspensión de espermatozoides, se colocaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con 10 μ l de una solución de eosina-nigrosina, se colocó un cubreobjetos y se observaron con un microscopio de campo claro a un aumento de 400X. Los espermatozoides no teñidos se consideraron vivos y los teñidos en rojo se consideraron muertos. La viabilidad se expresó como el porcentaje de espermatozoides no teñidos del total de espermatozoides contados (200 por preparación).

Cuenta espermática. Para realizar la cuenta espermática, se tomaron 25 μ l de la suspensión de espermatozoides y se mezclaron con 500 μ l de agua destilada. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se colocaron 10 μ l en una cámara de Neubauer. Se contabilizaron los espermatozoides presentes en 8 cuadrados externos de cada una de las dos cuadrículas de la cámara. La concentración espermática se calculó multiplicando el número de espermatozoides contados $\times 21 \times 8 \times 10^4 \div 2$. La cuenta espermática se expresó en espermatozoides $\times 10^6$ /ml.

Morfología espermática. Se tomaron 10 μ l de la suspensión de espermatozoides, se colocaron sobre un portaobjetos, se cubrieron con un portaobjetos y se observaron con un microscopio de campo claro a un aumento de 400X. Se observaron 200 espermatozoides por preparación contando aquellos espermatozoides que presentaron algún defecto en su estructura que fuese distinta a la estructura típica (cabeza en forma de hoz unido a un flagelo largo que termina en punta), tales como el desprendimiento de la cabeza o el doblamiento de la cabeza.

10.3.4 Evaluación de apoptosis en células testiculares por TUNEL.

Fijación del tejido. Se disectó uno de los dos testículos de cada rata y se perfundió con 1mL de PBS a través de la arteria testicular. Inmediatamente se inyectó 1mL de para formaldehído al 4% y se dejó reposar el testículo por 24hrs en un vial con para formaldehído al 4%. Posteriormente se realizó un corte longitudinal en el testículo y enjuago con PBS y alcohol al 70% dejando reposar por 24hrs.

Deshidratación. Para la deshidratación del tejido se utilizó un histoquinet en donde el tejido fue sumergido en alcoholes y xilenos en el siguiente orden: Alcohol 80% 1.5hrs, Alcohol 96% 1.5hrs, Alcohol 96% 1.5hrs, Alcohol 96% 1.5hrs, Alcohol absoluto 1hr, Alcohol absoluto 1hr, Alcohol absoluto 1hr, Alcohol absoluto-xilol (1:1) 1hr, Xileno 1, Xileno 2, Parafina 1 y Parafina 2.

Inclusión en parafina. Los tejidos se incluyeron en parafina para formar bloques. Posteriormente se realizaron cortes del tejido en un micrótopo con un grosor de 5 μ y se colocaron en un portaobjetos (laminillas) previamente tratado con poli-L-lisina.

Técnica de TUNEL. Se utilizó el kit In Situ Cell Death Detection Kit(Vial 1,2 y 3), POD, ROCHE. Para la desparafinación de las laminillas, se colocaron en una estufa a 60°C durante 1hr. Posteriormente fueron sumergidos en las siguientes soluciones en el orden correspondiente: Xilol I 5min., Xilol II 5min. y OH-Xilol 5min. En la hidratación de los tejidos, los portaobjetos se sometieron en baños de etanol en el siguiente orden: Etanol 100% 3min., Etanol 100% 3min, Alcohol 96% 3min., Alcohol 80% 3min. y Alcohol 70% 3min. Al terminar las laminillas fueron lavadas con PBS y se dejaron reposar en la misma solución por 24hrs. Se delimitó el área del tejido en el portaobjetos con un lápiz punta diamante y se añadió 50 μ l de proteinasa K a una concentración de 20 μ g/ml disuelto en Tris-HCl 10 mM / EDTA 0.1 mM con pH 8.0. Inmediatamente se cubrió el tejido con un pequeño cuadro de parafilm y se

incubo en una cámara húmeda en oscuridad a 37°C por 30min. Se retiró el parafilm y las laminillas fueron lavadas 2 veces con PBS por 5min/lavado. Las laminillas se colocaron en un gel refrigerante congelado y se añadió 100µl de la solución de permeabilización (Triton X-100 al 0.1%/Citrato de Sodio al 0.1%). Se añadió 25µl de la mezcla de reacción de TUNEL (17.5µl del Vial 1 y 157.5µl del vial 2), se cubrió con parafilm y se incubó en una cámara húmeda en oscuridad a 37°C por 1hr. Las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS. Se añadió 25µl de PBS sobre el tejido y se colocó un cubreobjetos para observar al microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 450-500nm (luz verde). Se contaron las células apoptóticas (color verde fluorescente) de 100 túbulos seminíferos.

Para la observación de las células apoptóticas en campo claro, se añadió 50µl de converted-POD (vial 3) directamente en el tejido. Se cubrió inmediatamente con parafilm y se incubó en una cámara húmeda oscura a 37°C por 30min. Las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS y se añadieron de 50 a 100µl de DAB (diaminobencidina) manteniéndolo por 5min. Se lavó inmediatamente con PBS. Posteriormente se realizó una tinción con hematoxilina por 8min; se lavó con agua de la llave, con agua destilada, con alcohol 96%, alcohol 100%, OH-Xilol y Xileno. Se añadió una gota de glicerina y se colocó un cubreobjetos para observar en un microscopio de campo claro a 400X. Las células apoptóticas se identificaron mediante una coloración café.

10.3.5 Cuantificación de testosterona y corticosterona.

Para la cuantificación de testosterona y corticosterona se utilizó el mismo procedimiento por HPLC descrito en la cuantificación de hormonas femeninas. Los esteroides se evaluaron con un detector de absorbancia UV visible marca Waters. Para la detección de Testosterona y corticosterona se utilizó una λ de 245 nm. Los resultados se analizaron con una estación de trabajo Milenium 32 marca Waters.

10.4 Prueba de fertilidad en machos y hembras

Esta prueba se realizó en hembras y machos

Se pusieron a copular los siguientes grupos:

Hembras Control – Machos Control

Hembras Control – Machos Estresados

Hembras Estresadas – Machos Control

Hembras Estresadas – Machos Estresados

En condiciones normales, con dos eyaculaciones se asegura la preñez de una hembra. Se permitió que los machos eyacularan dos veces sin ningún límite de tiempo. Se evaluó el tiempo de gestación y el número de crías por camada entre los grupos.

11 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los niveles de corticosterona en las hembras gestantes se analizaron ANOVA de una vía. Los parámetros de conducta sexual femenina, las concentraciones hormonales y el análisis espermático se analizaron con una prueba t- student. Los parámetros de conducta sexual masculina se analizaron con ANOVA de medidas repetidas, de dos vías, seguida de la prueba de Newman-Keuls. Los porcentajes con Chi-cuadrada. El número de crías se analizó con ANOVA seguida de la prueba de Kruskal-wallis seguida de Dunn y el nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$

12 RESULTADOS

12.1 Corticosterona en hembras gestantes

Las hembras gestantes del grupo control presentaron concentraciones séricas de corticosterona menores, con valores de 250 ng/ml en comparación con las hembras gestantes que fueron sometidas a estrés por inmersión en agua fría, las cuales presentaron mayores concentraciones séricas de corticosterona en los días 18 y 19 de gestación con valores de hasta 550ng/ml (Fig.17).

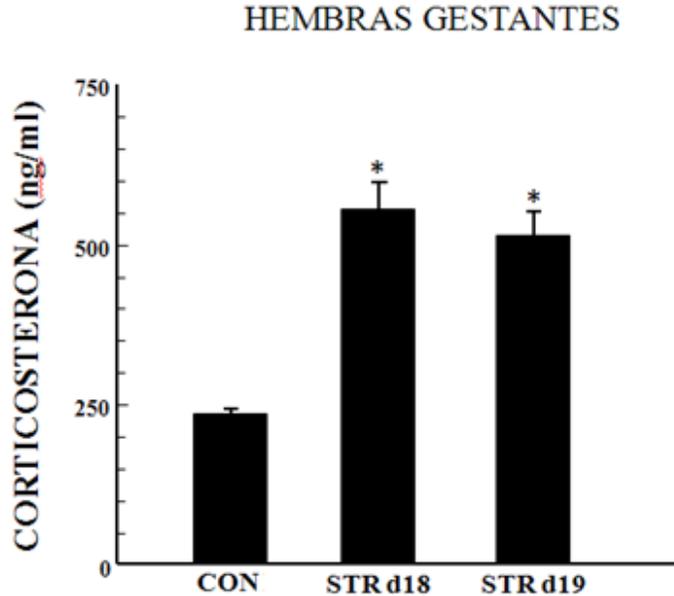


Fig. 17. Efecto del estrés por inmersión en la concentración sérica de corticosterona en hembras gestantes. Se observa mayor concentración sérica de corticosterona en las hembras STR en los días 18 y 19 de gestación en comparación con el grupo control. CON grupo control, STRd18- grupo de estrés al día 18 de gestación y STRd19- grupo de estrés al día 19 de gestación con una n=5 para cada grupo. Los datos se muestran como Media \pm E.E.M. y se analizaron con ANOVA de 1 vía. *p<0.01 comparado con el control.

12.2 Descendencia femenina y masculina.

Para el grupo control se obtuvo un total de 65 crías, de las cuales, 37 fueron hembras y 28 machos. Para el grupo de estrés prenatal se obtuvo un total de 75 crías, de las cuales 39 fueron hembras y 36 machos.

12.3 Hembras

12.3.1 Ciclo estral (n=37 control, n=39 estrés prenatal)

Las hembras del grupo control mostraron una correcta progresión del ciclo estral, presentando un bajo porcentaje (20%) de alteraciones (TABLA 1). La ciclicidad a lo largo de las 3 semanas en que fueron tomados los frotis vaginales fue adecuada y se observó el cambio de una etapa a otra, es decir, de metaestro a diestro, de diestro a proestro, de proestro a estro y de estro a metaestro, esto, para el grupo control (Fig. 18). Las ratas que fueron estresadas prenatalmente

mostraron un mayor porcentaje (80%) de alteraciones en las etapas del ciclo estral, ya que los tiempos de duración para cada etapa fueron se extendieron por 2 y 3 días, observándose principalmente un alargamiento en las etapas de estro y proestro en comparación con las del grupo control (TABLA 2). Por lo que debido a estos alargamientos se observaron alteraciones en el patrón cíclico de las distintas etapas a lo largo de las 3 semanas. (Fig. 19).

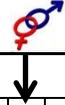
TABLA 1.
Duración de las etapas del ciclo estral tomadas mediante frotis vaginales por tres semanas para el grupo control.



CONTROL																								
	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M
1	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	
2	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	
3	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	E	M	D	P	E	M	D	P	E	D	D
4	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	E	E	E	D	P	P	
5	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	P	D	E	P	E	D	M	E	P	E	D	D	E
6	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	E	D	D	P	
7	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P
8	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	E	D	D
9	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	
10	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D
11	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D
12	D	D	P	E	M	D	P	P	E	D	D	P	P	E	M	P	E	M	D	P	E	D	D	P
13	D	P	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	
14	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	
15	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	
16	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	M	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E
17	M	D	P	E	M	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	

TABLA 2.

Duración de las etapas del ciclo estral tomadas mediante frotis vaginales por tres semanas para el grupo estrés prenatal.



ESTRÉS PRENATAL																									
	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J
1	E	M	D	D	E	D	D	P	E	D	E	P	P	P	D	P	E	M	D	P	E	D	D	P	E
2	P	E	D	P	E	E	D	P	E	E	D	D	P	P	D	D	E	E	D	P	D	P	P		
3	E	E	D	P	E	E	D	P	E	D	D	P	P	D	D	E	E	M	D	P	E	D	D	P	E
4	P	D	D	E	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E
5	E	D	M	P	E	D	D	E	E	D	M	P	P	D	D	P	E	M	D	P	E	D	D	E	D
6	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	P	P	D	E	E	E	D	D	P	D	P		
7	E	D	D	P	D	E	D	P	E	D	D	P	E	D	D	E	E	D	D	P	E	D	D	P	E
8	M	E	E	D	E	P	P	D	E	P	P	D	P	P	P	M	D	P	E	D	D	P	P		
9	E	M	P	P	D	D	D	P	D	D	D	P	D	D	D	E	D	D	D	P	E	D	D	P	
10	E	E	E	E	P	D	P	E	D	D	P	E	D	E	P	E	D	P	E	E	D	P	P	P	P
11	E	E	D	D	D	E	P	D	D	P	E	D	P	P	P	D	D	P	P	D	D	P	P		
12	E	E	E	P	E	E	E	D	D	P	E	P	P	P	E	D	D	P	D	D	P	P	P		
13	P	E	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	D	D	D	E	E	M	D	P	E	M	D	D	D
14	P	E	E	E	E	D	P	E	M	D	P	E	P	D	P	E	E	D	E	E	D	D	P		
15	P	E	D	E	E	E	D	D	E	E	D	D	P	P	D	M	M	E	D	D	P	E	E		
16	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	P	D	P	P	D	M	E	E	D	D	P	E	D	D	P
17	E	D	M	D	E	M	D	P	P	M	P	D	D	P	E	M	P	D	D	D	D	P	D	D	D
18	E	E	D	D	P	E	D	P	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E		
19	D	E	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	E	D	D	P	P	E	D	D	P	
20	E	E	P	D	D	P	D	P	P	D	P	D	E	D	P	P	D	M	P	M	D	D	D	P	E

E:Estro, P: Proestro, M:Metaestro y D: Diestro. Las letras marcadas en rojo representan las alteraciones del ciclo. La flecha indica el día en que tuvieron contacto sexual por primera vez con el macho. Las letras marcadas en azul representan el día en que las hembras quedaron preñadas.

Hembras control

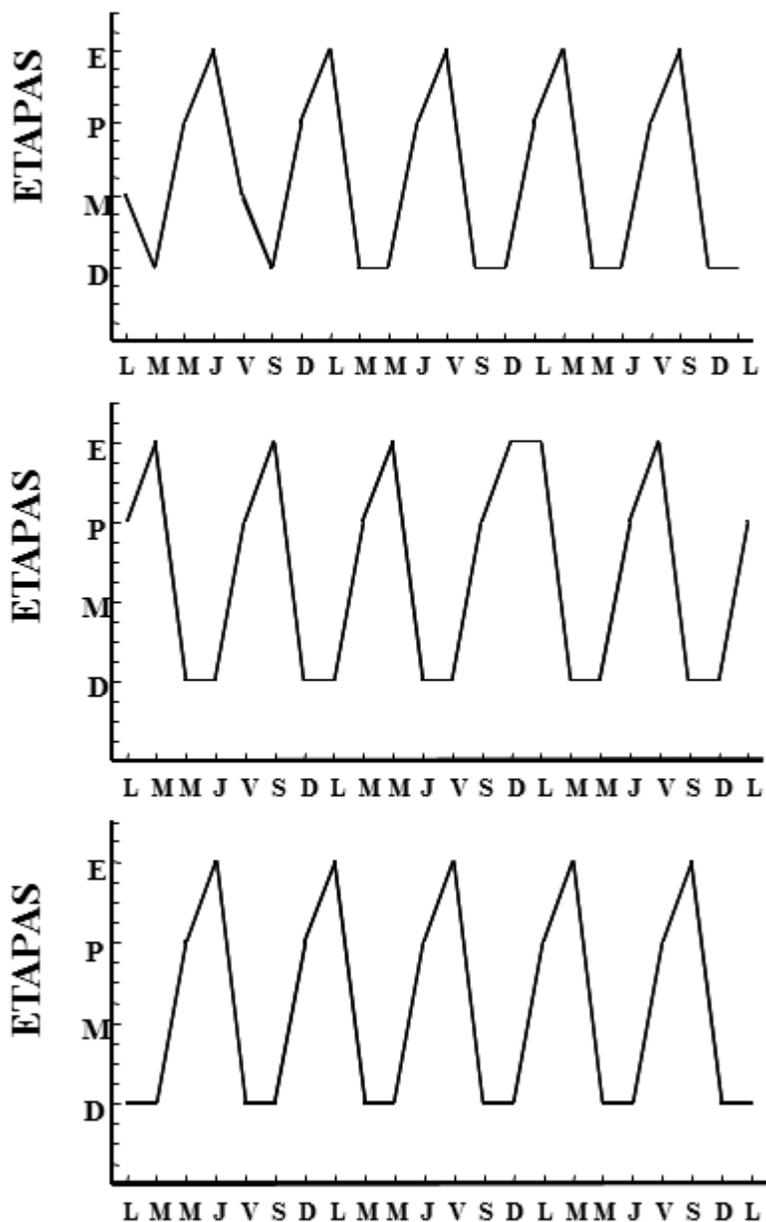


Fig. 18. Las gráficas representan la ciclicidad a lo largo de las distintas etapas del ciclo estral a lo largo de 3 semanas, esto, para el grupo control (cada una de las gráficas muestra el ciclo estral de una rata). E. Estro, P. Proestro, M. Metaestro y D. Diestro. Se observa ciclicidad en las etapas del ciclo estral en cada una de las gráficas.

En el grupo de EP, como ya se menciona, se observó un 80% de alteraciones en el ciclo estral en comparación con las hembras control que mostraron un 20% (Fig. 20).

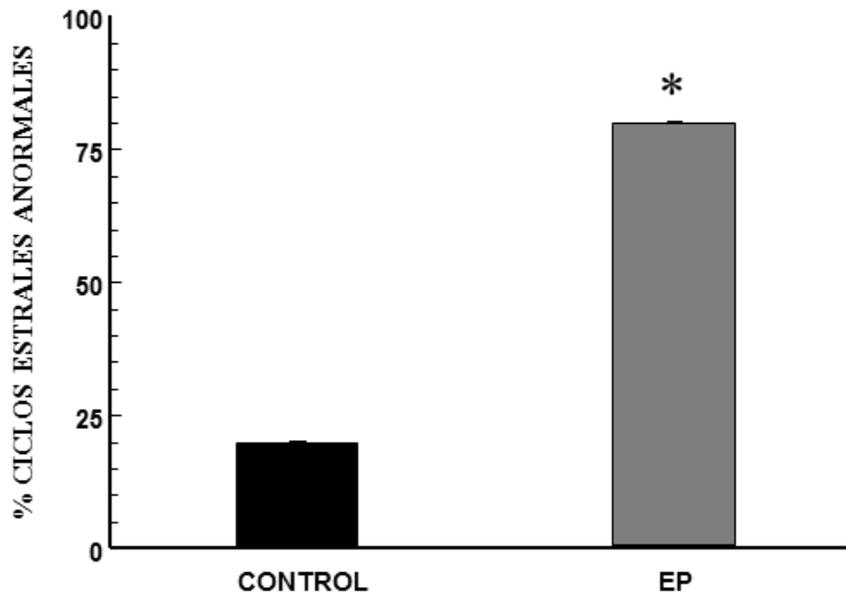


Fig.20. Efecto del estrés prenatal (EP) sobre el porcentaje de ciclos estrales anormales. Se observa un mayor porcentaje de ciclos estrales anormales para el grupo EP en comparación con el control. Los datos fueron analizados con una prueba de chi-cuadrada * $p < 0.05$ comparado con el grupo control.

12.3.2 Conducta sexual femenina (n=37 control, n=39 estrés prenatal)

En las pruebas de conducta sexual femenina, se observó que las hembras control y estresadas prenatalmente presentaron conducta proceptiva (hopping y darting), así como receptiva (lordosis) las hembras del grupo control tuvieron un cociente lordótico del 100% en la etapa en que se encontraban receptivas (Proestro). De igual forma, las hembras estresadas prenatalmente tuvieron un cociente lordótico de 95% que fue similar al de las hembras control. Estas hembras también presentaron receptividad en la etapa de proestro, a excepción de dos hembras que, a pesar de estar en la etapa de proestro por varios días, en ninguno de ellos mostraron lordosis (Fig. 21).

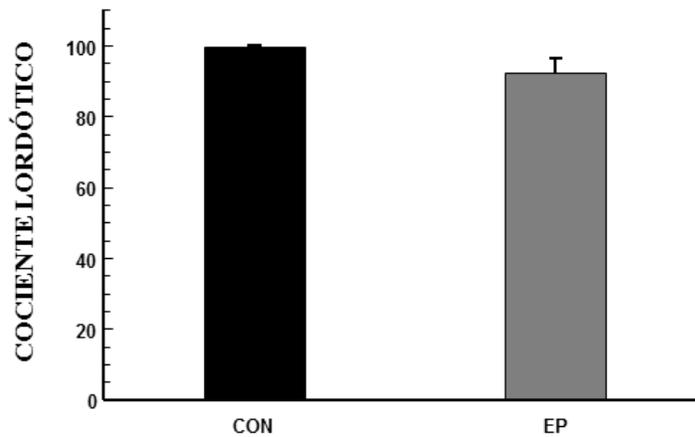


Fig.21. Efecto del estrés prenatal sobre el cociente lordótico de ratas hembras adultas. EP grupo de estrés prenatal, CON grupo control. Se observa que no hay diferencias significativas en el cociente lordotico entre el grupo CON y EP. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ y fueron analizados con una prueba t- student $*p<0.05$ comparado con el grupo control.

La intensidad de la lordosis en un 90% de las hembras control fue de nivel 3. Sin embargo en las hembras sometidas a estrés prenatal, la intensidad de la lordosis fue menor ya que un 70% presento intensidad de lordosis de 3, y un 30% de las hembras mostraron intensidades de 1 y 2 en comparación con el grupo control. (Fig. 22).

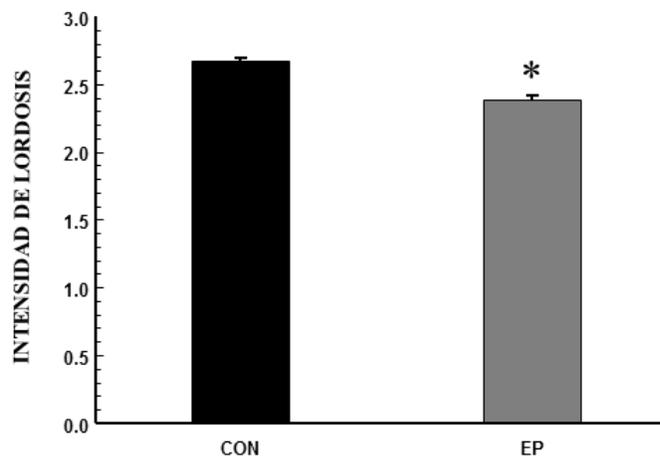


Fig. 22. Efecto del estrés prenatal sobre la intensidad de lordosis en ratas hembras adultas. EP grupo estrés prenatal y CON grupo control. Se observa una disminución en la intensidad de lordosis para el grupo EP en comparación con el grupo CON. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ y fueron analizados con una prueba t- student $*p<0.05$ comparado con el grupo control.

12.3.3 Peso corporal (n=21 Control, n= 24 estrés prenatal)

El peso corporal de las hembras control en la edad adulta fue mayor, con un peso en promedio de 249.78g en comparación con las hembras estresadas prenatalmente que mostraron una disminución significativa en el peso corporal con un peso en promedio de 217.95g (TABLA 3).

12.3.4 Órganos reproductores de las hembras

Las hembras del grupo control tuvieron un mayor peso ovárico en la etapa de proestro (n=24), que fue en promedio de 75.76mg en comparación con el grupo estresado prenatalmente (n= 24) que mostró un menor peso con un promedio de 64.58mg, habiendo diferencias significativas entre ambos grupos. Los valores del peso ovárico en las etapas de diestro para el grupo de estrés prenatal (n=24) no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (n=18). El peso de úteros en etapas de proestro (n= 12) y diestro (n=9 control y n=2 EP) no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el de estrés prenatal. Así mismo, el número de folículos en las etapas de proestro (n=24 control y n=24 EP) y diestro (n=18 control y n=24 EP) no fue diferente entre los grupos mencionados (TABLA 3).

**TABLA 3.
PESO CORPORAL, PESO DE OVARIOS, PESO DE ÚTEROS Y NÚMERO DE FOLÍCULOS**

Peso Corporal (g)		Peso Ovarios (mg)		Peso Útero (mg)		Número de Folículos	
		Proestro	Diestro	Proestro	Diestro	Proestro	Diestro
Control	249.78 ± 7.70	75.76 ± 3.85	60.00 ± 3.29	562.30 ± 39.27	467.50 ± 45.93	18.75 ± 1.09	19.50 ± 0.50
EP	217.95 ± 5.85*	64.58 ± 2.40 *	62.08 ± 1.80	481.75 ± 55.91	457.50 ± 25.10	19.21 ± 1.26	16.33 ± 2.13

X ± E.E. *p<0.05 comparado con el grupo control.

12.3.5 Estradiol y progesterona

Las concentraciones séricas de estradiol en las etapas de estro y proestro para las hembras del grupo control presentaron valores normales de entre 60 y 90 pg/ml, sin embargo, las hembras sometidas a estrés prenatal mostraron mayores niveles séricos de estradiol, con valores de entre 180 y 210 pg/ml, esto, en comparación con el grupo control (Fig. 23).

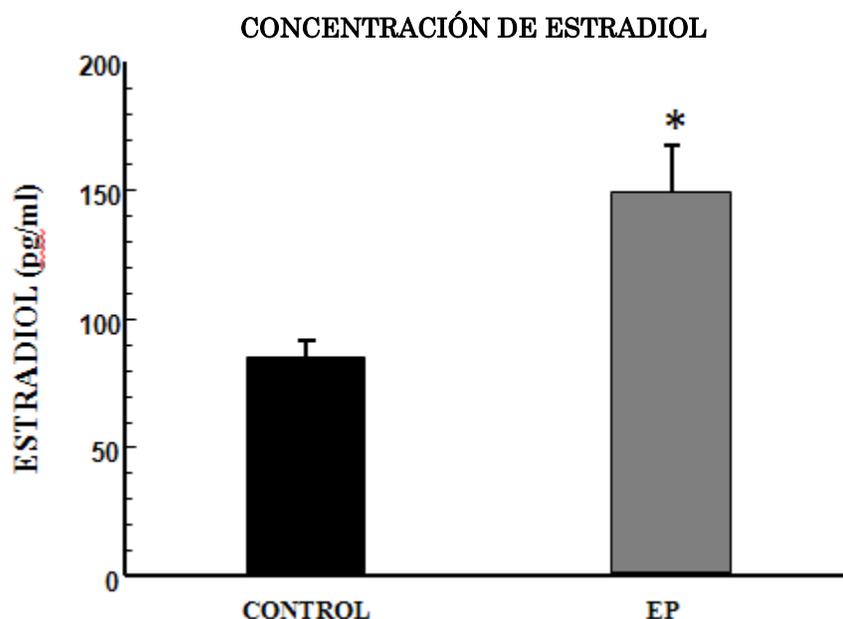


Fig. 23. Efecto del estrés prenatal sobre la concentración sérica de estradiol en ratas hembras adultas en etapas de estro y proestro. EP grupo de estrés prenatal. Se observa una mayor concentración sérica de estradiol en el grupo EP en comparación con el control (n=12 control y n= 12 EP). Los datos se muestran como $\bar{X} \pm E.E.M.$ y fueron analizados con una prueba t-student. * $p < 0.05$ comparado con el control.

Por otra parte, no hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas de progesterona para las hembras control en etapa de diestro en comparación con el grupo de estrés prenatal, obteniendo valores similares de entre 27 y 37 ng/ml para ambos grupos (Fig. 24).

CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA

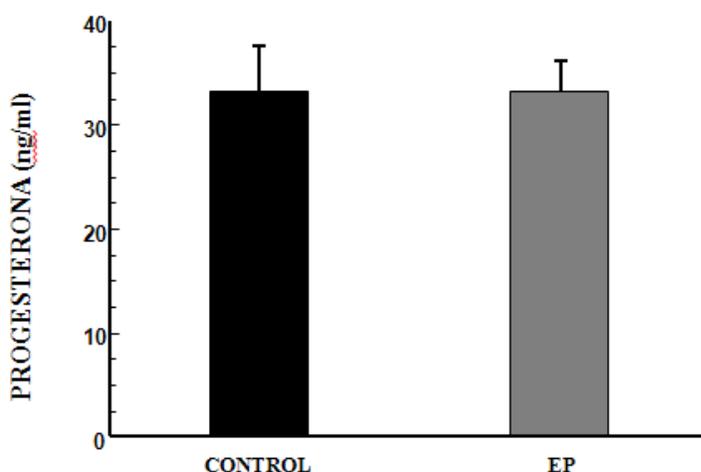


Fig. 24. Efecto del estrés prenatal sobre la concentración de progesterona en plasma de ratas hembras adultas en etapa de diestro. EP grupo de estrés prenatal. Se observa que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de progesterona para los grupos EP y control (n=9 control y n=12 EP). Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ y fueron analizados con una prueba t- student. *p<0.05 comparado con el control.

12.3.6 Corticosterona

Las hembras del grupo control mostraron menores niveles de corticosterona en suero con valores de 170ng/ml en comparación con el grupo estrés prenatal que mostrará un aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona mostrando valores de hasta 425ng/ml. (Fig.25).

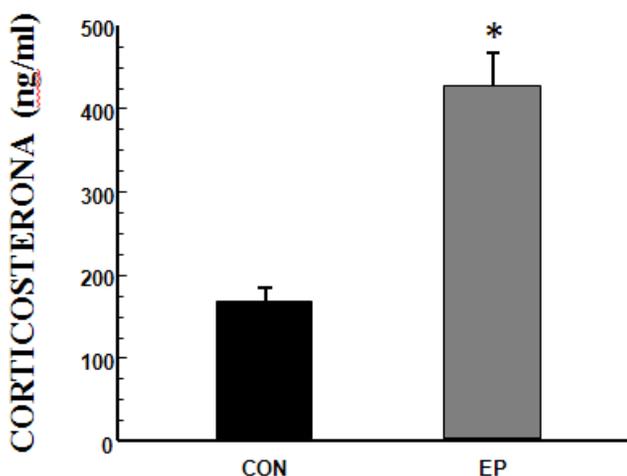


Fig.25. Efecto del estrés prenatal en los niveles de corticosterona en suero de ratas hembras. Se observa un aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona del grupo estrés prenatal (EP) en comparación con el grupo control (CON) (n=21 control y n=24 EP). Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ y fueron analizados con una prueba t-student. *p<0.05 comparado con el control.

12.3.7 Fertilidad

En las pruebas de fertilidad, el grupo formado por hembras control y machos control (HC/MC), presentó una tasa de fertilidad exitosa, al quedar gestantes el 100% de las hembras pertenecientes a este grupo. El grupo conformado por hembras estresadas prenatalmente y machos estresados prenatalmente (HEP/MEP), mostró una baja tasa de fertilidad comparado con el grupo control, ya que sólo el 70% de las hembras lograron quedar preñadas. El grupo conformado por hembras estresadas prenatalmente y machos control (HEP/MC) se comportó de manera similar al grupo HEP/MEP, obteniendo una baja tasa de fertilidad en comparación con el control. Finalmente para el grupo de hembras control y machos estresados prenatalmente (HC/MEP), también se obtuvo una baja tasa de fertilidad, con diferencias significativa respecto al grupo control, ya que sólo el 50% de las hembras quedaron gestantes (Fig. 26).

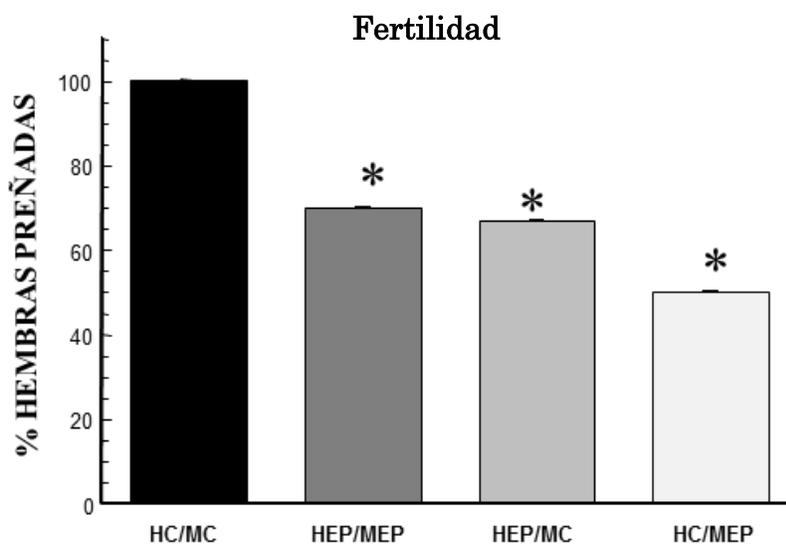


Fig.26. Efecto del estrés prenatal sobre la fertilidad en ratas hembras y machos adultos. En el grupo control HC/MC el 100% de las hembras quedaron gestantes. Las hembras y los machos EP tuvieron menores porcentajes de hembras gestantes, ya sea que copularan con animales control o EP ($n=7$ para cada grupo). Los datos se muestran como porcentajes $*p<0.05$ comparados con el grupo EC/MC. HC: Hembras Control, MC: Machos Control, HEP: Hembras estresadas prenatalmente, MEP: Machos estresados prenatalmente.

El grupo control HC/MC tuvo entre 9 y 13 crías por camada. Los grupos HEP/MEP y HEP/MC tuvieron menor número de crías en comparación con el grupo control, con camadas de 5 a 8 crías. El grupo de HC/MEP presentó el menor número de crías en comparación con el grupo control, el bajo porcentaje de hembras que estaban gestantes obtuvieron de 2 a 4 crías por camada (Fig. 27).

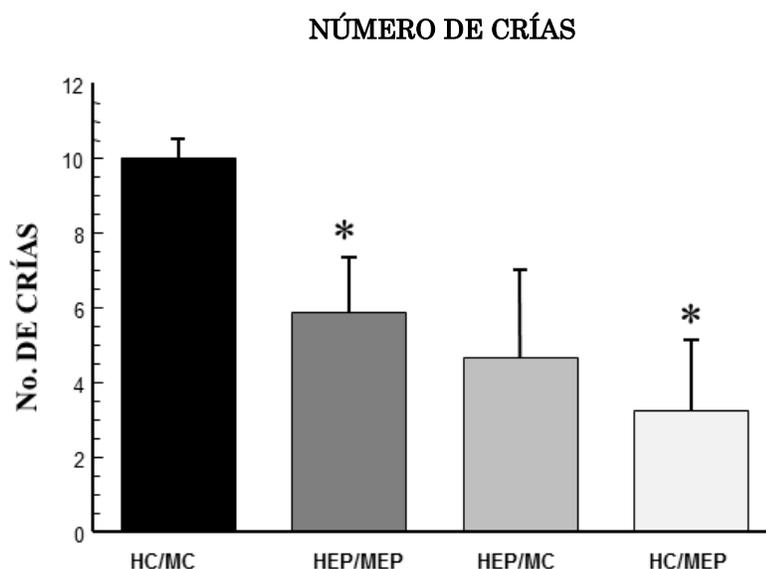


Fig. 27. Efecto del estrés prenatal sobre el número de crías en ratas hembras adultas. El estrés prenatal provoca una disminución en el número de crías en hembras que pertenecen a los grupos HEP/MEP, HEP/MC y HC/MEP en comparación con el grupo control HC/MC. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, seguida de Kruskal-wallis y Dunn. $P < 0.05$. HC. Hembras Control, MC. Machos Control, HEP. Hembras estresadas prenatalmente, MEP. Machos estresados prenatalmente. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparado con el control.

12.4 Machos

12.4.1 Conducta Sexual Masculina (n=28 control y n=36 estrés prenatal)

El porcentaje de machos estresados prenatalmente que copularon fue similar al del grupo control (80%). Tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de machos que eyacularon entre los dos grupos (Fig. 28).

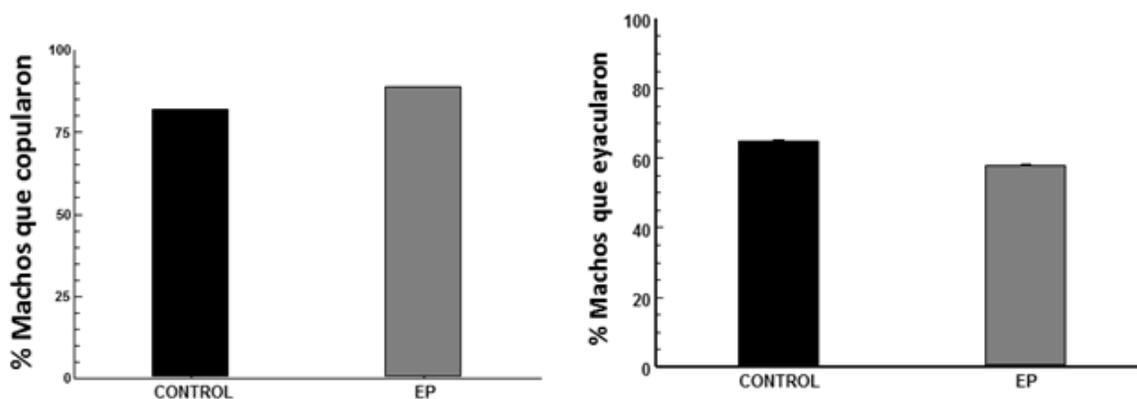


Fig. 28. Efecto del estrés prenatal sobre el porcentaje de machos que copularon y machos que eyacularon. Se observa que el grupo de estrés prenatal (EP) se comporta de manera similar al control. Los datos fueron analizados con una prueba de chi-cuadrada. * $p < 0.05$ comparados con el control.

Con respecto a los parámetros de la conducta sexual, los machos del grupo control presentaron una disminución progresiva en las latencias de monta, intromisión y eyaculación a lo largo de las 4 pruebas. En contraste, los machos del grupo de estrés prenatal mostraron latencias de montas e intromisiones más grandes en comparación con el grupo control en las pruebas 2, 3 y 4. Las latencias de eyaculación tanto para el grupo control como para el grupo de estrés prenatal no fueron diferentes entre sí, y para ambos grupos se observó una disminución progresiva (Fig. 29).

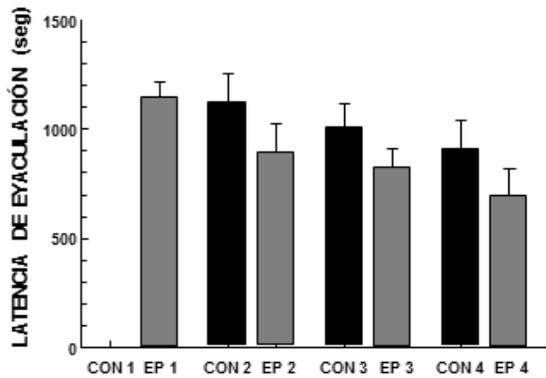
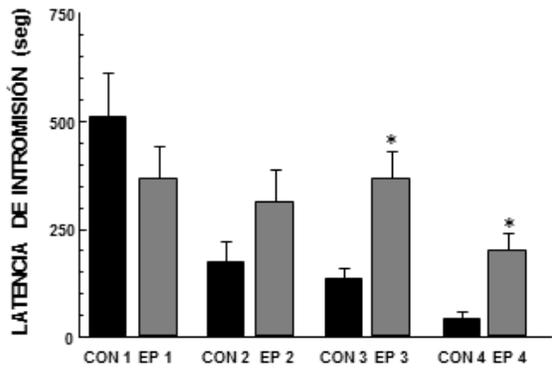
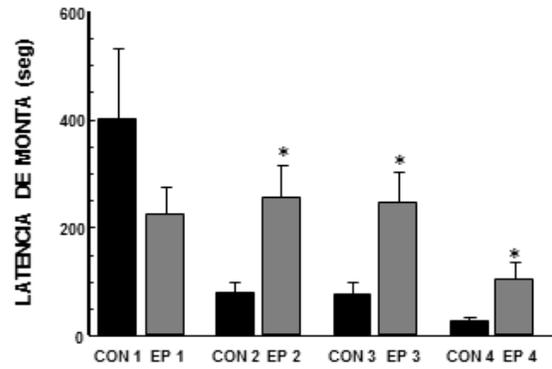


Fig.29. Efecto del estrés prenatal sobre latencias de montas, intromisiones y eyacuaciones evaluadas a lo largo de 4 pruebas realizadas 1 vez por semana. EP grupo de estrés prenatal y CON grupo control. Los datos fueron analizados con un ANOVA medidas repetidas de dos vías, seguida de una prueba de Newman-Keuls. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparado con el control.

Los resultados en el número de intromisiones y eyacuaciones totales, mostraron un aumento progresivo a lo largo de las 4 pruebas tanto para el grupo control, así como para el grupo de estrés prenatal. Se observaron algunas variaciones en el número de montas a lo largo de las 4 pruebas, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de estrés prenatal (Fig. 30).

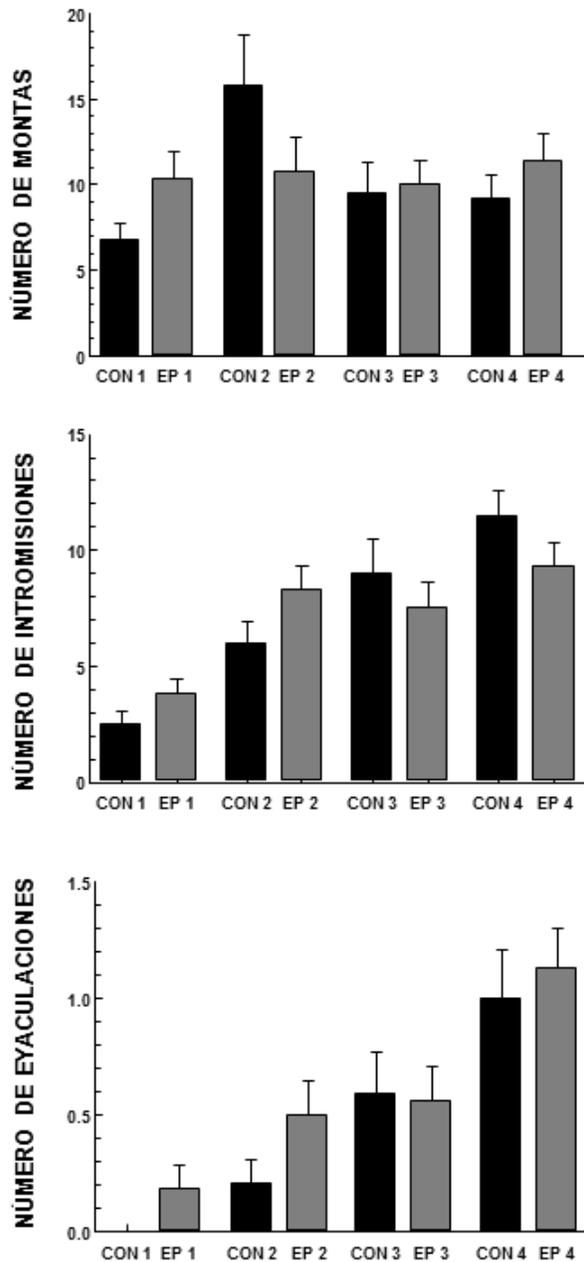


Fig.30. Efecto del estrés prenatal sobre el número de montas, intromisiones y eyaculaciones evaluadas a lo largo de 4 pruebas realizadas 1 vez por semana. EP grupo de estrés prenatal y CON grupo control. Los datos fueron analizados con un ANOVA medidas repetidas de dos vías, seguida de una prueba de Newman-Keuls. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$

12.4.2 Peso corporal (n=28 control y n=36 estrés prenatal)

El peso corporal de los machos control en la edad adulta fue mayor con un peso promedio de 369.47g en comparación con el grupo estresado prenatalmente que prsento un menor peso corporal con un promedio de 341.90g (TABLA 4).

12.4.3 Órganos reproductores masculinos

Los machos estresados prenatalmente tuvieron pesos testiculares significativamente menores a los de los machos control (n=56 control y n=72). Los pesos de las glándulas seminales y de las próstatas (n=28 control y n=36 estrés prenatal) presentaron valores similares, tanto para los machos control como para los machos de estrés prenatal (TABLA 4).

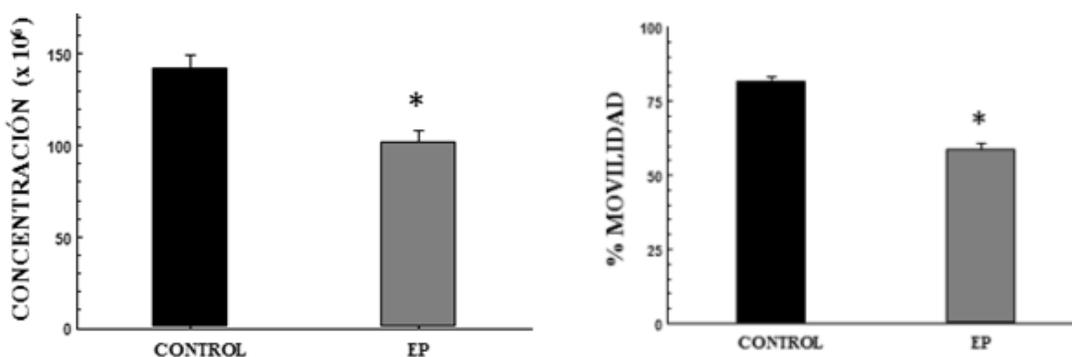
TABLA 4.
PESO CORPORAL Y PESO DE TESTÍCULOS, GLÁNDULAS SEMINALES Y PRÓSTATA.

	Peso Corporal (g)	Peso Testículos (g)	Peso Glándulas Seminales (g)	Peso de Próstata (g)
Control	369.47 ± 11.67	1.74 ± 0.02	1.56 ± 0.04	0.67 ± 0.02
EP	341.90 ± 6.24*	1.51 ± 0.04 *	1.62 ± 0.04	0.65 ± 0.02

*p<0.05 en comparación con el grupo control.

12.4.5 Parámetros espermáticos

Los datos obtenidos en los parámetros espermáticos para los machos del grupo control reflejan un mayor porcentaje de movilidad (82%) y viabilidad (85%) al igual que una mayor concentración espermática de 140×10^6 espermatozoides en comparación con los machos del grupo de estrés prenatal que presentaron una concentración de 100×10^6 espermatozoides, 60% de movilidad y 62% de viabilidad. (Fig. 31).



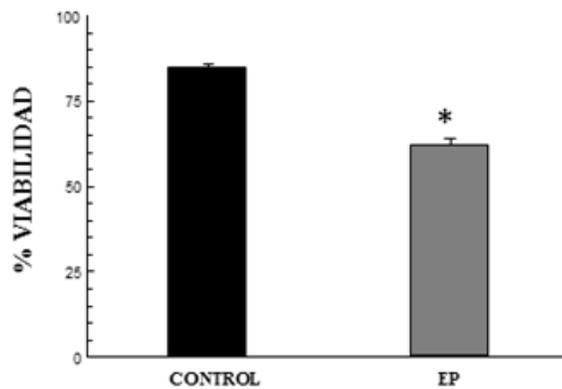


Fig.31. Efecto del estrés prenatal sobre parámetros espermáticos (concentración, movilidad y viabilidad) de la rata macho adulta. Para el grupo estrés prenatal (EP) se observa una disminución en el porcentaje de movilidad y viabilidad, así como disminución en la concentración espermática en comparación con el grupo control (n=28 control y n=36 estrés prenatal). Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ La concentración espermática fue analizada con una prueba t- student y los porcentajes con una prueba de chi-cuadrada. * $p < 0.05$ en comparación con el control.

12.4.6 Morfología espermática

Los espermatozoides presentes en el epidídimo de los machos control mostraron una morfología típica (cabeza en forma de hoz y flagelo largo que termina en punta). Los espermatozoides de ratas que fueron sometidas a estrés prenatal presentaron un mayor porcentaje de alteraciones morfológicas (15%) en comparación con el grupo control (2%)(Fig. 32). Principalmente se observó la presencia de cabezas sin cola, colas sueltas, y cabezas dobladas (Fig.33).

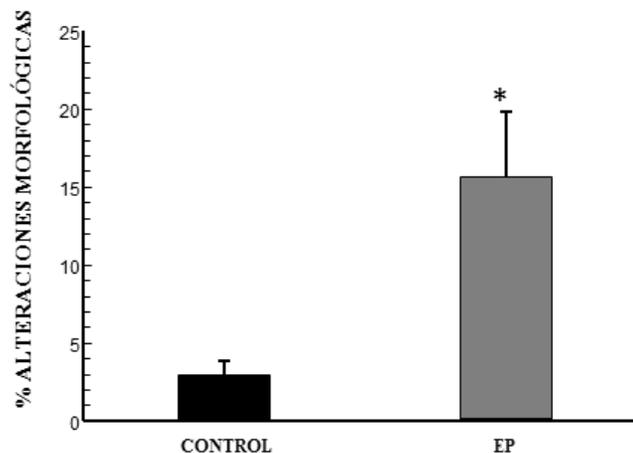


Fig.32. Efecto del estrés prenatal sobre el porcentaje de alteraciones morfológicas presentes en los espermatozoides de rata macho adulta. EP grupo de estrés prenatal. Se observa un aumento

en el porcentaje de alteraciones morfológicas de los espermatozoides para el grupo EP en comparación con el grupo control (n=28 control y n=36 estrés prenatal). Los datos fueron analizados por una prueba de chi-cuadrada. *p<0.05 en comparación con el control.

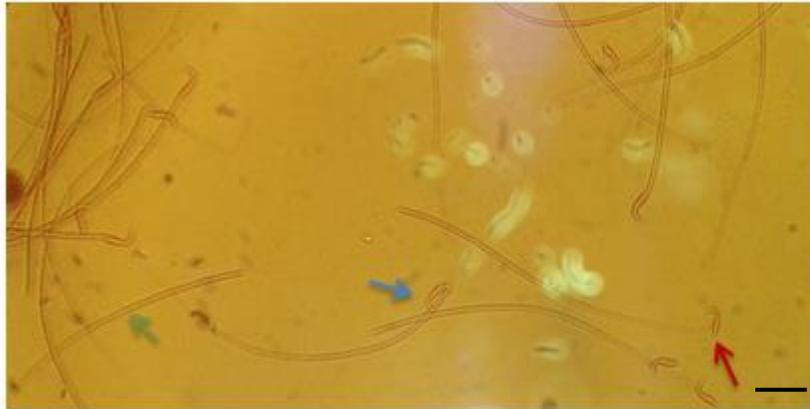


Fig. 33. Alteraciones morfológicas en espermatozoides de ratas macho adultas, ocasionadas por estrés prenatal, se observa la presencia de cabezas sin cola (flecha roja), colas sueltas (flecha verde) y cabezas totalmente dobladas (flecha azul). 400x. Barra de medición: 10 μ m

12.4.7 Apoptosis en células testiculares

En el grupo control se observó un 20% de túbulos con células apoptóticas. En comparación, las ratas macho que fueron sometidas a estrés prenatal mostraron un mayor porcentaje (45%) de túbulos seminíferos con células apoptóticas (Fig. 34).

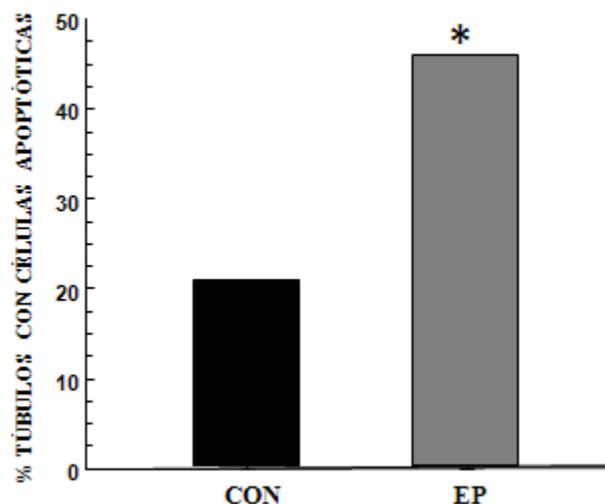


Fig. 34. Efecto del estrés prenatal sobre el porcentaje de túbulos seminíferos con células apoptóticas. Se observa un aumento significativo en el porcentaje de túbulos con células apoptóticas para el grupo de estrés prenatal (EP) en comparación con el grupo control. Los datos se muestran como $\bar{X} \pm$ E.E.M. *p<0.001 comparado con el control.

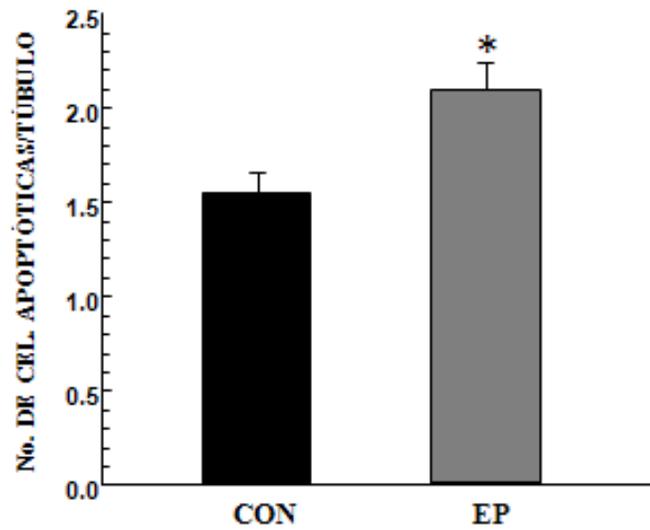


Fig. 35. Efecto del estrés prenatal sobre el número de células apoptóticas por tubulo seminífero. Se observa un aumento significativo en el número de células apoptóticas presentes en los túbulos seminíferos para el grupo estresado prenatalmente (EP) en comparación con el grupo control (CON) (100 túbulos por grupo) Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparado con el control.

Además, los túbulos seminíferos de los testículos de los machos estresados prenatalmente presentaron un mayor número de células apoptóticas por túbulo (Fig. 35 y 37), así como mayor número de células de Leydig en apoptosis (Fig. 36).

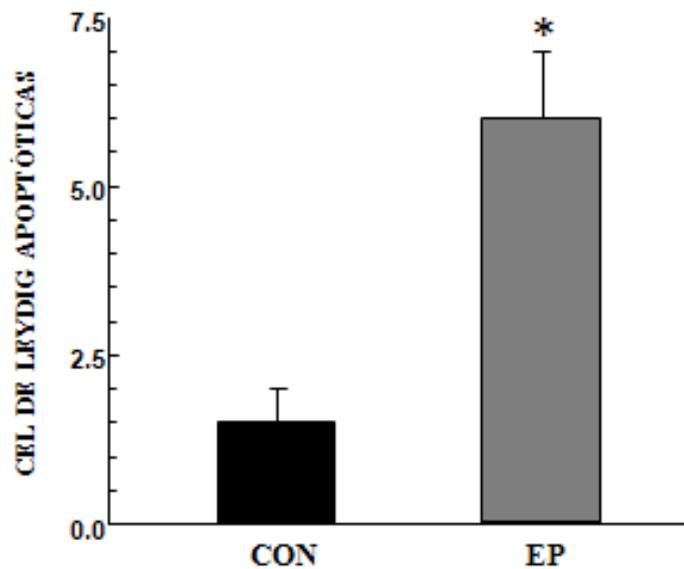


Fig. 36. Efecto del estrés prenatal sobre el número de células de Leydig apoptóticas. Se observa un mayor número de células de Leydig apoptóticas para el grupo estresado prenatalmente (EP) en comparación con el grupo control (CON). Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparado con el control.

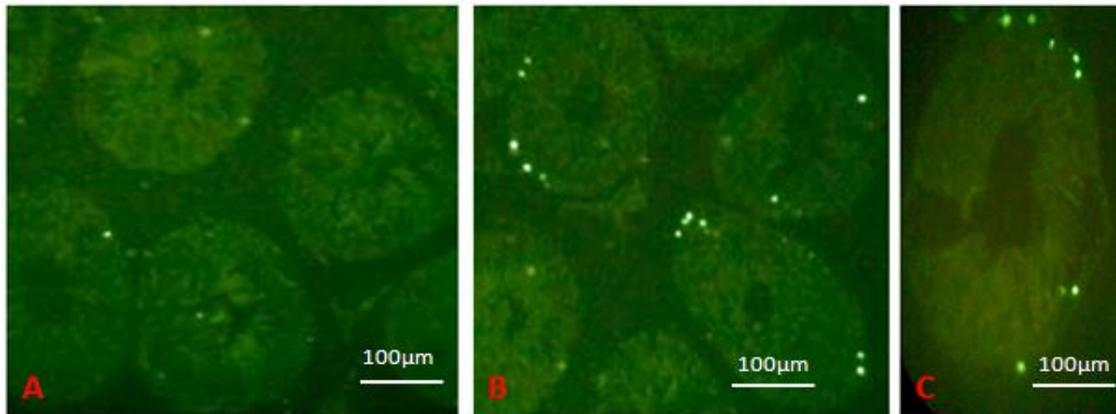


Fig. 37. Fotografías de cortes testiculares en la rata por microscopio de fluorescencia (450-500nm) donde se observa la presencia de células apoptóticas por la técnica de TUNEL. A. Grupo control. B. Grupo de estrés prenatal. C. Túbulo seminífero de rata estresada prenatalmente. Las células apoptóticas representan los puntos fluorescentes. Aumento 200x.

El tipo de células que se observaron en apoptosis fueron principalmente espermatocitos primarios en las etapas VII y VIII (Fig. 38)

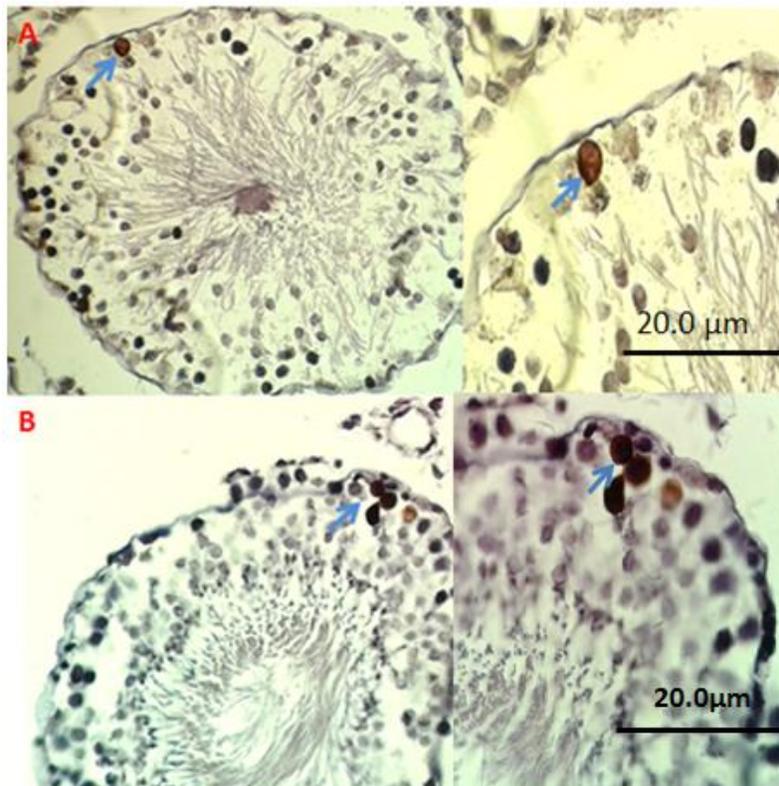


Fig. 38. A. Fotografía de un túbulo seminífero de rata control en donde se observa la presencia de una espermatogonia en apoptosis (flechas) detectada por la técnica de TUNEL. B. Fotografía de un túbulo seminífero de rata estresada prenatalmente en donde se observa la presencia de espermatocitos (paquiteno) en apoptosis (flechas) detectadas en la etapa VII por la técnica de TUNEL (400X y 1000X).

12.4.8 Testosterona

Los machos estresados prenatalmente tuvieron concentraciones séricas de testosterona significativamente menores que las de los machos control (Fig. 39).

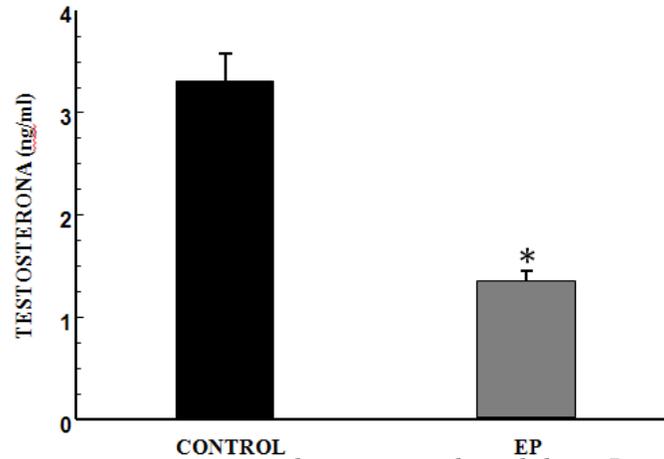


Fig. 39. Niveles de testosterona en suero de ratas macho adultas. Los machos del grupo de estrés prenatal (EP) tuvieron concentraciones séricas de testosterona significativamente menores a las observadas en los machos del grupo control ((n=28 control y n=36 estrés prenatal). Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparado con el control.

12.4.9 Corticosterona

Los machos del grupo control presentaron una menor concentración de corticosterona en suero en comparación con el grupo EP. Los machos que pertenecían al grupo EP presentaron un aumento significativo en la concentración sérica de corticosterona en comparación con el grupo control (Fig. 40).

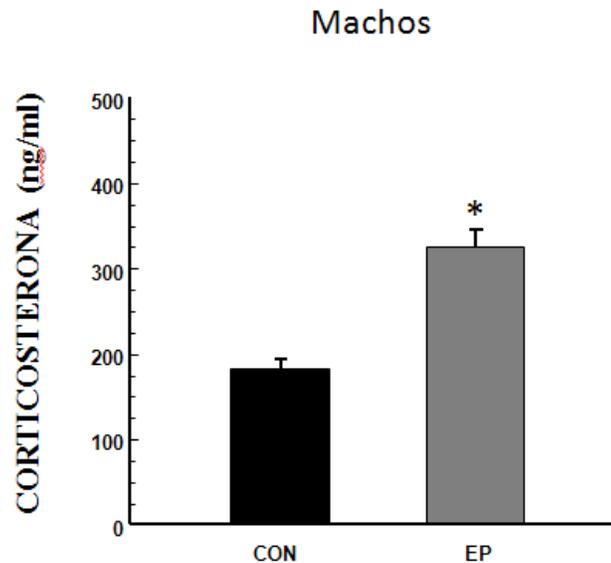


Fig. 40. Efecto del estrés prenatal en los niveles de corticosterona en suero de ratas macho. Se observa un aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona del grupo estrés prenatal (EP) en comparación con el grupo control (CON) (n=28 control y n=36 estrés prenatal).. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparado con el control.

12.4.10 Fertilidad

Los machos estresados prenatalmente presentaron una baja tasa de fertilidad al preñar solo a un 50% de las hembras en comparación con el grupo control (Fig. 26).

13 DISCUSIÓN

Las hembras gestantes sometidas a estrés por inmersión presentaron mayores concentraciones de corticosterona en el suero los días 18 y 19 gestación. Estos hallazgos son consistentes con reportes previos, en los que se observa un aumento de corticosterona en las hembras gestantes expuestas a estrés (Ward et al., 1980; Ward, 1984). Estos resultados son consecuencia de la respuesta por parte del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, en donde el tipo, la intensidad y la duración del estresor son determinantes en la respuesta de un organismo, por lo que la exposición prolongada produce altos niveles de glucocorticoides en la sangre (Angelucci, 2000).

Hembras

Se sabe que la exposición de las hembras gestantes a estrés crónico produce cambios en el metabolismo de las crías en la edad adulta, así como también cambios en el comportamiento sexual y en la regulación neuroendocrina (Maccari et al., 2003; Owen et al., 2005; Weinstock, 2005). Se ha demostrado que el estrés prenatal ocasiona hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en la descendencia en la edad adulta (Clarke et al., 1994; Fride et al., 1986 y Peters, 1982). Los altos niveles de glucocorticoides liberados por parte de la madre son capaces atravesar la barrera placentaria y afectar el desarrollo de las glándulas suprarrenales del feto (Mayer, 2004; Klemcke et al., 1995). La

hiperactividad del eje HHA en las crías puede generarse por una disminución en el número de receptores a corticosterona en el hipocampo, que es el control principal de la retroalimentación negativa por parte de los glucocorticoides, por lo que una disminución de estos receptores ocasionaría un aumento en la secreción de corticosterona (Maccari et al., 1995; Maccari et al., 2003). Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo en relación a los altos niveles de corticosterona observados en la descendencia (Clarke et al., 1994; Fride et al., 1986 y Peters, 1982). Debido a que los niveles de este corticosteroide fueron mucho más elevados en las hembras estresadas prenatalmente, podemos concluir que el estrés prenatal causa mayor afectación en el eje adrenal de la descendencia femenina. Esta hiperactividad del eje adrenal parece ser uno de los factores que alteran la función del eje gonadal en la etapa adulta.

Ciclo estral

Cada vez hay más evidencia de que las variaciones en el ambiente prenatal puede influir en la capacidad reproductiva de las crías en la edad adulta (Maccari et al., 2003). Los resultados de este estudio demuestran que el estrés prenatal (EP) causa alteraciones en el ciclo estral de las ratas hembras adultas, presentándose un alargamiento en las etapas de estro y proestro. Estos resultados son congruentes con lo reportado por Lorraine et al., 1978 que observo un alargamiento en las etapas de estro a metaestro. Las elevadas concentraciones séricas de estradiol observadas en las etapas de estro y proestro en las hembras estresadas prenatalmente podrían explicar el alargamiento de estas etapas, ya que se ha reportado que la proliferación y queratinización del epitelio vaginal son dependientes del estradiol (Tanriverdi et al., 2003). El ciclo estral de la rata está bajo influencia de las hormonas del eje HHOvario, tales como FSH, LH, estrógenos y progesterona. Es probable que la concentración excesivamente alta de estradiol pudiera estar inhibiendo la secreción normal de GnRH o de kisspeptina, bloqueando o disminuyendo la

tasa de ovulación en las ratas estresadas prenatalmente. Esto podría explicar parcialmente la disminución en las tasas de gestación de las hembras estresadas prenatalmente. Otra posibilidad es que la elevada concentración de corticosterona en las hembras EP podría interferir con el adecuado desarrollo de los fetos y causar la reabsorción de algunos. Estos hallazgos sugieren que el estrés prenatal podría estar afectando el desarrollo del cerebro femenino fetal, debido probablemente a un exceso de glucocorticosteroides maternos, los cuales son capaces de atravesar la barrera placentaria y afectar el cerebro del feto (Barbazanges et al., 1996, Welberg y Seckl, 2001), principalmente en las estructuras hipotalámicas, tales como el núcleo arcuato, el área ventral periventricular y el área preóptica, los cuales son los encargados de controlar la secreción de GnRH (Rhees, 1999) cuya función es el control del eje HHG, de las crías en la edad adulta. Sin embargo, queda por evaluar esta posibilidad en futuras investigaciones.

Conducta sexual

Las hembras estresadas prenatalmente y las del grupo control presentaron conducta proceptiva y receptiva sólo en la etapa de proestro, como se esperaba. Sin embargo, el 70% de las hembras estresadas prenatalmente que mostraron alteraciones en el ciclo estral, manteniéndose en la etapa de proestro hasta tres días consecutivos, sólo presentaron receptividad sexual un solo día del ciclo, y no en los tres días que estuvieron en proestro, como podría haberse esperado. Este hecho muestra que el proestro vaginal no coincide con el proestro conductual, lo que podría sugerir que los mecanismos neurológicos que controlan la conducta receptiva de las hembras EP se disocia de los mecanismos neuroendócrinos que controlan la producción de estradiol en los ovarios. Un hallazgo interesante de este trabajo fue que las hembras estresadas prenatalmente normalizaron su ciclo estral al estar en contacto con los machos en la última semana. Esto podría explicarse por las feromonas liberadas por parte de los machos con los que tuvieron contacto sexual. Esto concuerda con

los hallazgos de Mora y Cabrera, 1997 en los que se ha propuesto que las feromonas presentes en la orina del macho pueden regular el ciclo estral de ratas hembras con ciclos estrales anormales. Las hembras EP no mostraron severas alteraciones en la conducta sexual femenina; por tanto, es probable que el estrés prenatal no afecte a las neuronas del núcleo ventromedial en el cerebro fetal femenino, que es el área responsable de regular la conducta sexual en hembras e inducir receptividad sexual. Sin embargo, las hembras EP mostraron una menor intensidad de la lordosis. Estos resultados concuerdan con los de Frye y Orecki, 2002 quienes utilizaron como estresor la inmovilización combinada con luz intensa aplicado del día 14 al 20 de gestación por 45 minutos diariamente. Ellos observaron inhibición de la conducta sexual y disminución en la intensidad de lordosis en ratas hembras adultas. Es posible que los altos niveles de estradiol interfieran con la intensidad de lordosis, la cual es dependiente de estrógenos y progesterona (Davis et al., 1979; Pfaff y Sakuma, 1979) También es probable que los elevados niveles de estradiol alteren la adecuada regulación neuroquímica de la conducta sexual de las hembras. Otra posibilidad es que las altas concentraciones de corticosterona que presentaron las hembras EP interfieran con la intensidad de la lordosis, ya que se ha observado que los niveles elevados de corticosterona interfieren con el despliegue de la lordosis en las hembras (Madhuranath y Yahjurvedi, 2011). El EP utilizando por inmovilización combinado con luz intensa no altera la función reproductiva de las hembras, pues éstas presentan ciclicidad normal, comportamiento sexual normal, tiempo de gestación, parto y supervivencia de las crías sin alteraciones (Beckhardt y Ward, 1983). Probablemente las diferencias con los resultados obtenidos en este trabajo se deban al tipo de estresor utilizado ya que existe una importante componente de especificidad de la respuesta de estrés dependiente de la naturaleza del estímulo estresante. Esta ampliamente aceptado que, dependiendo de las características de cada estímulo estresante (estresor físico, psicológico y mixto), las vías nerviosas que se activan y algunos aspectos de la respuesta de estrés pueden ser diferentes

(Romero y Sapolsky, 1996; Pacak y Palkovits, 2001). Se ha documentado que el estrés por inmersión es un estresor de tipo mixto, en el cual se incluye un estrés físico y psicológico y experimentos con ratas a las que se les sometió a distintos tipos de estresores han demostrado que el método de estrés por inmersión en agua fría tiene un efecto más nocivo sobre el comportamiento sexual del macho, mostrándose una disminución sobre el número de montas, número de intromisiones y latencia de eyaculación, esto, en comparación con otros métodos de estrés como la inmovilización crónica y el estrés con descargas eléctricas (Retana-Márquez et al., 2003).

Pesos

El menor peso corporal observado en las hembras estresadas prenatalmente podría deberse a la elevada concentración de corticosterona en estas hembras sometida a estrés prenatal, la cual pudiera estar afectando algunos aspectos en la ingesta de alimento disminuyendo su peso corporal ya que al haber hiperactividad del eje adrenal incrementa la liberación de CRH y se ha documentado que esta hormona (CRH) tiene efecto anorexigénico, es decir, suprime o al menos disminuye la ingesta de alimento (Heinrichs et al., 2001; Nemeroff, 1998).

El peso de los úteros no mostró ningún cambio por efecto de EP, a pesar de que se observaron niveles muy altos de estradiol, presentando un aumento en la irrigación y acumulación de fluido, como se esperaría en esta etapa. Por otra parte, en el diestro no se observaron cambios debido a que no hubo cambios en los niveles de progesterona. Los cambios en el útero en la etapa de diestro están controlados principalmente por acción de la progesterona iniciando la degeneración epitelial y la producción de prostaglandinas (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002).

También se observó un bajo peso en los ovarios en la etapa de proestro. Es posible que el desarrollo de los folículos no llegue a una maduración correcta debido a que los folículos no respondan al aumento de LH (Hull et al., 2006). Esto podría explicar el bajo peso en los ovarios de las ratas sometidas a EP. Sin embargo, el número de folículos ováricos fue similar en los grupos control y EP. Probablemente la diferencia en peso podría deberse a que las células presentes en los ovarios como células de la granulosa, células de la teca u ovogonias estén presentando procesos de apoptosis. Sin embargo, queda por analizar los posibles cambios histológicos en los ovarios y evaluar si la apoptosis en el ovario podría ser causada por efecto del estrés prenatal.

Fertilidad

Los resultados de este trabajo muestran también disminución en la fertilidad y en el número de crías de las hembras estresadas prenatalmente. Estos resultados son consistentes con los de Herrenkohl, 1979 quien reporto menos concepciones, más abortos espontáneos, hemorragia vaginal y periodos de gestación más largos en hembras adultas que fueron sometidas a EP. Estos efectos podrían deberse a una menor tasa ovulatoria o bien a la reabsorción de fetos durante la gestación, proceso que podría ser causado por los altos niveles de corticosterona observados en las hembras.

Machos

Conducta sexual

Como ya se ha reportado en trabajos anteriores, el EP afecta la conducta sexual de la rata macho en la edad adulta. En este estudio no se observaron diferencias en el porcentaje de machos que copularon. Tampoco hubo diferencia en el porcentaje de machos que eyacularon fue menor que los control. Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente, a pesar de las diferencias en el tipo de estresor utilizado, en relación a que el EP no altera la eyaculación

(Ward et al., 1994). El EP tampoco alteró el número de montas, intromisiones y eyaculaciones, ya que a lo largo de las cuatro pruebas se observó un patrón similar a nuestro grupo control. Sin embargo, sí causó mayores latencias de monta e intromisión, lo que sugiere que es posible que la motivación sexual se haya visto afectada. Sin embargo, queda por demostrar esto, utilizando pruebas que evalúen la motivación sexual. Se ha demostrado que el estrés prenatal disminuye la conducta sexual masculina en ratas macho adultas, caracterizada por una disminución en la capacidad de cópula y en la respuesta eyaculatoria (Ward, 1972; Masterpasqua et al., 1976). En oposición, otros estudios proponen que el estrés prenatal provoca conducta de lordosis en los machos, pero no disminuye el comportamiento sexual masculino (Dahlof et al., 1978.; Politch y Herrenkohl, 1984). Es importante reiterar que el método de estrés que se utiliza en los estudios antes mencionados difiere uno de otro, lo cual podría explicar los diferentes resultados observados en la conducta sexual masculina. Es probable que los corticosteroides de la madre liberados durante el estrés, afecten áreas del cerebro fetal asociadas con la conducta sexual en los machos. Si bien es cierto que los glucocorticoides pueden interferir con el pico de testosterona en el feto macho, se ha observado que el pico de testosterona neonatal que se presenta una hora después del nacimiento no se ve afectado en los machos estresados prenatalmente y de alguna manera podrían favorecer la diferenciación sexual (Ward et al., 2002). Esto puede explicar los leves efectos observados en el despliegue de la conducta sexual masculina en los machos estresados prenatalmente. En conclusión, el tipo de estresor utilizado en este trabajo altera sólo algunos parámetros conductuales que se han relacionado con la motivación sexual, pero no los relacionados con la ejecución, ya que los machos presentaron latencias y número de eyaculaciones similares a los de los machos control.

Pesos

El peso corporal en las ratas macho adultas EP también fue menor que en los control; esto podría atribuirse a elevados niveles de CRH, la cual, como ya se mencionó, tienen efecto anorexigénico. Otros estudios han reportado que el estrés prenatal por inmovilización crónica del día 7 al 21 de gestación tres veces por semana no provoca disminución en el peso corporal de ratas adultas (Rodríguez et al., 2007). Estas diferencias podrían deberse al tipo de estresor utilizado, así como al esquema de exposición al estresor. El peso de las glándulas seminales y la próstata no fue afectado por el EP. Como se ha descrito, estas dos glándulas son dependientes de testosterona. Es probable que, a pesar de la disminución de este esteroide sexual en los machos EP, los niveles observados pudieran ser suficientes para mantener el peso y la funcionalidad de dichas glándulas.

Por otro lado, el peso testicular fue menor los machos EP; incluso algunos de los testículos de estos animales presentaron atrofia severa. Estos datos son consistentes con los estudios en los que se reporta que el estrés prenatal causa reducción en el peso testicular en los machos recién nacidos (Dahlof et al., 1978) y en machos de 105 y 115 días de edad (Meisel et al., 1979; McLeod y Brown, 1988; Chen et al., 2013). El bajo peso testicular e incluso la atrofia de estas gónadas podría ser consecuencia de bajos niveles de LH, de FSH, así como de la baja secreción de testosterona por parte de las mismas gónadas. En estudios anteriores, se ha demostrado que la baja concentración de testosterona (Shaha, 2008) o de gonadotropinas (Sinha et al., 1997; Pareek et al., 2007), causa apoptosis en las células testiculares, lo que explicaría el menor peso testicular en los machos EP. Se ha propuesto también que el bajo peso testicular ocasionado por el EP podría ser consecuencia de la disminución en la actividad de la enzima aromatasa presente en el hipotálamo (Rhees et al., 1990) y de la enzima androgénica 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa que

cataliza la reacción de pregnenolona a progesterona en el testículo (Orth et al., 1983), durante el período crítico del desarrollo gonadal fetal.

Testosterona y calidad espermática

En este trabajo se reporta que el EP causa disminución de la concentración, la movilidad y la viabilidad de espermatozoides en las ratas macho adultas. Estos resultados podrían explicarse por las bajas concentraciones de testosterona observadas en los machos EP, hecho que podría deberse a una menor liberación de hormonas del eje HHG, así como a la muerte de las células de Leydig por apoptosis observada en este trabajo, o bien que estas células podrían no estar respondiendo adecuadamente a los estímulos de la hormona LH. La baja concentración de espermatozoides epididimarios podría explicarse por el incremento en la apoptosis de las células germinales testiculares en los machos EP como lo muestran los resultados de este trabajo. Estos hallazgos son consistentes con los de Chen y cols. (2013), quienes demostraron que el EP por inmovilización provoca un aumento en el índice apoptótico dependiente de caspasa 3 en los testículos de ratas macho adultas (Chen et al., 2013). Se ha sugerido que la apoptosis de células germinales es consecuencia de una reducción en la concentración de T intratesticular (Kim et al., 2001). La disminución de la concentración de testosterona observada en los machos EP podría deberse a la inducción de la apoptosis en las células de Leydig, como se observó en este trabajo. Otra posible explicación sería que los elevados niveles de corticosterona que presentaron los machos EP podrían inhibir la esteroidogénesis testicular, a través de causar disminución en la expresión y actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de testosterona, como ha sido demostrado en estudios in vitro (Hardy et al., 2005).

La testosterona es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis (Amann, 1983; Ekstedt et al., 1986). Este proceso puede ser afectado por diversos factores: cuando se suprime la testosterona, las espermatogonias en

todos los estadios mueren, las espermátides sufren anomalías estructurales y metabólicas, disminuye la proporción de espermatozoides vivos y progresivos móviles, y se incrementan las atipias por defectos de cabeza principalmente (Kastelic, 1997; Setchell, 1998). Por otro lado, la baja movilidad y viabilidad espermática podría atribuirse a los altos niveles de corticosterona observados en los machos EP. Se ha demostrado que la corticosterona es capaz de generar estrés oxidante en el epitelio epididimario, lo que puede causar lipoperoxidación de los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides, trayendo como consecuencia alteraciones en la movilidad y muerte de los espermatozoides (Aitken et al, 2012). Aunado a lo anterior, el aumento en el porcentaje de malformaciones observadas en los espermatozoides de los machos EP podría deberse también a la generación de especies reactivas causada por la corticosterona.

Las funciones del epidídimo son el transporte y la maduración de los espermatozoides (Chenoweth, 1997), los cuales, a través del pasaje por los conductos eferentes y el epidídimo, adquieren la habilidad de tener movimiento progresivo lineal y la capacidad de fertilizar (Johnson y Everitt, 1980). Durante este proceso, en la célula espermática ocurren cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos (Johnson y Everitt, 1980; Amann 1983; Chenoweth, 1997). Queda por demostrarse que el EP causa aumento del estrés oxidante, tanto en el epidídimo como en los espermatozoides que se encuentran en él.

Fertilidad

Los machos estresados prenatalmente presentaron una baja tasa de fertilidad, preñando solo a un 50% de las hembras pertenecientes al grupo control. La baja fertilidad en este caso podría atribuirse en parte a la baja calidad espermática en esos machos. Al presentar malformaciones en los espermatozoides, bajas concentraciones, baja movilidad y baja viabilidad, estos espermatozoides, tienen menor posibilidad de lograr fecundar un ovocito, por

ello, las hembras control que quedaron gestantes por machos EP, tuvieron un menor número de crías.

Este trabajo demuestra que la exposición al estrés prenatal puede afectar negativamente el desarrollo del cerebro fetal (Kinney et al., 2008). Cualquiera de los componentes de las vías de estrés tiene el potencial para inhibir la reproducción. En el cerebro, estos componentes incluyen vías neuronales que se activan durante el estrés y la sinapsis con las neuronas de GnRH o interneuronas que se proyectan a las neuronas de GnRH y hormonas circulantes liberadas durante el estrés que actúan en el sistema nervioso central, estas entradas se han documentado ampliamente en roedores (Clarke, 1996). Sin embargo, todavía no está claro qué entradas neurales retransmiten los efectos del estrés sobre las neuronas GnRH (Tilbrook et al., 2000), por lo que queda por hacer mucha investigación al respecto.

14 CONCLUSIONES

En las hembras, el EP altera la progresión del ciclo estral, alargando las etapas de estro y proestro. Afecta la conducta sexual, disminuyendo la intensidad de la lordosis. Ocasiona menor peso ovárico, pero altos niveles de estradiol. Estos factores repercuten en una baja tasa de fertilidad en las hembras y un menor número de crías.

En los machos, el EP causa disminución de la motivación sexual mostrada por altas latencias de monta e intromisión. Así mismo, causa menores niveles de testosterona, probablemente debidos a la apoptosis de las células de Leydig. También ocasiona apoptosis de las células germinales, lo que repercute en un menor peso testicular y probablemente una menor cuenta espermática. También causa menor movilidad y viabilidad espermática y mayor porcentaje de malformaciones en los espermatozoides. Estas alteraciones se reflejan en bajas tasas de fertilidad en los machos en una edad adulta.

En general podemos concluir que los niveles elevados de glucocorticoides provenientes de la madre estresada pueden perjudicar el desarrollo del cerebro fetal alterando algunos parámetros reproductivos de la descendencia en la edad adulta, ocasionando así, infertilidad tanto en machos como en hembras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ågmo, A., Soulairac, M.-L., and Soulairac, A. 1977. Preoptic lesions, sexual behavior, and spontaneous ejaculation in the rat. *Scand. J. Psychol.* 18, 345–347.
- Aitken, J.R., Jones, K.H., Robertson, S.A. 2012. Reactive Oxygen Species and Sperm Function—In *Sickness and In Health*. *J Androl*, 33(6):1096-1106.
- Almeida, S.A., Petenusci, S.O., Franci, J.A., Rosa, A.A., Silva, E., Carbalho, T.L. 2000. Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in puberal rats. *Andrologia*, 32,7-11.
- Amann, R. 1983. Endocrines changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J.Dairy Sci.* 66 (12): 2606-2622.
- Anderson, D.K., Rhees, R.W., Fleming, D.E. 1985. Effects of prenatal stress on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) of the rat brain. *Brain Res* 332(1):113–118.
- Angelucci, L. 2000. The glucocorticoid hormone: From pedestal to dust and back. *Eur J Pharmacol*; 405: 139-47.
- Anjum, I.A., Usmani, R.H., Tunio, M.T., Abro, S.H. 2009. Improvement of conception rate in crossbred cattle by using GnRH analogue therapy. *Pakistan Vet. J.* 29:93-94.
- Aparicio, S.A. 2005. Kisspeptins and GPR54 the new biology of the mammalian GnRH axis. *Cell Metab.* 1(5):293-6.

- Austin MP, Leader LR & Reilly N. 2005. Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehaviour. *Early Hum Dev* 81, 917–926.
- Baquedano, E. García-Cáceres, C. Diz-Chaves, Y. Lagunas N. Calmarza-Font, I. Azcoitia I. Garcia-Segura, L.M., Argente, J., Chowen, J.A., Frago L.M. 2011. Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats. *PLOS ONE*; 6(11):e27549.
- Barker, D.J.P., Osmond, C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart diseases in England and Wales. *Lancet* 1; 1077–1081.
- Barker DJP. In utero programming of chronic disease. 1998. *Clin Sci*, 95:115–28
- Barraclough, C.A. 1967. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In. *Neuroendocrinology*. New York: London Academic Press. 61-69.
- Barbazanges, A, Piazza PV, Le Moal M and Maccari S 1996 Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *Journal of Neuroscience* 16 3943–3949.
- Beckhardt, S. and Ward, I.L. 1983. Reproductive functioning in the prenatally stressed female rat. *Dev. Physiol.* 16(2):111–118.
- Berne, R., Levy, M. 1998. *Fisiología*. 2da edicion. Harcourt Brace. Madrid España.
- Bentley G. E., Perfito N., Ukena K., Tsutsui K., Wingfield J. C. (2003). Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J. Neuroendocrinol.* 15, 794–802.
- Brackett, N. L., and Edwards, D. A. (1984). Medial preoptic connections with the midbrain tegmentum are essential for male sexual behavior. *Physiol. Behav.* 32, 79–84.

- Clarke, A.S., Wittwer, D.J., Abbott, D.H., Schneider, M.L. 1994. Long-term effects of prenatal stress on HPA axis activity in juvenile rhesus monkeys. *Dev Psychobiol*; 27:257– 69.
- Clarke, I.J. 1996. Effector mechanisms of the hypothalamus that regulate the anterior pituitary gland. In *Autonomic–Endocrine Interactions*. 1 Eds K Unsicker and G Burnstock. Harwood Academic Publishers, London. 45–88.
- Clarkson J, Herbison AE 2006 Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147:5817-5825.
- Chantal, H., Arsaut, J., Arnauld, E., Demotes-Mainard, J. 1996. Transient neonatal elevation in hypothalamic estrogen receiving mRNA in prenatally-stressed male rats. *Neurosci. Lett.* 216: 141-145.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G.P. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu.Rev. Physiol.* 67, 259-284.
- Chen, J. J., and Bliss, D. K. (1974). Effects of sequential preoptic and mammillary lesions on male rat sexual behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 87, 841–847.
- Chen, S. M., Mayer, N., Romanini, M. C., Rolando, A. N., Liaudat, A. C., Brun, N., Vivas, A., Gaun, H. F. & Rodriguez, N. 2013. Reproductive response in offspring male rats exposed to prenatal stress and to early postnatal stimulation. *Int. J. Morphol.*, 31(2):754-764.
- Chenoweth P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Youngquist: *Current therapy in large animal theriogenology*. Saunders, 1ª Edición, pag. 217.
- Chrousos, G., Gold, P. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama* 267, 1244-1252.
- Chrousos, G. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and Immune-mediated inflammation. *N Engl J Med.*332:1351-1363.

- Conn, P.M., Crowley, W.F. Jr. 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Ann. Rev. Med.* 45:391-405.
- Dahlof, L. G., Hard, E., Larsson, K. 1978. Influence of maternal stress on the development of the fetal genital system. *Physiol. Behav.* 20:193-195.
- De Kloet, E.R. 2000. Stress in the brain. *Eur J Pharmacol*; 405: 187-98.
- Davis, P, McEwen, B., Pfaff, D. 1979. Localized behavioral effects of triated estradiol implants in the ventromedial hypothalamus of female rats. *Endocrinology* 104:898-903.
- Davidson, J. M. 1966. Characteristics of sex behaviour in male rats following castration. *Anim. Behav.* 14, 266–272.
- D'anglemont de Tassigny, X, Colledge WH.2010. The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology* 25:207-217
- De Roux N Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15; 100 (19):10972-6.
- Dörner G. 1981. Sex hormones and neurotransmitters as mediators for sexual differentiation of the brain. *Endokrinologie.* 1981 Dec;78(2-3):129-38.
- Dörner, G., Staudt, J. 1986. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology.* 3:136-140.
- Dörner, G., Gotz, F., Docke, W. D. 1983. Prevention of demasculinization and feminization of the brain in prenatally stressed male rats by perinatal androgen treatment. *Exp. Clin. Endocrinol.* 81:88-90.
- Dörner G, Geier T, Ahrens L, Krell L, Münx G, Sieler H, Kittner E, Müller H. 1980. Prenatal stress as possible aetiological factor of homosexuality in human males. *Endokrinologie.* 1980 Jun;75(3):365-8.
- Döhler, K., Hines, M., Coquelin, A., Davis, F., Shryne, J., Sickmöler, P.; et al. 1986. Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and

an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology* 42:443-448.

- Dufau, M.L. 1998. The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev. Physiol.* 60:461-496.
- Dupouy J-P, Chatelain A, Allaume P. 1980. Absence of transplacental passage of ACTH in the rat: direct experimental proof. *Biol Neonate*; 37: 96-102.
- Dungan, H.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2006. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 147(3):1154-8.
- Dunlap, J. L., Zadina, J. E., Gougis, G. 1978. Prenatal stress interacts with prepuberal social isolation to reduce male copulatory behavior. *Physiol. Behav.* 21:873-875.
- Eddy, S. R. 1996. Hidden Markov models. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6:361-365.
- Edwards, D. A., and Einhorn, L. C. 1986. Preoptic and midbrain control of sexual motivation. *Physiol. Behav.* 37, 329–335.
- Ekstedt L., Söderquis L., Plöen L. 1986. Fine structure of spermatogenesis and sertoly cels (*Epiteliocytus sustentans*) in the bull. *Anat. Histol. Embryol.* 15: 23-48.
- Erskine M. S., Lehmann M. L., Cameron N. M., Polston E. K. 2004. Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis. *Behav. Brain Res.* 153, 295.
- Ferrán, G. 2011. Andrological implications of abuse of anabolic-androgenic steroids. *Rev Int Androl.* 9(4):160-169.
- Freeman, M.E. 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil E & Neil J. (Eds). *Physiology of reproduction* New York: Raven Press. Pp: 2329-2367.
- Fride E, DanY, Feldon J, Halevy G, Weinstock M (1986). Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepuberal and adult rats. *Physiol Behav.* 37: 681-687.

- Frye, C.A, Orecki, Z.A. 2002. Prenatal stress alters reproductive responses of rats in behavioral estrus and paced mating of hormone-primed rats. *Horm Behav.* Dec;42(4):472-83.
- González-Flores O., Beyer C., Lima-Hernandez F.J., Gomora-Arrati P., Gómez-Camarillo M.A., Hoffman K., Etgen A.M. 2007. Facilitation of estrous behavior by vaginal cervical stimulation in female rats involves alpha1-adrenergic receptor activation of the nitric oxide pathway. *Behavioural Brain Research*, 176(2):237-243.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA 2004 A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073-4077.
- Gorski, R. 1978. Evidence for morphological sex differences within the medial preoptic area for the rat brain. *Brain Res* 148: 333-346.
- Goy, R., McEwen, E. 1980 *Sexual differentiation of the brain.* Cambridge:Mass Mit press.
- Hafez, E.S.E. 1970. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*, Lea & Febiger, Philadelphia; 74-314.
- Hafez C. 1989. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 5ta Ed. Interamericana Mc. Graw-Hill, México, 694 pp.
- Haga S., Hattori T., Sato T., Sato K., Matsuda S., Kobayakawa R., Sakano H., Yoshihara Y., Kikusui T., Touhara K. 2010. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature*, 466(7302):118-122.
- Hardy M P., Gao H-B., Dong Q., Ge R., Wang Q., Ran Chai W., Feng X., Sottas C. 2005. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res.* 322, 147–153
- Haughian, J.M., Wiltbank, M.C. 2002. GnRH: from physiology to “synch”-ology. 2002 Annual Conference & Symposium, Society for Theriogenology, American College of Theriogenologists. Pp. 221-235.

- Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E. 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349-11356.
- Han Kyoung Choe. 2013. Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation. *Current Issue*. 110(14):5677–5682
- Heinrichs, S.C., Li, D.L., Iyengar, S., 2001. Corticotropin-releasing factor (CRF) or CRF binding-protein ligand inhibitor administration suppresses food intake in mice and elevates body temperature in rats. *Brain Res* 900, 177–185.
- Herbison, A.E. 1997. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev. Reprod.* 2:1-6.
- Herrenkohl, L.R. 1979. Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring *Science*. 1097-1099.
- Hines, M., Allen, L.S., Gorski, R.A. 1992. Sex difference in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Bain Res* 579: 321-326.
- Holsboer, F. 2001. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Dis* 62:77-91.
- Huizink, A.C., Dick, D.M., Sihvola, E., Pulkkinen, L., Rose, R.J., & Kaprio, J. 2007. Chernobyl exposure as stressor during pregnancy and behaviour in adolescent offspring. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 116, 438–446.
- Huizink, A.C. 2000. Prenatal stress and its effects on infant development. Academic Thesis, University Utrecht, The Netherlands; p. 1– 217.
- Hull EM., Wood RI., McKenna KE. 2006. Neurobiology of Male Sexual Behavior. En: Knobil E & Neil J. (Eds). *Physiology of reproduction* New York: Raven Press. Pp: 1729-1824

- Jonson M., Everitt B. 1980. Essential reproduction. Blackwell Scientific Publications, 1ª Edición, pag 33.
- Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. 2002. J Endocrinol. 175:113-20.
- Kastelic J., Cook B., Coulter G. 1997. Scrotal – Testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull.): 271-282.
- Kauffman AS., Clifton DK., Steiner RA. 2007. Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling the neuroendocrine regulation of reproduction. Trends in Neurosciences, 30: 504-511.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. 1997. Neurociencia y conducta. (1ª ed.). España: Prentice Hall. Págs. 619-633.
- Kaplan, M. E., and McGinnis, M. Y. 1989. Effects of ATD on male sexual behavior and androgen receptor binding: a reexamination of the aromatization hypothesis. Horm.Behav. 23, 10–26.
- Kerchner, M., Ward, I.L. 1992. SDN-MPOA volume in male rats is decreased by prenatal stress, but is not related to ejaculatory behavior. Brain Res 581(2):244–251.
- Kinney, D.K., Munir, K.M., Crowley, D.J., Miller, A.M. 2008. Prenatal stress and risk for autism. Neurosc. Biobehav. 32(8):1519-1532.
- Kim, J.; Gosh, S.; Weil, A. & Zirkin, B. Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resultin from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology*, 142(9):3809-16, 2001.
- Kirkpatrick, M. 1996. Good genes and direct selection in the evolution of mating preferences. Am. Nat. 125:788-810.
- Klemcke, H. 1995. Placental metabolism of cortisol at mid-and late gestation of swine. Biol Reprod. 3: 1293-1301.

- Kondo, Y., Sachs B.D., Sakuma, Y. 1997. Importance of the medial amygdale in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. *Behav Brain Res* 88:153-160.
- Kriegsfeld L. J., Mei D. F., Bentley G. E., Ubuka T., Mason A. O., Inoue K., et al. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2410–2415.
- Knobil E., Neill J.D. (Eds). 2005. *The physiology of reproduction.* Academic Press, 3rd edition.
- Kow L.M., Florea C., Schwanzel-Fukuda M., Devidze N., Kami K.H., Lee A., Zhou J., Maclaughlin D., Donahoe P., Pfaff D. 2007. Development of a sexually differentiated behavior lordosis and its underlying CNS arousal functions. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 79:37-59.
- Lars-Gösta, D., Ernest, H., Knut, L. 1977. Influence of maternal stress on offspring sexual behavior. *Anim. Behav.* 25:958-963.
- Lesage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D., Darnaudery, M. 2004. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J. Endocrinol.* 181(2):291-6.
- Liu, Y., Salamone, J., Sachs, B.D. 1997. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J Neurosci.* 17: 5245-5253.
- López, M.N. 2008. *Biología y Geología 1º Bachillerato.* Editex. Pp.301-302.
- Lorraine, R., Herrenkohl, J.A., Politch, J. 1978. Effects of prenatal stress on the estrous cycle of female offspring as adults. University, Philadelphia, p.1-2.

- Lucio, R.A, Tlchi-Lopez, J.L. 2008. Analisis de la copula y el eyaculado en la rata albina (*Rattus norvegicus*). Universidad Autonoma de Tlaxcala. Mexico. Pp.11-45.
- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 119–127.
- Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, LeMoal M.1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci.* 15: 110-116.
- Madhuranath BN, Yajurvedi HN. 2011. Progesterone prevents corticosterone mediated inhibition of estrous behaviour in rats. *Indian J Exp Biol.*49(5):313-318.
- Madlafousek, J. y Hlišák, Z. 1997. Sexual Behaviour of the Female Laboratory Rat: Inventory, Patterning, and Measurement. *Behav.*63(4):129-174.
- Marcondes, F.K., Miguel, K., Melo, L.L., Spadari-Bratfisch, R.C. 2001. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 74(4-5):435-440.
- Masterpasqua, F., Chapman, R.H. and Lore, R.K. 1976. The Effects of Prenatal Psychological Stress on the Sexual Behavior and Reactivity of Male Rats *Dev. Physiol.* 9(5):403-411.
- Masco, D., Carrer, H. 1980. Sexual receptivity in female rats after lesión or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol Behav* 24:1073.1080.
- Mayer N.I. 2004. Effects of prenatal stress on male offspring neuroendocrine and immunologic parameters. Doctoral thesis pp. 1-90
- McLeod, P.J. and Brown, R.E. 1988. The effects of prenatal stress and postweaning housing conditions on parental and sexual behavior of male Long-Evans rats. *Psychobiology.* 16(4): 372-380.
- McLachlan, R.I., Wreford, N.G., O'Donnell, L., de Kretser, D.M., y Robertson, D.M. 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent role for testosterone and FSH. *J Endocrinol.* 148:1-9.

- Meisel RL, Dohanich GP, Ward IL. 1979. Effects of prenatal stress on avoidance acquisition, open-field performance and lordotic behavior in male rats. *Physiol Behav* 22:527–530.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. 2005a. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(5) :1761-6.
- Messenger S. 2005b. Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *J Neuroendocrinol*. 17 (10): 687-8.
- Miller, L., Aoki, A. 1991. Stereological analysis of the hypothalamic ventromedial nucleus. II. Hormone induced changes in the synaptogenic pattern. *Dev Brain Res*. 61:189-186.
- Montano, M.M., Welshons, W.V., vom Saal, F.S. 1995. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biol Reprod* 53:1198-207.
- Mora, O.A. and Cabrera, M.M. 1994. Pheromonal male-induced diestrus and cyclicity in aging intact and young estrogenized female rats. *Biol. Reprod*. 50 (3) 603-606.
- Morris JA., Jordan CL., Breedlove SM. 2004. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nature Neurosci* 7:1034-1039
- Neil, J., MacLusk, N., Naftolin, F. 1981. Differentiation of the central nervous system. *Science*; 211:1294-1302.
- Nemeroff, C.B., 1988. The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression. *Pharmacopsychiatry* 21, 76–82.
- Newton, R. 2000. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: What is important? *Thorax*. 55(7):603-613.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*. 22:289-318.

- O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., McLachlan, R.I. 2006. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neill J. D. (Ed), Knobil and Neill's Physiology of reproduction. Elsevier, New York. Pp. 1017-1069.
- O'Connor, T.G., Heron, J., Golding, J., & Glover, V. 2003. Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: A test of a programming hypothesis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 44, 1025–1036.
- Oriyasa C., Kondo Y., Hayashi S., McEwen BS., Sakuma Y. 2001. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: Implication in luteinizing hormone surge. *PNAS* 99: 3306-3311
- Orth, J. M.; Weisz, J.; Ward, O. B. & Ward, I. L. 1983. Environmental stress alters the developmental pattern of delta 5-3 betahydroxysteroid dehydrogenase activity in Leydig cells of fetal rats: a quantitative cytochemical study. *Biol. Reprod.* 28:625-31.
- Owen, D., Andrews, M.H., Matthews, S.G. 2005. Maternal adversity, glucocorticoids and programming of neuroendocrine function and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 209–226.
- Pacak, K., Palkovits, M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, 22, 502-548.
- Pfaff, D., Sakuma, Y. 1979. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol London* 288:189-202.
- Pfaff, D., Schwartz-Giblin, S. 1988. Cellular mechanism of female reproductive behaviors. In: E. Knobil, J. Neil, editors. *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press, Ltd; 1487-1568.
- Phillips, D.M, Lakshmi, V., Monder, C. 1989. Corticosteroid 11beta-dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology*. 125:209-216.

- Pareek, T.K., Joshi, A.R., Sanyal, A., Dighe, R.R. 2007. Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis* 12, 1085–1100.
- Pasquali, R., Vicennati, V., Cacciari, M., Pagotto, U., 2006. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann. NY Acad. Sci.* 1083, 111–128.
- Pawson, A.J., Morgan, K., Maudsley, S.R., Millar, R.P. 2003. Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology. *Reproduction* 126:271-278.
- Perey, Clermont and Leblond, 1961, *Amer J Anat* 108:47
- Peters, D. V. 1989. Effects of maternal stress during different gestational periods on the serotonergic system in adult rat offspring. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31:839-843.
- Peters DAV (1982). Prenatal stress: Effects on brain biogenic amines and plasma corticosterone levels. *Pharmacol Biochem Behav* 17: 721-726.
- Politich, A.J, Herrenkohl, R.L. 1984. Effects of prenatal stress on reproduction in male and female mice. *Physiol Behav.* 32(1):95-99.
- Popa, S.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2005. A KiSS to remember. *Trends Endocrinol Metab.* 16(6):249-50.
- Prieto-Gómez, B., Velázquez-Paniagua, M. 2002. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. Monografía. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 45:252-257.
- Putnam, S. K., Sato, S., and Hull, E. M. 2003. Hormonal maintenance of copulation in castrates: association with extracellular dopamine in MPOA. *Horm. Behav.* 44, 419–426.
- Redondo, C.P. 2003. *Endocrinología de la reproducción*. INEA. Escuela universitaria técnica agrícola. España.

- Retana, M. S., Dominguez, S. E., Velazquez, M. J. 1996. Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 21, pp. 39–50.
- Retana-Márquez, S., H. Bonilla-Jaime, G. Vázquez-Palacios, R. Martínez-García, J. Velázquez-Moctezuma, 2003. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior*, 44, pp. 327–337.
- Resko, J. A., Perkins, A., Roselli, C. E., Stellflug, J. N., and Stormshak, F. K. 1999. Sexual behaviour of rams: male orientation and its endocrine correlates. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 54, 259–269.
- Rhees, W. R., Fleming, D. E. 1981. Effects of malnutrition, maternal stress; or ACTH injections during pregnancy on sexual behavior of male offspring. *Physiol. Behav.* 27:879-882.
- Rhees, R. W., Shryne, J. E., & Gorski, R. A. (1990). Onset of the hormone-sensitive perinatal period for sexual differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female rats. *Journal of Neurobiology*, 21, 781-786.
- Rhees RW. 1999. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. *Brain Res Bull*; 50: 193-199.
- Robinson, S.M., Fos, T.O., Dikkes, P., Pearlstein, R.A. 1986. Sex differences on the shape of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and suprachiasmatic nucleus of the rat: 3-D computer reconstructions and morphometrics. *Brain Res.* 371:380-384.
- Rodríguez, N., Mayer, N., Gauna, H.F. 2007. Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity. *Biocell* 31:67-74.
- Romero, L.M., y Sapolsky, R.M. 1996. Patterns of ACTH secretagog secretion in response to psychological stimuli. *J Neuroendocrinol* 8, 243-254.

- Rosenzweig, M.R., Leinman, A.I. 1992. Hormonas: un sistema de comunicación química. ed. Psicología fisiológica. Madrid, McGraw Hill; p. 237-66.
- Sadler, T.W. 2007. Langman Embriología medica: con orientación clínica, 10ª ed., Editorial Medica Panamericana, Madrid, España; 37-106.
- Sampath-Kumar, R., Matthews, S.G. and Yang, K. 1998. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is the predominant isozyme in the guinea pig placenta: decreases in messenger ribonucleic acid and activity at term. *Biol Reprod* 59, 1378–1384.
- Sirera, R., Sánchez, P.T., Camps, C. 2006. Inmunología, estrés, depresión y cáncer. *Psicooncología* 3: 35 – 48.
- Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol.* 6, 117-231.
- Serra, H.A., Roganvich, J.M., Rizzo, L.F. 2012. Glucocorticosteroides: paradigma de medicina traslacional de lo molécula al uso clínico. *Medicina.* Buenos Aires; 72: 158-170.
- Seminara SB, Kaiser UB. 2005. New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1. *Endocrinology.* 146(4):1686-8.
- Setchell B. 1998. Head and the Testis. *J. Reprod. and Fertil* 114: 179-194.
- Seckl, J. R. 1997. Glucocorticoids, feto-placental 11h-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and early life origins of adult disease. *Steroids;* 62:89–94.
- Seckl, J.R. 2001. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Molecular and cellular Endocrinology* 185:61-71.

- Seckl, J.R. and Meaney, M.J. 2004. Glucocorticoid programming. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032 63–84.
- Shaha, C. 2008. Germ cell apoptosis: relevance to infertility and contraception. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* 8, 66–78.
- Sinha Hikim, A.P., Rajavashisth, T.B., Sinha Hikim, I., Lue, Y., Bonavera, J.J., Leung, A., Wang, C., Swerdloff, R.S. 1997. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol. Reprod.* 57, 1193-1201.
- Smith, M.J., Jennes, L. 2001. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 122:1-10.
- Sördersten, P., Hansen, S., Srebro B. 1981. Suprachiasmatic lesions disrupt the daily rhythmicity in the sexual behavior of normal male rats and male rats treated neonatally with antiestrogen. *J Endocrinol.* 88:125-130.
- Tanriverdi, F., Silveira, L., MacColl, G., Bouloux, P. 2003. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J. Endocrinol.* 176:293-304.
- Tena-Sempere M. 2005. Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology.* 146 (9): 3683-5.
- Tilbrook, A. J., Turner, A.I. and Clarke, I.J. 2000. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. of Reproduction* 5, 105–113.
- Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S & Sharp PJ 2000 A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275 661–667.
- Tsutsui ,K., Ukena, K. 2006. Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides* 27(5): 1121-1129.

- Tsutsui K., Bentley G. E., Ubuka T., Saigoh E., Yin H., Osugi T., et al. 2007. Review: the general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 365–370.
- Turkstra, J., Mueloen, R. 2006. Active immunisation against gonadotropin-releasing hormone, an active tool to block the fertility axis in mammals. *Veterinary Sciences Tom.*
- Valdés, M., Flores, T. 1990. *Psicobiología del estrés*. Ed. Martínez Roca S.A. p.327-435.
- Van Den Bergh, B.R., & Marcoen, A. 2004. High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8- and 9-year-olds. *Child Development*, 75, 1085–1097.
- Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M & Glover V (2005). Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev*, 29, 237–258.
- Vogel, G. 2005. Reproductive biology. A powerful first KiSS-1. *Science*. 309(5734):551-2.
- Wang CT, Shui HA, Huang RL, Tai MY, Peng MT & Tsai YF. 2006. Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. *Neuroscience* 138 357–364.
- Ward, I. L. 1972. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* 175:82-84.
- Ward, I. L., Weisz, J. 1980. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 207:328-329.
- Ward, I.L., Weisz, J. 1984. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology* 114:1635–1644.

- Ward, I. L., Ward, O. B., Winn, R. J., & Bielawski, D. 1994. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors. *Behavioral Neuroscience*, 108, 1188-1195.
- Ward, O.B., Ward, I.L., Denning, J.H., French, J.A., Hendricks, S.E. 2002. Postparturitional testosterone surge in male offspring of rats stressed and/or fed ethanol during late pregnancy. *Horm Behav.* 41:229-35.
- Wilbert, D. M., Griffin, J. E., and Wilson, J. D. 1983. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 56, 113–120.
- Weinstock, M. *Neurosci Biobehav.* 1997. Does Prenatal Stress Impair Coping and Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis?. 21(1):1-10.
- Weinstock M. 2005. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun* 19, 296–308.
- Welberg, L.A.M. and Seckl, J.R. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *Journal of Neuroendocrinology* 13:113–128. Welberg, L.A., Thivikraman, K.V. and Plotsky, P.M. 2005. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *J Endocrinol* 186, R7–R12.
- Welberg, L.A., Thivikraman, K.V. and Plotsky, P.M. 2005. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *J Endocrinol* 186, R7–R12.
- Yahr, P. 1995. Neural circuitry for the hormonal control of male sexual behavior. In *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones* (P. E. Micevych, and R. P. Hammer, Jr., Eds.), pp. 40–56. Cambridge University Press, New York.

Sitios web consultados

http://www.cell.com/cms/attachment/2007952253/2030510954/gr1_lrg.jpg

<https://brainandgender.wordpress.com/neuroanatomy/>