



# **Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A PLOMO SOBRE LA  
CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA, LA CONDUCTA SEXUAL  
MASCULINA Y LA INMUNORREACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES PARA  
ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS EN EL ÁREA PREÓPTICA MEDIAL Y LA  
AMÍGDALA MEDIAL DE LA RATA**

TESIS

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

PRESENTA

**BIÓL. GUSTAVO GUILLÉN HERRERA**

CODIRECTORES

**DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA**

**DR. JULIO CÉSAR ROJAS CASTAÑEDA**

ASESOR

**DR. SERGIO MONTES LÓPEZ**

Ciudad de México a 26 de noviembre de 2018

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT. El alumno Gustavo Guillén Herrera recibió apoyo de la UAM por parte del CONACyT, (CVU/Becario: 814439).



**Comité tutorial:**

Dra. Marcela Arteaga Silva (Codirectora interna). Profesor titular C, tiempo completo. Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva. Depto. Biología de la Reproducción. División CBS, UAM Iztapalapa.

Dr. Julio César Rojas Castañeda (Codirector externo). Investigador en Ciencias Médicas. Laboratorio de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Pediatría.

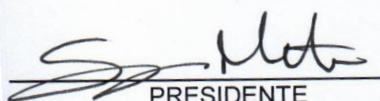
Dr. Sergio Montes López (Asesor). Investigador en Ciencias Médicas D. Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suarez".

Este trabajo fue realizado en:

- Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva, 10-Q3 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM Iztapalapa.
- Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría.
- Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Dr. Manuel Velasco Suárez".

## MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Efecto de la exposición perinatal a plomo sobre la concentración de testosterona, la conducta sexual masculina y la inmunorreactividad de los receptores para andrógenos y estrógenos en el área preóptica medial y la amígdala medial de la rata" con fecha de examen el día 26 de noviembre de 2018.



PRESIDENTE

Dr. Sergio Montes López  
Investigador en Ciencias médicas "D"  
Departamento de Neuroquímica.  
Instituto Nacional de Neurología y  
Neurocirugía "Dr. Manuel Velazco"



SINODAL

Dra. Pilar Durán Hernández  
Investigadora titular "A" Tiempo  
completo definitivo. Departamento de  
Biología Celular. Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional Autónoma de  
México



SECRETARIA

Dra. Ofelia Limón Morales  
Departamento de Biología de la  
Reproducción Animal, Universidad  
Autónoma-Iztapalapa



SINODAL

Dr. Porfirio Gómora Arrati  
Departamento de Fisiología, laboratorio  
de Biofísica y Neurociencias,  
CINVESTAV

## *Dedicatoria*

*El presente trabajo está dedicado a mis padres, que me han mostrado la manera de crecer y superarme como ser humano, forjando valores y carácter en mi vida para superar cualquier situación, su incesante trabajo que jamás esperó nada a cambio. Pese a la distancia, siempre me he sentido cobijado por su apoyo, y a donde quiera que vaya, ustedes siempre irán conmigo.*

## Agradecimientos

El sentimiento más fuerte en mí en estos momentos es la gratitud. Quiero agradecerles a todas las personas que hicieron posible el desarrollo y la culminación del presente trabajo.

A mis codirectores, Dra. Marcela Arteaga Silva y Dr. Julio César Rojas Castañeda, por otorgarme este proyecto y por todo lo aprendido, así como brindarme todo el equipo y material biológico y de laboratorio para el desarrollo del presente trabajo, y por ofrecerme un espacio en sus laboratorios.

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

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

A los Dres. Sergio Montes López, Ofelia Limón Morales, Pilar Durán Hernández y el Dr. Porfirio Gómora Arrati, por todas las valiosas observaciones y revisiones que hicieron para mejorar notablemente mi trabajo.

A la Dra. Edith Arenas Ríos, y a la Mtra. Verónica Cruz Taumori, por que pocas veces conozco a gente tan apasionada y tan comprometida con su trabajo y con tanta vocación. Gracias porque siempre que tuve una dificultad, conté con Ustedes.

A la Dra. Marcela Arteaga Silva por que, sin su extenuante e incesante apoyo hasta el último momento, yo no hubiera sido capaz de escribir estas líneas, su apoyo durante este trabajo sin duda es algo que me llevaré grabado por siempre, agradeciéndole infinitamente por esta oportunidad que me dio.

A mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron presentes para darme una mano siempre que lo necesité: Joel, Ofelia, Darla, Sergio,

Sherlyn e Ivis.

A mi familia. Gracias madre, por estar siempre que te necesito, porque eres un excelente ser humano y una mujer maravillosa, gracias por darme la vida y guiarme a través de ella.

A mis hermanos, que también son mis mejores amigos: Rubén y Vanessa, es difícil dejarse caer cuando se tienen hermanos tan cálidos y que tienen tanta confianza en uno.

Padre, gracias por tus consejos y por todas las discusiones que se dan en tu mesa sobre la vida, por el apoyo que me brindaste siempre que tuve dificultades de cualquier índole.

Abuelos, gracias por su apoyo moral. Ha pasado tiempo desde que no los veo, pero sin duda, todos los méritos que consiga en mi vida, llevarán la firma de ustedes.

A mi novia, Melina, te agradezco porque has estado conmigo en momentos complicados, y has disfrutado conmigo los buenos, tu apoyo moral sin duda fue el más presente de todos, y espero seguir contando contigo en mi vida para el futuro. Te amo.

A mis amigos de la maestría, quienes dejaron de ser simples compañeros desde hace tiempo, con quienes pasé gratos momentos y disfruté de amenas conversaciones, así como de apoyo moral en los momentos de incertidumbre: Enrique, Juan, Gina, Cintia, Alaín, Ricardo y Darla, pese a la distancia que nos separe, deseo conservarlos cerca de mi vida para el futuro.

A la vida misma, porque me sorprende cada día con las cosas que pone en mi camino, como si me retara con sus desafíos para luego recompensarme por mis logros, y eso me ha enseñado mucho, me ha hecho un mejor hombre.

## Contenido

<i>Resumen</i> .....	12
<i>Abstract</i> .....	14
1. Introducción .....	16
1.1 <i>Conducta sexual</i> .....	16
1.1.1 <i>Conducta sexual masculina de la rata macho</i> .....	17
1.1.2 <i>Conducta sexual masculina de la rata macho</i> .....	17
1.2 <i>Regulación hormonal de la conducta sexual masculina</i> .....	19
1.3 <i>Receptores para andrógenos y estrógenos en la conducta sexual masculina</i> .....	20
1.3.1 <i>Estructura y mecanismo de acción de los receptores para andrógenos</i> .....	22
1.3.2 <i>Estructura y mecanismo de acción de los receptores para estrógenos</i> .....	24
1.4 <i>Regulación neural de la conducta sexual masculina</i> .....	26
1.5 <i>Área preóptica medial y la conducta sexual masculina</i> .....	28
1.6 <i>Amígdala medial y la conducta sexual masculina</i> .....	29
1.7 <i>Características del plomo</i> .....	30
1.7.1 <i>Vías de absorción y almacenamiento</i> .....	31
1.8 <i>Efectos del plomo sobre la salud</i> .....	32
2. Antecedentes.....	34
2.1 <i>Desarrollo del área preóptica medial</i> .....	34
2.1.1 <i>Desarrollo de la amígdala medial</i> .....	35
2.2 <i>Exposición perinatal a plomo</i> .....	35
2.3 <i>Mecanismos de daño por plomo en células del SNC</i> .....	36
2.3 <i>Efectos del Plomo sobre la salud reproductiva masculina</i> .....	38
3. Justificación .....	39
4. Pregunta de investigación.....	39
5. Hipótesis.....	39
6. Objetivo General.....	40
6.1 <i>Objetivos particulares</i> .....	40
7. Metodología .....	40
7.1 <i>Registro de conducta sexual masculina</i> .....	41
7.2 <i>Determinación de plomo en sangre y tejido</i> .....	42
7.3 <i>Cuantificación de testosterona</i> .....	43
7.4 <i>Perfusión de los animales, procesamiento del tejido e inmunohistoquímica</i> .....	44
7.4.1 <i>Determinación morfométrica</i> .....	45
7.5 <i>Análisis estadístico</i> .....	46

8. Resultados.....	46
8.1 <i>Concentración de plomo en sangre y tejido en madres</i> .....	46
8.2 <i>Influencia del plomo en el peso corporal</i> .....	47
8.3 <i>Conducta sexual masculina</i> .....	48
8.4 <i>Concentración de plomo en sangre y tejido en machos</i> .....	50
8.5 <i>Cuantificación de testosterona</i> .....	53
8.6 <i>Inmunorreactividad y Densidad óptica de receptores para andrógenos y estrógenos <math>\alpha</math> y <math>\beta</math> en el área preóptica medial y la amígdala medial</i> .....	54
8.6.1 <i>Evaluación de la población neuronal</i> .....	64
9. Discusión .....	67
10. Conclusiones .....	75
11. Referencias.....	77

## Abreviaturas

Ácido gama aminobutírico, GABA  
Ácido  $\delta$ -aminolevulínico,  $\delta$ -ALA  
Amígdala medial, MeA  
Área preóptica medial, mPOA  
Calcio, Ca  
Conducta sexual masculina, CSM  
Dihidrotestosterona, DHT  
Dopamina, DA  
Error estándar de la media, ESM  
Estradiol, E2  
Hierro, Fe  
Hit rate (eficiencia copulatoria), HR  
Latencia de eyaculación, LE  
Latencia de intromisión, LI  
Latencia de monta, LM  
Magnesio, Mg  
Número de eyaculaciones, NE  
Número de intromisiones, NI  
Número de montas, NM  
Organización Mundial de la Salud, OMS  
Óxido Nítrico, NO  
Periodo post eyaculatorio o refractario, PR  
Plomo, Pb  
Receptor N-metil-D-aspartato, NMDA  
Receptores para andrógenos, RA  
Receptores para estrógenos alfa, RE $\alpha$   
Receptores para estrógenos beta, RE $\beta$   
Receptores para estrógenos, RE  
Sistema Nervioso Central, SNC  
Testosterona, T  
Transportador de cationes divalentes, DCT1  
Zinc, Zn

## Resumen

El plomo (Pb) es un metal pesado sin función conocida en la fisiología de los seres vivos. Es uno de los metales más utilizados, es fácil de obtener y puede fundirse con gran facilidad. Los compuestos de Pb más utilizados en la industria son los óxidos, el tetraetilo y los silicatos de Pb, además de formar aleaciones con muchos metales. Es un metal tóxico y la intoxicación por Pb se denomina saturnismo o plumbosis.

El Pb puede contaminar al agua potable a través de la corrosión de las tuberías y puede ser ingerido en los alimentos o a través del aire, pudiendo afectar a casi todos los órganos y sistemas en el cuerpo. Se distribuye por el organismo hasta alcanzar el cerebro, el hígado, los riñones y los huesos. Se deposita en dientes y huesos, donde se bioacumula. En mujeres embarazadas, el Pb es liberado hacia el torrente sanguíneo convirtiéndose en una fuente de exposición para el feto. El sistema nervioso central (SNC) es muy sensible al Pb, sobre todo en recién nacidos e infantes. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), no existen niveles de Pb que puedan considerarse seguros, pues incluso a bajas concentraciones es capaz de provocar daño en el SNC, provocando muerte neuronal. Además, es capaz de disminuir las concentraciones plasmáticas de testosterona (T) y estradiol (E2), que ejercen su acción a través de los receptores para andrógenos (RA) y estrógenos alfa y beta (RE $\alpha$ , RE $\beta$ ) respectivamente, por lo que es capaz de alterar la conducta sexual masculina (CSM). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la exposición perinatal a este metal sobre la CSM, las concentraciones de T en suero, concentraciones de Pb en sangre y en tejidos, así como evaluar la inmunorreactividad de los RA, RE $\alpha$  y RE $\beta$  en el área preóptica medial (mPOA) y la amígdala medial (MeA), regiones cerebrales críticas en la ejecución de la CSM en ratas macho adultas.

Para ello, ratas Wistar macho fueron expuestas desde el inicio de la gestación (*in útero*) hasta el día 21 postnatal (destete) a una solución de acetato de Pb en una concentración de 320 ppm (0.2%) por vía oral. A los 120 días de edad se les realizaron las pruebas de CSM para evaluar la ejecución sexual. Posteriormente, las ratas se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron muestras de suero

sanguíneo para cuantificar la T por medio de la técnica de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), muestras de sangre y tejido nervioso: hipotálamo, amígdala medial, corteza prefrontal, bulbo olfatorio e hipocampo para cuantificar Pb mediante espectrofotometría de absorción atómica. Por otra parte, en otros grupos de animales se obtuvieron muestras de sangre para medir la concentración de Pb y se extrajeron los cerebros de las ratas tratadas con Pb y del grupo control para evaluar, por medio de la técnica de inmunohistoquímica por flotación, la inmunorreactividad para los RA y RE $\alpha$ ,  $\beta$  en el área preóptica medial (mPOA) y la amígdala medial (MeA), estructuras neurales que regulan la conducta sexual.

Los resultados obtenidos mostraron que el Pb perinatal afectó varios parámetros de la CSM en las ratas que fueron tratadas perinatalmente con Pb, observándose un aumento en el número de montas (NM), número de intromisiones (NI), en las latencias de monta (LM), de intromisión (LI), la latencia de eyaculación (LE) y, periodo refractario (PR), así como en el Hit rate (HR). Los resultados obtenidos muestran que el Pb es un metal tóxico capaz de disminuir la eficiencia copulatoria en ratas macho. Observamos también bioacumulación del Pb a los 120 días de edad en hipotálamo, MeA, corteza prefrontal, hipocampo y bulbo olfatorio. Además, se registraron diferencias significativas en la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de RA y RE RE $\alpha$ ,  $\beta$  entre los animales tratados con Pb y el grupo control, tanto en mPOA como en MeA, siendo menor en los individuos expuestos perinatalmente a Pb. De igual manera, al realizar la tinción de Nissl se encontró un menor número de neuronas en ambas regiones en el grupo tratado con Pb. Estos resultados sugieren que la exposición perinatal a Pb afecta la CSM, la concentración de T y el número de neuronas con receptores para andrógenos y estrógenos en el mPOA y la MeA de la rata macho adulta.

## Abstract

Lead (Pb) is a heavy metal with no known function in the physiology of living beings. It is one of the best known metals since ancient times and therefore one of the most used, it is easy to obtain and melts with great ease. The most commonly used Pb compounds in the industry are the oxides, the tetraethyl, and Pb silicates, besides forming alloys with many metals. It is a toxic metal and Pb poisoning is called lead poisoning or plumbosis.

Pb can contaminate drinking water through the corrosion of the pipes and can be ingested in food or through the air. Its effects are the same in that they are swallowed or inhaled, being able to affect all the organs and systems in the body. It is distributed throughout the body until reaching the brain, liver, kidney and the bones. It is deposited in teeth and bones, where it bioaccumulates. In pregnant women, Pb is released into the bloodstream becoming a source of exposure for the fetus. The Central Nervous System (CNS) is very sensitive to Pb, especially in newborns and infants. According to the World Health Organization (WHO) there are no levels of Pb that can be considered safe, because even at low concentrations it is able of causing damages in the CNS, causing neuronal death. Also, it is able to decrease the plasma concentrations of testosterone (T) and estradiol (E2), which exert their action through the receptors for androgens (RA) estrogen alpha and beta (RE $\alpha$ , Re $\beta$ ) respectively, so it is capable of altering male sexual behavior (MSB). Therefore, the main objective was to evaluate the effects of perinatal exposure to this metal on MSB, serum T concentrations, Pb concentrations in blood and tissues as well to evaluate the immunoreactivity of RA, RE $\alpha$  and Re $\beta$  in the medial preoptic media (mPOA) and the medial amygdala (MeA), critical brain regions in the execution of the MSB in adult male rats.

To do this, male Wistar rats were exposed from the beginning of gestation (in uterus) to day postnatal (weaning) to a solution of Pb acetate at a concentration of 320 ppm (0.2%) orally in drinking water. At 120 days of age, MSB tests were made to evaluate sexual performance. Subsequently, the rats were sacrificed by decapitation and samples of blood serum were obtained to quantify the T by means of the ELISA technique (enzyme-linked immunosorbent assay), blood samples and nervous tissue: hypothalamus, medial tonsil, prefrontal cortex,

Olfactory bulb and hippocampus to quantify Pb by atomic absorption spectrophotometry. On the other hand, in other group of animals blood samples were obtained to measure the Pb concentration and the brains were extracted from the Pb treated rats and the control group to evaluate, by means of the immunohistochemistry technique by flotation, the immunoreactivity for RA and RE $\alpha$ ,  $\beta$  in the medial preoptic area (mPOA) and the medial amygdala (MeA), neural structures that regulate sexual behavior.

The results obtained showed that the Pb affected several parameters of the CSM in the rats that were treated perinatally with Pb, observing an increase in the number of mounts (NM), number of intromissions (NI), in the latencies of mounts (LM), of intromission (LI), the ejaculation latency (LE), refractory period (PR), as well as in the Hit rate (HR). The results obtained show that Pb is a toxic metal capable of reducing copulatory efficiency in male rats. We also observed bioaccumulation of Pb at 120 days of age in the hypothalamus, MeA, prefrontal cortex, hippocampus and olfactory bulb. In addition, a decrease in the quantification of the immunohistochemical expression of RA and RE RE $\alpha$ ,  $\beta$  in both mPOA and MeA was found in the group with Pb. Similarly, when Nissl staining was performed, a smaller number of neurons were found in both regions in the group treated with Pb. These results suggest that the perinatal exposure to Pb affects the MSB, the concentration of T and the number of neurons with androgen and estrogen receptors in the mPOA and the MeA of the adult male rat.

## 1. Introducción

Desde hace décadas se ha reportado a los metales pesados como contaminantes ambientales muy tóxicos a los que estamos expuestos de diversas formas. Uno de los más relevantes es el plomo (Pb), del cual hasta el momento no se le ha encontrado una función fisiológica conocida (Ascione, 2001). Este metal proviene principalmente de actividades antropogénicas como la minería y la manufactura industrial y se le considera un contaminante ambiental, pues puede encontrarse en el agua, el aire y en el polvo del suelo ya que es utilizado en la elaboración de diversos productos de uso común como pinturas, cosméticos, baterías, tintes para cabello, juguetes, latas para envasar alimentos con soldadura de plomo, envolturas de dulces, insecticidas, alfarería, tuberías de agua potable, entre otros (Garza y cols., 2006; White y cols., 2007). Este metal es capaz de afectar la salud en diversos niveles, pues afecta una gran cantidad de tejidos y órganos, entre ellos el cerebro (Mielke, 1999), afectando la conducta reproductiva de los individuos, así como las concentraciones de testosterona (Biwsas y Ghosh, 2004; Mokthari y Zamboore, 2011) y, por lo tanto, su capacidad para reproducirse. Además, se conoce que el Pb es capaz de bioacumularse en los organismos (OMS, 2018), lo que le permite intoxicar a los individuos en desarrollo a través de la exposición materna (Ronis y cols., 1996; Sant'Ana, 2001; Villeda-Hernández et al. 2006; Pillai y cols., 2012).

### *1.1 Conducta sexual*

La conducta sexual es un preámbulo para la reproducción de muchas especies incluyendo al humano, pues en esta se muestra un interés reproductivo que permite llevar a cabo la cópula. Algunos autores la definen como una serie de comportamientos que tienen como función biológica la reproducción de un individuo de cualquier especie con reproducción sexual (Hernández-González y cols., 2002; Ágmo, 2010). Para que esta conducta inicie en la vida de un ser vivo, este requiere alcanzar la pubertad, que marca el inicio de la madurez sexual, la

cual conlleva un conjunto de modificaciones neuroendócrinas, fisiológicas, morfológicas y conductuales los cuales son regulados por el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-gónada, pues de la correcta funcionalidad de este, dependen aspectos críticos para la reproducción (Meisel y Sachs, 1994; Hull y cols., 2006).

### *1.1.2 Conducta sexual masculina de la rata macho*

Los estudios sobre la conducta sexual masculina (CSM) de la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) han sido útiles para realizar aproximaciones experimentales y conocer más sobre sus bases biológicas, neurales, hormonales y anatómicas. Esto debido a que en general, los roedores comparten muchas de las bases fisiológicas de los mamíferos en general, su tamaño permite mantener a los individuos experimentales en condiciones de laboratorio a bajo costo, y su sistema neuroendocrino se asemeja mucho al del humano, además de presentar un comportamiento copulatorio oportunista, es decir, pueden copular bajo diferentes condiciones (Pfaus y cols., 2003). En el caso de la conducta sexual de los roedores suelen describirse tres etapas (Figura 1). La primera es precopulatoria o incentiva, donde el macho busca y persigue a la hembra, la explora del área anogenital, y se emiten vocalizaciones ultrasónicas (Matochik y Barfield 1994). La segunda etapa se denomina copulatoria, donde el macho ejecuta patrones motores típicos del apareamiento de mamíferos. Estas conductas se pueden clasificar en monta, donde el macho se coloca sobre la grupa de la hembra desde atrás hacia adelante acercando su pelvis a la grupa de la hembra, pero sin lograr la penetración. La conducta de intromisión, donde puede observarse un movimiento pélvico más marcado por parte del macho, logrando la penetración, lo cual se acompaña de una lordosis por parte de la hembra mucho más marcada que en la monta, así como posibles acicalamientos el área genital. Después de varias montas e intromisiones, finalmente se lleva a cabo la eyaculación, que se caracteriza por un desmonte a la hembra más tardado, el macho se queda inmóvil un par de segundos y viene acompañado de la tercer etapa denominada periodo refractario o post eyaculatorio, donde dejará de tener interés por la hembra por algunos minutos (absoluto) o en su defecto,

recobrar el interés si se coloca un nuevo estímulo como una hembra diferente (relativo) (Dewsbury, 1979; Ågmo, 1999; Pfaff y Ågmo, 2002).

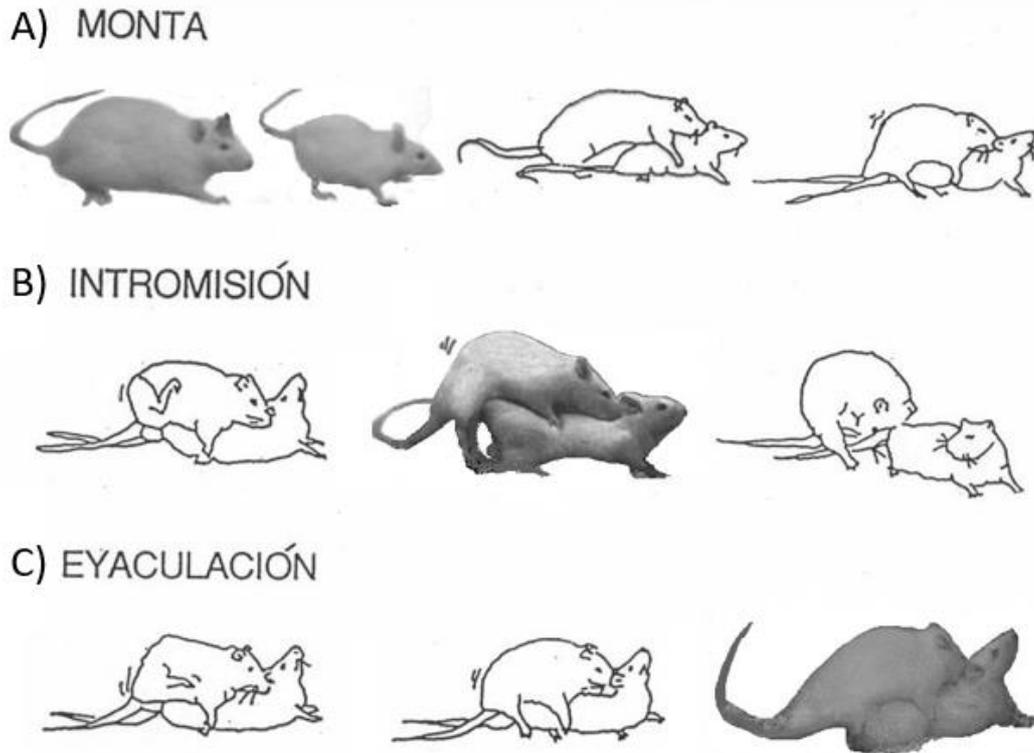


Figura 1. Parámetros copulatorios en la rata macho. A) en la monta, el macho se coloca por detrás de la hembra intentando penetrarla, pero sin conseguirlo. B) durante la intromisión, el macho realiza movimientos pélvicos más bruscos y fuertes, consiguiendo penetrarla en repetidas ocasiones, hasta expulsar el semen durante la eyaculación (C).

Otros investigadores describen la conducta sexual en la rata macho con más detalle y la dividen solamente en dos fases. La primera fase es la motivacional, que se refiere a los aspectos previos a la cópula que permiten al macho acercarse a la hembra y despertar su interés reproductivo, entre los que se pueden mencionar el olfateo, la exploración anogenital, la persecución de la hembra, la emisión de vocalizaciones audibles o ultrasónicas y el acicalamiento. Si estas conductas son las adecuadas, la hembra dará su aceptación para que ocurra el apareamiento. Esto conforma la segunda fase, también conocida como fase ejecutoria, o simplemente cópula. En esta fase se encuentran involucradas conductas como la monta, intromisión y la eyaculación (Dewsbury, 1979; Ågmo,

1999; Hernández-González et al., 2002; Pfaff y Agmo, 2002, modificado de Mendoza-Mendoza, 2012). Dichas etapas son reguladas e inducidas por la acción de hormonas gonadales como testosterona (T), estradiol (E2) y dihidrotestosterona (DHT) sobre estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC) y órganos del aparato reproductor.

### *1.2 Regulación hormonal de la conducta sexual masculina*

La conducta sexual en los mamíferos les permite identificar una pareja idónea para la cópula, y los comportamientos femeninos o masculinos dependen de la organización anatómica y fisiológica dada desde el desarrollo prenatal, así como de la activación y regulación por medio del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Las neuronas liberadoras de gonadotropinas en el hipotálamo desempeñan un papel central en este eje mediante la producción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que se une a un receptor de membrana en las células gonadotrofas adenohipofisarias y estimula la biosíntesis y secreción de la hormona folículoestimulante (FSH) así como de la hormona luteinizante (LH). Posteriormente, FSH y LH son los reguladores hormonales esenciales de las funciones testiculares, que actúan a través de sus receptores en las células de Sertoli y Leydig, respectivamente (Kaprra y Huhtaniemi, 2017). Las células de Leydig son las encargadas de sintetizar T, hormona que junto a sus metabolitos: dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (E2) resultan críticos para el comportamiento masculino (Beyer y cols., 1976). El aumento en la producción de T en la pubertad es esencial para la actividad sexual de machos, a estos efectos estimulantes de la T sobre el comportamiento sexual de los machos adultos se denominan efectos de activación, para distinguirlos de los efectos organizacionales de la T durante la diferenciación sexual. Si la fuente de T es eliminada por castración quirúrgica el deseo sexual y la actividad sexual generalmente declina. Sin embargo, la importancia de los esteroides gonadales en el comportamiento sexual masculino varía entre especies (Herbison, 2015). Tanto la T, la DHT como el E2 viajan por el torrente sanguíneo acompañados de albúmina o la globulina transportadora de esteroides sexuales (SHBG) (Siiteri y cols., 1982; Rosner y cols., 1992) hacia diversos tejidos donde serán reconocidas por los RA para las dos primeras hormonas (Davey y Grossmann,

2016), y por el RE para el E2 (Hewitt y Korach, 2002; Fernández-Guasti y cols., 2010). Cuando sus concentraciones sean elevadas, generará retroalimentación a nivel de hipotálamo para disminuir la liberación de GnRH, y por lo tanto que la hipófisis disminuya la secreción de la LH, disminuyendo la biosíntesis de T, así como de sus metabolitos DHT o E2 (Vadakkadath y Atwood, 2005; Craig y Mark, 2015).

### *1.3 Receptores para andrógenos y estrógenos en la conducta sexual masculina*

Diversos estudios han demostrado que para que moléculas como las hormonas sexuales puedan ejercer sus efectos sobre las células, deben ser reconocidas por proteínas específicas autorreguladas ubicadas en el citoplasma (y en membrana) denominadas receptores. Estos receptores tienen afinidad específica por una molécula y son capaces de reconocerlas para desencadenar una cascada de señalizaciones que influyen en la fisiología y conducta de los organismos. Los receptores principalmente implicados en la CSM son los RA y RE. Los andrógenos son las hormonas sexuales necesarias para el desarrollo de caracteres sexuales masculinos (MacLean y cols., 1993), así como para la CSM (Ågmo, 1999). Uno de los más comunes es la T, la cual por medio de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa se convierte en DHT, un andrógeno más activo, o bien, mediante la enzima aromatasa se convierte en estradiol (E2). La T y la DHT median sus efectos a través de los receptores para andrógenos (RA), los cuales son factores de transcripción dependientes de ligando, aunque también se conoce que tienen funciones adicionales que son independientes al DNA (Heinlein y Chang, 2002). El gen que codifica para el RA, ubicado en el cromosoma X es expresado en diversos tejidos y, se sabe que tiene acciones biológicas en huesos, músculos, próstata, tejido adiposo, sistemas cardiovascular, inmune, neural, hematopoyético y en la reproducción (Davey y Grossmann, 2016). Por su parte, los estrógenos son hormonas sexuales necesarias para el desarrollo de caracteres femeninos, así como para el despliegue de la conducta sexual masculina y femenina (Beyer y cols., 1976). Los estrógenos son reconocidos por los RE, los cuales se presentan en dos isoformas, la  $\alpha$  y  $\beta$ , ambos son factores de transcripción que también promueven

la ejecución de la CSM. Estos receptores son transcritos de diferentes genes, el ESR1 en el cromosoma 6 y el ESR2 en el cromosoma 14, respectivamente (Greene y cols., 1986; Mosselman y cols., 1996), ambos son necesarios para el despliegue de la CSM. El RE $\alpha$  se ha implicado como el principal encargado de la regulación de la CSM, demostrándose que en ratones en los que se eliminó el gen que codifica para los RE $\alpha$ , la ausencia de este receptor suprime la CSM y afecta a las conductas copulatorias (Wersinger y Rissman, 2000; Domínguez-Salazar y cols., 2004; Portillo y cols., 2006). Además, la inhibición de la aromatasa da como resultado una pérdida de apareamiento. En ratas *knock-out* que carecen de la aromatasa presentan deficiencias significativas en la CSM (Honda y cols., 1998).

Mientras que el gen para el RE $\beta$  se vincula con la defeminización, y se ha observado que al suprimirlo se provoca un retraso en el inicio de las eyaculaciones de los machos peri puberales (Sato y cols., 2004; Kudwa y cols., 2006). En ratones, algunos machos que no se aparean son denominados no copuladores, y se ha sugerido que diferencias en la expresión en los RA y RE en áreas específicas del cerebro, como el mPOA, asociada con estas alteraciones en la conducta sexual, pues se conoce que ambos receptores son necesarios para la masculinización cerebral prenatal (Sato y cols., 2004). Por lo tanto, la expresión de estos receptores de esteroides sexuales es requerida para mediar los efectos de las hormonas gonadales, y la expresión de los receptores para ambas hormonas depende de las concentraciones de hormonas circulantes (Brock y De Mees, 2015). Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en estructuras cerebrales que están implicadas en la modulación de la ejecución y motivación sexual (Garza y cols., 2006). Las estructuras encefálicas en las que predominan las concentraciones de RA y RE son principalmente áreas límbicas relacionadas con el control neural de la CSM, como son el mPOA, el septo lateral (LS), el núcleo de la cama de la estría terminalis (BSNT), el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH), MeA y el núcleo arqueado (Arc) (Romano y cols., 2007) e incluso existen estudios que sugieren que los RE y RA pueden encontrarse en las mismas neuronas de estas estructuras cerebrales (Enmark y Gustafsson, 2001). La relación entre las neuronas en estas regiones con gran cantidad de receptores para estos

esteroides y la CSM surge de la coexpresión y la activación directa por estos, aumentando la activación neuronal por el comportamiento sexual (establecido por la expresión de la proteína c-fos) expresando RA, así como RE $\alpha$  y  $\beta$  (Greco y cols., 1998). Se conoce que los andrógenos promueven la sexualidad masculina, a través de su aromatización a estrógenos que actúan principalmente sobre los RE $\alpha$  (Lephart, 1996; Phillips-Farfán y cols., 2007).

### *1.3.1 Estructura y mecanismo de acción de los receptores para andrógenos*

El RA es una cadena de 919 aminoácidos que posee principalmente 3 dominios funcionales: el dominio de regulación transcripcional N-terminal, el dominio de unión al DNA (por sus siglas en inglés DBD) y el dominio de unión del ligando (MacLean y cols., 1997). El dominio N-terminal es el más variable, mientras que el DBD es la región más conservada entre los diferentes miembros de la familia de receptores nucleares de las hormonas esteroideas (Heinlein y cols., 2002). Los DBD de todos los receptores nucleares de hormonas esteroideas consisten en dos dedos de zinc que reconocen secuencias de DNA específico, facilitando la unión del RA al promotor y a regiones potenciadoras de genes regulados por el RA, lo que permite la activación de los dominios de unión N-terminal y dominios de unión al ligando para estimular o reprimir la transcripción de esos genes (Schoenmakers y cols., 2000). El DBD está unido al dominio de unión del ligando mediante una región bisagra, estos dominios de unión al ligando regulan la interacción entre el RA, proteínas de choque térmico y las proteínas chaperonas, mientras que también interactúa con el N-terminal del RA para estabilizar los andrógenos ligados. Dentro de los RA hay una serie de secuencias señal, y se conocen dos funciones de activación transcripcional: el AF-1 independiente de ligando, ubicado en el dominio N-terminal requerido para la actividad máxima del AR, y el AF-2 dependiente de ligando, ubicado en el dominio de unión del ligando que es importante para formar el sitio de unión corregulador así como mediador de interacciones directas entre el N-terminal y dominios de unión a ligando (interacciones N / C) (Wilson, 2011) (Figura 2).

La señal de localización nuclear (NLS) es responsable de la unión del receptor al núcleo, posteriormente es necesaria otra señal, que permite que se separe del núcleo, el RA denominada señal de exportación nuclear (NES), es responsable

de exportar el RA al citoplasma tras la retirada del ligando, que se encuentran entre el DBD, la región bisagra y en el dominio de unión del ligando. Hay dos distintos mecanismos de acción dependientes de ligando en los RA, el dependiente o independiente de la unión al DNA (Schoenmakers y cols., 2000) (Figura 2).

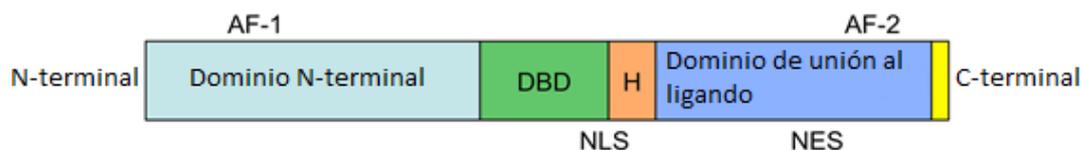


Figura 2. Estructura del RA, donde se observan los tres principales dominios, la región bisagra, así como las funciones de acción transcripcional (Modificado de Davey y Grossmann, 2016).

En ausencia de andrógenos, el RA se ubica en el citoplasma, asociado a proteínas de choque térmico y a chaperonas. Al reconocer a los andrógenos, se genera un cambio conformacional, liberando las proteínas chaperonas y exponiendo su NLS, luego el complejo RA-andrógenos trasloca hacia el núcleo, donde se dimeriza y se une a los elementos con respuesta a andrógenos junto a los genes diana para promover la transcripción génica (Eder y cols., 2001). La transcripción está regulada por proteínas específicas llamadas corre reguladores, y estos se unen al RA activado para promover o reprimir la transcripción del gen diana a través de la remodelación de la cromatina y las modificaciones de histonas, así como participar en la utilización de la maquinaria transcripcional basal (Van de Wijngaart y cols., 2012; Davey y Grossmann, 2016).

La transcripción no dependiente de unión al DNA se conoce también como “no canónica” o membranar, pues se basa en la activación de segundos mensajeros, incluyendo las vías ERK, Akt y MAPK que han sido identificadas en algunos linajes celulares (Kang y cols., 2004). Los efectos por estas vías ocurren entre segundos y minutos del suministro para manifestarse, y los cuales se sugiere que se asocian principalmente a bajas concentraciones de andrógenos (Lamont y Tindall, 2011), (Figura 3).

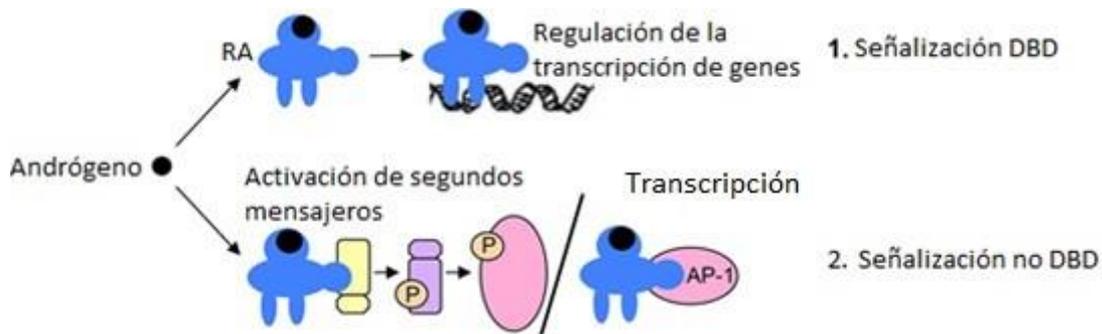


Figura 3. Mecanismo de acción de los RA dependientes de ligando.

1. Dependiente de unión al DNA (DBD)

2. No dependiente de unión al DNA. AP-1 (proteína activadora 1) (Modificado de Rana y cols., 2014).

### 1.3.2 Estructura y mecanismo de acción de los receptores para estrógenos

Tanto los RE $\alpha$  como los RE $\beta$ , comparten una estructura similar (Figura 4), difiriendo en la secuencia y número de aminoácidos 599 y 530, respectivamente, ambos poseen un dominio níquel-zinc (Dominio C) que se une con especificidad a los elementos con respuesta a estrógenos de los genes diana, un dominio de unión al ligando (LBD, dominio E), que se une al E2, así como otros ligandos estrogénicos. El elemento con respuesta a estrógenos es una secuencia de repetición invertida de 13 pares de bases (GGTCAnnnTGACC), y los estudios de unión de DNA *in vitro* han indicado que el RE se une como un dímero (Glass, 1994), con una molécula de RE en contacto con cada 5 repeticiones invertidas de pares de bases. Aunque la unión al DNA es un estímulo de dimerización, las secuencias en el LBD también están implicadas en la dimerización, y como un dímero en presencia de ligando (Hewitt y Korach, 2002).

También se conoce que las regiones en el extremo amino terminal (AF-1) y dentro del LBD (AF-2) promueven la activación de la transcripción independiente del ligando (AF-1) y dependiente del ligando (AF-2), como delección o introducción de mutaciones en estas regiones que reduce la capacidad para inducir genes que responden a estrógenos (Parker, 1995). El mecanismo de transcripción mediado por RE se sugiere que es a través de la interacción de AF



activación independiente de ligando por comunicación cruzada con vías de señalización de factores de crecimiento. Una vez activado, el RE dimerizado recluta coactivadores y unirse a elementos con respuesta a estrógenos en los genes diana para promover la transcripción (mecanismo canónico). Alternativamente, el RE puede reclutar coactivadores para formar un complejo AP-1 o quitar represores para el mismo (mecanismo regulado por AP-1). Finalmente, el RE puede interactuar con promotores contenidos en secuencias de unión SP1 y sitios con media respuesta a estrógenos SP1(N)<sub>x</sub>ERE (1/2) (Modificado de Hewitt y Korach, 2002).

El RE puede regular la expresión génica de genes que no tienen elementos de respuesta a estrógenos, se sabe que uno de los mecanismos para la regulación de RE es mediante genes que contienen elementos AP-1, los cuales se unen al dímero fos/jun, que recluta a RE $\alpha$  y coactivadores. Además, RE también puede reclutar represores para el sitio de transcripción fos/jun, lo que resulta en la activación a través de AP-1. Esta actividad alternativa de los RE agrega complejidad a las acciones y roles del estrógeno. La regulación de los estrógenos también se observa en genes tales como c-FOS y TGF $\alpha$ , que carecen de una secuencia de elementos con respuesta a estrógenos completa (Kushnner y cols., 2000).

Estos receptores tienen efectos importantes desde el desarrollo, la pubertad y la madurez sexual. Además, se sabe que las alteraciones en su regulación, en tejidos periféricos, conllevan al desarrollo de patologías como la hiperplasia y cáncer de próstata (Haelens y cols., 2007). Además, ambos receptores juegan un papel importante en el comportamiento sexual (Hewitt y Korach, 2002, Yeh y cols., 2009). Se ha demostrado en ratones en los que se eliminó el gen que codifica para los RE, tanto en  $\alpha$  o  $\beta$ , hay supresión de la CSM afectando a las conductas copulatorias (Portillo y cols., 2006).

#### *1.4 Regulación neural de la conducta sexual masculina*

Diversas investigaciones se han realizado para comprender la participación del SNC en la conducta sexual masculina, y se conoce que hay varias estructuras encefálicas involucradas en esta conducta. El sistema vomeronasal y el bulbo olfatorio (BO) son de las primeras entradas sensoriales más importantes para la motivación sexual, (al removerse se anulan la cópula y las erecciones sin contacto) pues permiten la entrada de estímulos químicos como feromonas, y

viajan hasta la amígdala medial (MeA) que juega un papel crítico en los eventos emocionales representados por un refuerzo positivos (See y cols., 2003), junto con entradas somatosensoriales de los genitales, relevados por la porción parvocelular del núcleo subparafasicular, que forma parte de un circuito de eyaculación en muchas especies. La MeA también tiene un rol muy importante, pues envía la información hacia el núcleo de la cama de la stria terminalis (BNST), además de enviar la información procesada hacia el área preóptica medial (mPOA), que juega un rol importante en la regulación de la motivación sexual y el rendimiento copulatorio en machos (Figura 6). Se ha observado que las lesiones del mPOA afectan severamente la cópula en todos los machos de especies de vertebrados (Hull y cols., 2006) y disminuye la preferencia por hembras en estro (Paredes y cols., 1998). Algunas neuronas del mPOA en ratas machos aumentan su activación solo durante la aproximación femenina precopulatoria, mientras que otras aumentan la activación solo durante la cópula y ésta actúa como un centro integrador de varias vías aferentes, comunicando hacia el área ventral tegmental (relacionado al sistema de recompensa) y al tallo cerebral que posteriormente enviará esta información a la espina dorsal para llevar a cabo la respuesta motora de la conducta sexual, participando en las respuestas de erección y eyaculación, siendo que estos eventos son mecanismos reflejos (Hull y cols., 2006). La corteza prefrontal participa en la capacidad de tomar decisiones basadas en el estímulo y su respuesta y el núcleo accumbens sintetizando dopamina promueve que estos estímulos refuercen la conducta sexual.

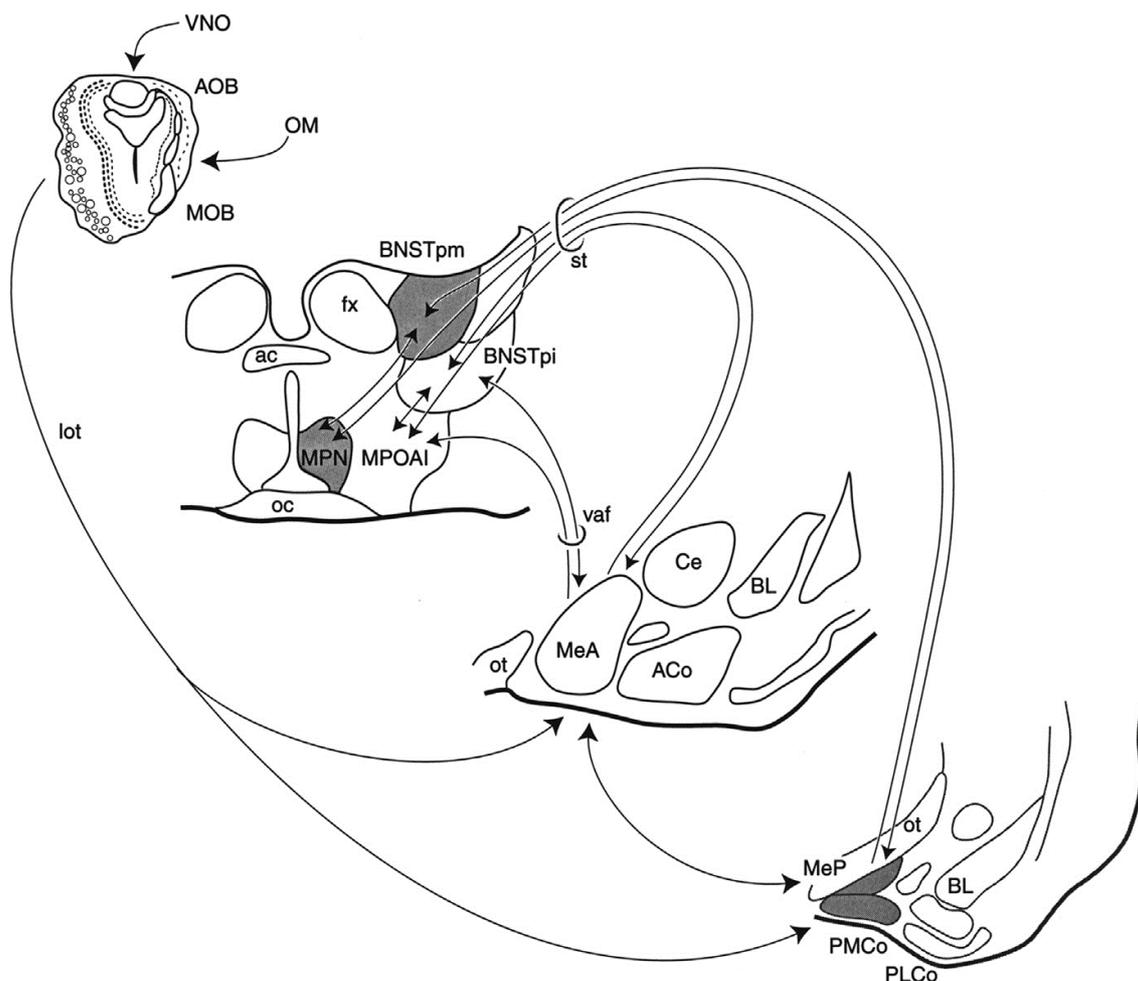


Figura 6. Regulación neural de la conducta sexual masculina. Los estímulos olfativos son reconocidos por el bulbo olfatorio-bulbo olfatorio accesorio (AoB) y viajan a través del tracto olfatorio lateral para procesarse en el núcleo medial de la amígdala (MeA) y el núcleo de la cama de la *stria terminalis* (BNST); finalmente, estos estímulos quimio-sensoriales serán procesados en el núcleo preóptico medial (MPN) del área preóptica medial del hipotálamo (mPOA) (Modificado de Hull y Domínguez, 2015).

### 1.5 Área preóptica medial y la conducta sexual masculina

Como se mencionó anteriormente, la estructura hipotalámica ventricular conocida como mPOA es posiblemente la región más crítica y una región esencial para la CSM. Estudios realizados en la rata macho sugieren que el mPOA se encuentra involucrada en la regulación de la CSM, ya que lesiones del mPOA en la rata macho, reduce la conducta sexual masculina (Portillo y cols., 2003; Hurtazo y cols., 2008). Esta región del hipotálamo contiene RA y RE con isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , los RA se encargan de mediar los efectos de la T y la DHT, teniendo mayor afinidad por esta última (Amado y Flórez, 2003) Ambos receptores juegan un papel importante en el comportamiento sexual (Hewitt y

Korach, 2002, Yeh y cols., 2009). Estos receptores tienen efectos importantes desde el desarrollo, la pubertad y la madurez sexual. Además, se sabe que las alteraciones en su regulación, en tejidos periféricos, conllevan al desarrollo de patologías como la hiperplasia y cáncer de próstata (Haelens y cols., 2007).

Se ha demostrado en ratones en los que se eliminó el gen que codifica para los RE, tanto en  $\alpha$  o  $\beta$ , hay supresión de la CSM afectando a las conductas copulatorias (Portillo y cols., 2006). En ratas, el bloqueo de los RA en el MPOA y el VMH inhibe eficazmente el comportamiento sexual en machos no castrados (Harding y McGinnis, 2004). Everitt (1990) sugirió que el mPOA es importante sólo para la cópula, y no para la motivación sexual. Sin embargo, otros autores encontraron que las lesiones en el mPOA afectan la motivación sexual en varios contextos, incluyendo la prueba de preferencia por una compañera hembra y la búsqueda por una hembra (Paredes y cols., 1998). De manera inversa, la estimulación del mPOA facilita la cópula, pero no provoca la monta en machos sexualmente saciados (Hull et al, 2006). El mPOA es el sitio más efectivo para la estimulación hormonal en ratas castradas; de cualquier forma, los implantes de T o de E2 facilitan, pero no restablecen completamente la cópula, y los implantes de DHT no son efectivos para restituir la cópula (Hull y cols., 2006). Por lo tanto, tanto los RE como los RA en el mPOA contribuyen en la capacidad para copular en ratas macho.

Los diversos estudios sobre la influencia del mPOA en la conducta sexual de los machos de varias especies de mamíferos y aves sugieren que la T y/o el E2 actúan en las neuronas del mPOA para aumentar la motivación y respuestas sexuales consumatorias, las acciones de T y E2 pueden tener mecanismos separados unos de otros, pero ambos son necesarios para tener éxito en la ejecución de esta conducta (Pfaff y Baum, 2018).

### *1.6 Amígdala medial y la conducta sexual masculina*

La MeA es una estructura encefálica implicada en el procesamiento de emociones y comportamientos (Cádiz y cols., 2016) conformada por un grupo de núcleos localizados en la porción medial del lóbulo temporal (Berranoch, 2015). Forma conexiones con diversas estructuras que incluyen la corteza, el cuerpo

estriado, algunos núcleos talámicos e hipotalámicos, así como varias estructuras cerebrales basales y núcleos del tallo cerebral (Pape y Pare, 2010). Se ha reportado que la activación de la amígdala se relaciona con la excitación sexual (Karama y cols., 2002; Ferretti y cols., 2005; Sundaram y cols., 2010; Stoleru y cols., 2012). Se conoce que el daño en la MeA y su interacción con el bulbo olfatorio puede disminuir el reconocimiento de las feromonas, pues se ha observado que en ratas lesionadas en esta estructura no aumentan su conducta sexual a pesar de haber estado en contacto visual y olfativo con hembras receptoras, también se aumentan las latencias de monta y de eyaculación, afectando la conducta sexual (De Jonge y cols., 1992).

Circuito sexual masculino

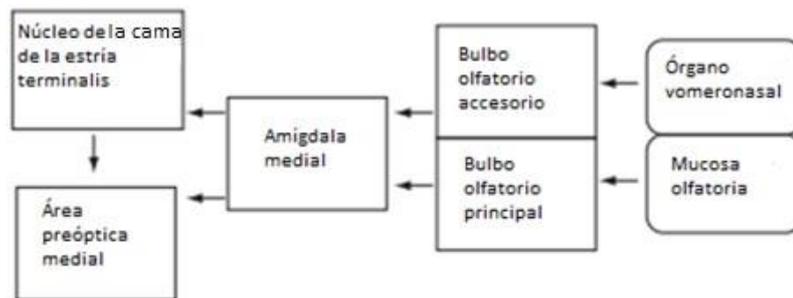


Figura 7. Estructuras relevantes en el circuito de la conducta sexual masculina. La información quimio-sensorial involucra la participación de los bulbos olfatorios principales y accesorios, enviando esta información hasta la amígdala medial, y luego a hacia el núcleo de la cama de la *stria terminalis* y a través de la vía amigdalofugal ventral hacia el área preóptica medial. Una vez que llega al área preóptica medial el macho decidirá montar a la hembra (Modificado de Crews, 2010).

### 1.7 Características del plomo

El Pb se presenta abundantemente en la corteza terrestre (0.002%), es de color gris- azulado, y es uno de los metales más utilizados a lo largo de la historia de la humanidad por ser un metal dúctil, maleable y por su abundancia. Es principalmente encontrado en minerales como la galena (PbS), la cerusita (PbCO<sub>3</sub>) o la anglesita (PbSO<sub>4</sub>). Cuenta con un punto de fusión de 327.5°C, densidad de 11.4 g /mL, número atómico de 82, masa atómica de 207 g/mg y

valencias 2 y 4. Presenta un radio iónico relativamente grande (1.2Å) y una electronegatividad de 2.33 (en la escala de Pauling), en comparación con el calcio (Ca), (0.99 Å, 1, respectivamente), lo cual favorece su interacción con los grupos coordinantes de las proteínas, con lo cual es capaz de sustituir al Ca así como otros cationes divalentes como el hierro (Fe) y el zinc (Zn) en diversos procesos fisiológicos (Godwin, 2001). En México, la producción anual de Pb es de unas 225, 472 toneladas al año, tan solo en la Ciudad de México se estima que unas 15,000 toneladas han sido liberadas al ambiente debido a la combustión de gasolina con Pb, lo cual prevaleció hasta el año 1990, cuando comenzó a venderse gasolina sin Pb (Rodríguez Pimentel y cols., 2005).

#### *1.7.1 Vías de absorción y almacenamiento*

El ser humano puede estar expuesto a este metal de forma ocupacional. Las poblaciones cercanas a la industria relacionadas con plomo pueden verse afectadas por la contaminación de alimentos, agua, aire y el suelo o bien exponerse al Pb por sus actividades laborales. La exposición a Pb en bajas concentraciones es difícil de detectar, sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), este contaminante no posee una concentración umbral para ejercer efectos adversos, pues se conoce que incluso con concentraciones permitidas, puede afectar parámetros como el intelecto (Canfield y cols., 2003, OMS, 2018).

La absorción del Pb será mayor si la dieta de los individuos es pobre en Ca, Fe y Zn (Toscano y Guilarte, 2005) pues se conoce que este metal compite con cationes divalentes con facilidad, sustituyéndolos al tener una mayor afinidad con las moléculas debido a un radio iónico similar, así como una electronegatividad considerablemente mayor. Sin embargo, al ser distinta su configuración electrónica, su asociación molecular difiere espacialmente con respecto a la del Ca y la del Zn, donde la distribución de cargas se da de forma esférica alrededor del ion, en el caso del Pb se presenta una distribución irregular debido a un par inerte de electrones en uno de sus orbitales, alterando la estructura y el funcionamiento de la molécula asociada al metal (Godwin, 2001; Wilson y

Brunger, 2003). Las vías de absorción del Pb son a través de la piel, por inhalación e ingestión. La vía dérmica es una barrera relativamente efectiva en contra del metal. Al inhalar aire que contiene partículas de Pb menores de  $1\mu\text{m}$  estas llegan a los alveolos pulmonares y al torrente sanguíneo, donde el Pb puede unirse a proteínas sanguíneas (Godwin, 2001). La ingestión de Pb es debido al consumo de agua y alimentos contaminados con este metal. Parte del Pb absorbido puede ser eliminado en la orina y las heces, y en menor grado por la saliva, el sudor, las uñas, el pelo y la leche materna (Ascione, 2001). Este metal se acumula en diversos órganos y tejidos del cuerpo como en la sangre, en el hígado, el riñón, el hueso, los dientes, el músculo y el cerebro (Garza y cols., 2006).

Sin embargo, el almacenamiento del Pb en el hueso representa una amenaza durante la edad reproductiva de la mujer, debido a que tiene una vida media de 20 a 30 años. Pues se ha reportado que, durante el embarazo y el periodo postparto, el Pb es liberado del hueso al torrente sanguíneo, incrementando así las concentraciones de Pb en sangre (Verstraeten y cols., 2008).

En la membrana celular, los canales de Ca y de Zn, así como la molécula transportadora de cationes divalentes 1 "DCT1", pueden ser utilizados por el Pb como vía de entrada al citoplasma (Ballatori, 2002). Este transportador de metales está presente en varios órganos como en el intestino delgado, tejidos como en las células endoteliales de los plexos coroideos (por lo cual pasa directamente al sistema nervioso central) o en las neuronas (Tapia-Saavedra, 2007; Wagner y cols., 2003).

### *1.8 Efectos del plomo sobre la salud*

Los valores de referencia recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2006 para las concentraciones de Pb son: en aire,  $1.0\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ , en agua  $10.0\ \mu\text{g}/\text{l}$ , en suelo  $250\ \text{mg}/\text{kg}$ , en polvo no existen valores de referencia (Cámara minera de México, 2006). La determinación de las concentraciones de Pb en la sangre, las acciones y los criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente en México, se rige por la NOM-199-SSA1-2000

en Salud Ambiental, en la cual se establece que las concentraciones de Pb en sangre no deben de sobrepasar los 10  $\mu\text{g/dL}$ , lo cual no representaría ningún riesgo para la población en general, incluyendo a los niños y mujeres embarazadas (Navarrete-Espinosa y cols., 2000).

Los Centros de Control de Enfermedades en los Estados Unidos mencionan que las concentraciones de Pb en sangre mayores a 10  $\mu\text{g/dL}$  deben provocar medidas de prevención inmediata, pues se conoce que las concentraciones de Pb en sangre de entre 30 y 90  $\mu\text{g/dL}$  producen hipertensión arterial (actuando por inhibición de la sintasa del óxido nítrico endotelial), un decremento significativo en la capacidad auditiva, en la síntesis de hemoglobina (con una consecuente anemia), daño por estrés oxidativo (Martínez y cols., 2011) y nefropatía (altera la función del túbulo contorneado proximal). Mientras que las concentraciones de más de 90  $\mu\text{g/dL}$  producen encefalopatía y pueden producir la muerte (Garza y cols., 2006). Por otra parte, las concentraciones menores de 10  $\mu\text{g/dL}$  inducen una disminución en la audición, en la estatura, en el coeficiente intelectual y alteraciones en la lectura y memoria, entre otros (Gurer y Ercal, 2000; Hamp y cols., 2018). Por consiguiente, no se ha observado un nivel umbral para los efectos del Pb sobre la salud (OMS, 2018).

En México, un estudio en 792 escolares de 7 a 14 años de edad asistentes a la consulta externa de cinco hospitales pediátricos de la Ciudad de México, donde se midió plomo en sangre, se exploró la exposición al metal, así como el desempeño académico, donde se reportó una media de plomo en sangre de 8.6  $\mu\text{g/dL}$  en el caso de niños reprobados, contra 7.6  $\mu\text{g/dL}$  de los aprobados. La principal fuente de exposición fue el uso de loza de barro vidriado (Leal-Escalante y cols., 2007). Mientras que otro estudio reportó que madres presentaron concentraciones de Pb en sangre de 10.7  $\mu\text{g/dL}$  y los niños de 10.4  $\mu\text{g/dL}$  (Navarrete-Espinosa y cols., 2000). El 47% de las madres tuvieron valores superiores a los 10  $\mu\text{g/dL}$  de Pb en sangre y el 50% de los niños con valores superiores a los 10  $\mu\text{g/dL}$  de Pb en sangre. Además, un estudio reciente reportó en niños de 2 a 6 años concentraciones de Pb en sangre de 4.5  $\mu\text{g/dL}$  en la Ciudad de México (Tamayo y cols., 2016). La exposición a Pb prenatal o postnatal temprana, en niños, puede inducir déficit en el coeficiente intelectual, hiperactividad, falta de atención, agresión y delincuencia. De ahí que se reporta

que el sistema nervioso central se afecta de manera permanente en los seres humanos (Garza y cols., 2006).

También se conoce que el Pb atraviesa la placenta de la madre gestante para intoxicar al organismo en desarrollo mediante la sangre (Villeda-Hernández y cols., 2006). Además, se ha reportado que cuando la concentración de Pb se incrementa en la sangre materna, las concentraciones de Pb aumentan en la leche materna, representando un riesgo adicional al neonato (Li y cols., 2000; Jelliffe- Pawlowski y cols., 2006). Adicionalmente, la neurotoxicidad del Pb ha recibido un renovado interés con la creciente evidencia de que este metal contribuye a la enfermedad de Alzheimer, al inducir sobrecargas intracelulares de Fe, disminuyendo la actividad de proteínas transmembranales para su liberación como la ferroporfina 1. Sin embargo, el mecanismo no está del todo claro (Zhou y cols., 2014).

## **2. Antecedentes**

### *2.1 Desarrollo del área preóptica medial*

El desarrollo embrionario de estructuras encefálicas como el hipotálamo, en el caso de la rata macho, es llevado a cabo aproximadamente durante la última semana de gestación, en el caso del mPOA se ha documentado que sus neuronas se aprecian desde el día 13 y 14 gestacional, llegando a su mayor número en el día 15 de la gestación, mientras que para el día 16 ya puede presentar actividad de la enzima aromatasa (Shinoda y cols., 1994) y entre el día 14 al 17 gestacional en el núcleo preóptico medial. En la mayor parte del área preóptica, las neuronas migran principalmente de manera lateral. Las neuronas más viejas en el área preóptica lateral migran antes y se instalan adyacentes al telencéfalo. Las neuronas más jóvenes migran en sucesivas oleadas posteriores y se acumulan medialmente. Las neuronas sexualmente dimórficas migran pasando las células más viejas para establecerse en el núcleo preóptico medial. El núcleo preóptico medial se origina en una zona neuroepitelial de la línea media que es continua con el neuroepitelio en el telencéfalo basal de la línea media y, por lo tanto, se considera que representa un área de transición entre el

telencéfalo y el diencefalo, surge del neuroepitelio anterior del tercer ventrículo (Altman y Bayer, 1978).

### 2.1.1 Desarrollo de la amígdala medial

La amígdala es el componente principal cerebral que regula comportamientos emocionales, los distintos núcleos de la amígdala exhiben diferentes perfiles de desarrollo y la amígdala de la rata madura hasta un período prolongado postnatal (Cooke, 2005). Los estudios en ratas han ilustrado que el desarrollo de la amígdala ocurre antes y después del nacimiento. Se conoce que su desarrollo puede llevarse a cabo durante la última semana de gestación y al igual que mPOA, al día 16 gestacional ya puede presentar expresión de aromatasa (Shinoda y cols., 1994). La migración celular más temprana que representa el complejo estriado es desde el epitelio germinal en la región del foramen interventricular, lateral a la formación del hipocampo primordial. Todos los núcleos amígdaloides identificados se desarrollan por la migración de neuroblastos del epitelio germinal (Humphrey, 1968).

### 2.2 Exposición perinatal a plomo

Se conoce que la exposición a Pb durante la gestación y la lactancia (período perinatal) induce en la rata macho adulta una disminución en las concentraciones de T (Pillai y cols., 2012).

Existen trabajos previos de hace algunas décadas, como el de McGivern y cols., (1991), donde observaron que en los machos tratados con Pb al 0.1% durante la tercera semana de gestación mostraron significativamente menor marcaje territorial y menor agresividad, comportamiento característico del sexo masculino en comparación con los controles, así como una disminución del 35% del volumen neural del núcleo dimórfico sexual, correspondiente al mPOA.

Trabajos previos más recientes como el de Villeda-Hernández y cols. (2006) quienes expusieron oralmente a ratas gestantes a 320 ppm (0.2%) de acetato de Pb prenatal hasta el nacimiento encontrando una bioacumulación del metal en sangre de los neonatos, una disminución en el número total de neuronas en

cuerpo estriado, tálamo, corteza parietal y cerebelo, así como congestión vascular en la placenta.

Por otro lado, Rojas-Castañeda y su equipo (2011) expusieron a las ratas perinatalmente y hasta los 90 días de edad a 320 ppm (0.2%) de acetato de Pb oralmente, encontrando Pb en hipotálamo, y anomalías morfológicas neuronales. Además, Gassowska y sus colaboradores (2016) administraron oralmente acetato de Pb al 0.1% abarcando de la gestación al destete, y sacrificando a los 28 días de vida, encontrando disminuciones en las sinapsis neuronales.

### *2.3 Mecanismos de daño por plomo en células del SNC*

Se sabe que una vez que se ha expuesto un individuo al Pb, este metal es distribuido en el cuerpo al ser capaz de sustituir cationes divalentes, principalmente al Ca, Fe y Zn, entrando a las células por medio del transportador DCT1 (Ballatori, 2002) y cuando se une a los grupos sulfhidrilo de la hemoglobina, el plomo llega a los vasos cerebrales y cruza la barrera hematoencefálica por difusión o competencia con el mismo sistema de transporte para otros iones metálicos, como el hierro. Los mecanismos de intoxicación por Pb están principalmente relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mecanismos iónicos alterados, sustituyendo cationes divalentes como Ca, Mg y Fe, lo que genera déficits de la neurotransmisión, señalización subcelular alterada y estrés oxidativo alterando el funcionamiento celular, procesos fisiológicos y conductuales dependientes de cationes divalentes y por consiguiente afectar de manera adversa la salud (Godwin, 2001; Needleman, 2004). Se ha reportado una disminución en la densidad celular y expresión inmunohistoquímica de neurotransmisores en el hipotálamo (Rojas-Castañeda y cols., 2011). También se ha observado que la exposición perinatal a Pb es peligrosa para el SNC en desarrollo debido a la falta de una barrera hematoencefálica funcional y la proliferación celular intensa, diferenciación y sinaptogénesis que tiene lugar durante la gestación y las primeras semanas de vida postnatal (Garza y cols., 2006).

Los mecanismos de daño por Pb involucran una disminución en las enzimas antioxidantes, incremento del estrés oxidativo inducido por radicales libres que conduce a la peroxidación de lípidos con daño a la membrana citoplasmática (Martínez y cols., 2011), apoptosis, inducción de factores inflamatorios (como en las células gliales) que resultan en muerte neuronal y disminución de neurotransmisores, así como en la expresión y función de receptores, trastornos en el metabolismo mitocondrial, alteraciones en los sistemas de segundos mensajeros, daños a las células endoteliales, la astrogliosis y oligodendrogliosis, la interferencia con los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y de manera indirecta la formación de ácido δ-aminolevulínico (δ-ALA), alterando el metabolismo de las porfirinas así como la disminución de hemoglobina (Yamaki y Nobusada, 2003; Martínez-Haro y cols., 2011; Chen y cols., 2015), además se conoce que disminuye la neurotransmisión por GABA y dopamina (Struzyńska y Rafałowska, 1994; Garza y cols., 2006; White, 2007; Verstraeten, 2008).

También se conoce que el Pb altera la vía de la fosfolipasa c, provocando un aumento de las concentraciones intracelulares de calcio y (Pb actuando como agonista) por acción del inositol trifosfato, activando a la proteína cinasa c (dependiente de Ca y también con un papel en la apoptosis) modificando los gradientes iónicos de la osmolaridad celular y por tanto la vía apoptótica. Además, al alterar las concentraciones de Ca, se inhiben por exceso de Pb la calpaína y la calmodulina, esta última regula a la CaMK II, que es importante en el aprendizaje y la memoria, así como regulación de la apoptosis, también es afectada por el Pb, el cual incluso es capaz de inhibir la acción de las mismas enzimas fosfolipasa c, proteína cinasa C, y el inositol trifosfato (Florea y cols., 2013; Salas y cols., 2010). También se ha reportado que el Pb interrumpe la homeostasis del Ca, causando una marcada acumulación de este en las células expuestas al Pb (Bressler y Goldstein, 1991; Bressler y cols., 1999, en concentraciones nanomolares, también induce la liberación mitocondrial de calcio (Silbergeld, 1992), despolarizando las membranas de las mitocondrias de las neuronas, actuando de forma análoga a como lo hace una sobrecarga de Ca, ya que el Pb se une a las proteínas que forman los poros de la membrana mitocondrial interna a través de una regulación negativa de bcl-2 y la regulación positiva de la expresión de Bax, resultando en un aumento de la relación Bax / bcl-2 (Sharifi y cols., 2002), con lo que sale al citosol el citocromo c y se inicia la

cascada de activación del apoptosoma así como las caspasas, y por tanto, promoviendo la apoptosis (Lidsky y Schneider, 2003; Pulido y Parrish, 2003). Por lo que se ha reportado que la exposición a Pb afecta diversas estructuras del SNC (Garza y cols., 2006).

### *2.3 Efectos del Plomo sobre la salud reproductiva masculina*

La exposición a Pb tiene efectos sobre la salud reproductiva del varón cuando este se expone directamente al metal, ya que se ha reportado que este metal induce alteraciones en la síntesis de gonadotropinas y en las enzimas esteroideogénicas (Biswas y Ghosh, 2004), que se reflejan en una reducción en las concentraciones de T y espermatozoides (Sikka y Wang, 2008), promoviendo en estos últimos malformaciones y alteraciones de estos en la motilidad y la viabilidad de estos (Morán-Martínez y cols., 2013). En ratas adultas expuestas a Pb se observó una disminución en la concentración de T, lo cual se ha involucrado con una disminución en la actividad de las enzimas esteroideogénicas  $\Delta 5$ - $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $\Delta 5$ - $3\beta$ -HSD) y  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD), los citocromos P450SCC (enzimas de escisión de la cadena lateral del colesterol) y P450C17 ( $17\alpha$ -hidroxilasa/ $17,20$  liasa/ $17,20$  desmolasa), e inhibición del AMPc en el testículo (Doumouchtsis y cols., 2009). Con respecto a la CSM, se sabe que la administración de Pb perinatal puede deteriorar la CSM, presentando un incremento en el NM, NI y en la LE (Sant'Ana y cols., 2001; Mokhtari y Zanboori, 2011). Además, Mokhtari y Zanboori (2011) suministraron 0.01% (100 mg/kg) de acetato de Pb por vía oral en ratas durante 28 días en machos adultos y observaron una disminución de la concentración de T y afectaciones de parámetros de la CSM como latencias de monta (LM), número de montas (NM), latencia de intromisiones (LI), número de intromisiones (NI), latencia de eyaculación (LE) y número de eyaculaciones (NE), además de verse afectado el periodo refractario (PR) y el *hit rate* (HR) o eficiencia copulatoria.

Por otra parte, se ha observado que las hormonas esteroideas, como los estrógenos y andrógenos, regulan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y están involucrados en conductas sensibles a hormonas, como la CSM

(Arteaga-Silva y cols., 2017). Una baja en la concentración de estas hormonas se asocia con una disminución de la función reproductiva (Ghandi y cols., 2017). También, el Pb es capaz de aumentar la expresión de Fas, FasL y caspasa-8, induciendo apoptosis a las células de Leydig, células necesarias para la síntesis de T (He y cols., 2017).

### **3. Justificación**

Se conoce que el mPOA, localizada en el hipotálamo, y la MeA desempeñan un papel importante en la conducta sexual masculina, mediado por la T a través de los RA y los RE (Kudwa y cols., 2006; Portillo y cols., 2006; Fernández-Guasti y cols., 2010; Tetel y Pfaff, 2010), mientras que la exposición perinatal crónica a Pb (Rojas-Castañeda y cols., 2011) provoca muerte neuronal en hipotálamo, lo que sugiere que las neuronas del mPOA y el MeA podrían ser afectadas a la exposición perinatal a Pb. Además, se ha reportado que la exposición perinatal a Pb produce una disminución en la concentración de T (Pillai, 2011) y en la CSM (Sant Ana y cols., 2001; Mokhtar y Zamboori, 2011). Lo que sugiere que el Pb perinatal podría inducir alteraciones en la inmunorreactividad de los RA y los RE en las neuronas del APOm y la MeA asociadas con el despliegue de la conducta sexual masculina de la rata adulta.

### **4. Pregunta de investigación**

¿La exposición perinatal a Pb afectará las concentraciones de testosterona y la CSM, así como la inmunorreactividad de los RA y RE en el APOm y la MeA estructuras cerebrales necesarias en el despliegue de la CSM?

### **5. Hipótesis**

Si la exposición perinatal a Pb induce alteraciones en las neuronas del mPOA y de la MeA, así como en la producción de T, entonces la intoxicación perinatal con dicho metal provocará deterioro de la CSM posiblemente relacionada con cambios en las concentraciones séricas de T y la inmunorreactividad de los RA

y los RE del mPOA y de la MeA, los cuales desempeñan un papel importante en la conducta sexual.

## **6. Objetivo General**

Evaluar los efectos de la exposición a Pb durante la etapa perinatal sobre las concentraciones de T, la CSM y la inmunorreactividad de RA y RE en el APOm y MeA en la rata.

### *6.1 Objetivos particulares*

Determinar los efectos de la exposición a Pb durante la gestación y la lactancia en la rata macho adulta sobre:

1. La conducta sexual masculina.
2. La concentración de Pb en sangre y en tejido cerebral (APOm y MeA).
3. La concentración de testosterona en suero.
4. La inmunorreactividad a los RA y RE  $\alpha$  y  $\beta$  en el APOm y en MeA.

## **7. Metodología**

Se obtuvieron ratas preñadas de la cepa Wistar, provenientes del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. El inicio de la gestación fue determinado por la presencia de tapón vaginal y se formaron dos grupos de manera aleatoria. Grupo experimental: hembras preñadas que fueron expuestas a 320 ppm de acetato de plomo (0.2%) (J.T. Baker, Edo. de Méx., México) disuelta en el agua de bebida del bioterio, desde el inicio de la gestación hasta el destete a los 21 días de edad, (periodo perinatal). Al nacimiento, las crías fueron separadas por género y fueron utilizados los machos, cada camada fue ajustada a 8 crías. Grupo control: Hembras a las cuales se les mantuvo en condiciones normales de ingesta de agua. Ambos grupos se mantuvieron bajo

las mismas condiciones ambientales (ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h, temperatura de  $24 \pm 1$  °C) y libre acceso al agua y alimento. A los 21 días de edad, las crías de ambos grupos fueron destetadas y se dejaron con libre acceso al agua y alimento. Así, se obtuvo un total de 34 ratas macho (17 controles y 17 experimentales). El manejo y cuidado de los animales fue realizado de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999 denominada "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado, y uso de los animales de laboratorio", Diario Oficial 22 de agosto de 2001 y a los Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

A los 120 días de edad, a todos los animales se les realizaron las pruebas de CSM. Al término de la prueba conductual de los 34 machos, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca (n=22) y por decapitación (n=12) para la determinación de las concentraciones de Pb y T. Posteriormente se perfundieron (n=22) y se obtuvieron los cerebros para realizar inmunohistoquímica para RA y RE  $\alpha$  y  $\beta$ .

Otra serie de animales fue empleada para determinar las concentraciones de T en suero, así como las concentraciones de Pb en sangre, en el hipotálamo, amígdala, hipocampo, bulbos olfatorios y corteza prefrontal (n=12, 6 ratas por grupo). Todos los experimentos fueron realizados alternando un animal de cada grupo.

### *7.1 Registro de conducta sexual masculina*

Se realizaron tres pruebas de conducta sexual por macho. Estos se colocaron en un redondel de Plexiglas de 50 cm x 42 cm de base y 42 cm de altura con piso de aserrín, durante 5 minutos para que se adaptara al mismo. Transcurrido este tiempo, se introdujo a una hembra receptiva tratada previamente con benzoato de estradiol (5  $\mu$ g/50 $\mu$ l, 48 horas previas a la prueba) y progesterona (500  $\mu$ g/50 $\mu$ l 4 horas previas a la prueba), con la que interactuó libremente.

Las sesiones fueron de 30 minutos durante los cuales se registraron los

siguientes parámetros:

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

## 7.2 Determinación de plomo en sangre y tejido

El Pb en sangre y tejido cerebral fue cuantificado por espectrofotometría de absorción atómica (AA Analyst600, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, Estados Unidos,) con horno de grafito (HGA-600) y auto-muestreador (AS-60, Perkin Elmer). Todo el material empleado fue inmerso por 24 horas en una solución de ácido nítrico concentrado/agua desionizada 1:1 v/v y posteriormente lavados con agua desionizada antes de ser utilizados, para evitar cualquier contaminación posible.

Las muestras de sangre de 1 ml por animal fueron obtenidas por punción cardíaca (los que se perfundieron) o por decapitación (los que se disectaron) y

fueron colectadas en tubos con EDTA (BD Vacutainer, New Jersey, Estados Unidos). Los cerebros fueron rápidamente disecados y colocados sobre hielo para la obtención del hipotálamo (mPOA es muy pequeño para aislarlo solo), amígdala medial, bulbo olfatorio, hipocampo y corteza frontal. Este procedimiento fue realizado alternando animales de cada uno de los grupos. De las madres se recuperó sangre, ovario, tuba uterina, hígado, riñón y se cuantificó el Pb un mes después del parto (n=6). A cada una de las muestras de sangre de 200 µl se le adicionó 800 µl de ácido nítrico al 30% (Merck, Edo. de México) y fueron centrifugados a 18 500 g por 15 minutos. Se colectó una alícuota de 100 µl del sobrenadante y fue diluida 1:5 v/v con agua desionizada. Las muestras de tejido de cada región cerebral o de los diversos órganos colectados de las madres por animal fueron pesadas y digeridas en 1 ml de ácido nítrico concentrado (Merck) con agitación por 30 minutos a 60 °C. Se tomó una alícuota de 100 µl del sobrenadante y se diluyó 1:5 v/v con agua desionizada. Las muestras fueron aleatorizadas, codificadas y analizadas en el espectrofotómetro, el cual fue ajustado a una longitud de onda de 283 nm. Para cada análisis, estándares de control de calidad (Wisconsin State Laboratory of Hygiene, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) y curvas de calibración (construidas al adicionar cantidades conocidas de estándar de Pb; Merck, Darmstadt, Germany) fueron determinados al inicio y al término de las evaluaciones de las muestras para validar los resultados. El contenido de Pb en la sangre se expresó como µg de Pb/dl de sangre y el contenido de Pb en cada región cerebral u órgano materno se expresó como µg de Pb/g de tejido húmedo.

### *7.3 Cuantificación de testosterona*

La cuantificación de testosterona libre en suero sanguíneo en el grupo control (n=13), así como el tratado con acetato de plomo (n=13) se realizó mediante la técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Las muestras sanguíneas se colectaron en tubos con anticoagulantes y tapón separador de suero (BD Vacutainer SST, México, D.F). El suero se obtuvo por centrifugación durante 15 minutos a 1500 rpm y se mantuvo a -70°C.

La testosterona en suero se midió utilizando un kit comercial (TKTT-1, Diagnostic

Product Corporation, CA, Estados Unidos). Siguiendo con el procedimiento del manual del kit, se prepararon soluciones estándar (S0-S5) y se agitaron en un mezclador, así como una solución de lavado contenida en el kit, diluyendo el contenido de dos viales en agua destilada en una proporción de 1:10. Se mezclaron todos los reactivos junto al suero en los pocillos y se incubaron a 37°C durante una hora. Posteriormente se removió el contenido de los pocillos, lavando 3 veces con 300 µl con solución de lavado, para después incubarse a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad. Posterior a esto, las muestras se colocaron en el lector Elisa Multiskan Ascent V1 26 que se programó para el análisis de las muestras, así como la curva de calibración con las soluciones estándar. Al obtener las lecturas, se realizó la conversión de pg a ng/mL.

#### *7.4 Perfusión de los animales, procesamiento del tejido e inmunohistoquímica*

Al término de la prueba conductual y después de colectar la sangre previa anestesia como se mencionó anteriormente, los animales fueron perfundidos vía intra-cardíaca con solución salina fisiológica, seguido por paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos salino 0.1M (PBS) a pH 7.4, con una bomba de infusión continua (Masterflex, Vernon Hills, Hillinois, Estados Unidos). Los cerebros fueron disecados, pesados y post-fijados por 3 horas en fijador a 4 °C. Posteriormente fueron lavados en PBS. Entonces, se obtuvieron secciones coronales, alternadas en 4 series, del APOm y MeA de 40 µm de grosor por medio de un criostato (CM1850, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania). Tres series con cuatro cortes cada una fueron procesadas con anticuerpos policlonales contra conejo (Santa Cruz) a una dilución de 1:200 para la inmunodetección de: 1) RA (SC 816); 2) RE α (SC H-184) y 2) RE β (SC H-150). Para mostrar cuerpos celulares, la cuarta serie de tejido se montó en portaobjetos cubiertos con grenetina, teñidos con violeta de Cresilo (Sigma, St. Louis Missouri, Estados Unidos) por 6 minutos, lavados con agua destilada, deshidratados y los cubreobjetos van siendo aplicados con entelan (Merck).

Para la técnica de inmunihistoquímica, las secciones de tejido fueron tratadas

con peróxido de hidrógeno al 0.3% (Merck, Alemania) por 10 minutos, después con solución de Tween 20 en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con albumina de suero bovino al 5% (BSA; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) y Tween 20 al 1% en PBS (BSA-TX-PBS) por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con anticuerpos policlonales de conejo para detectar los RA, RE  $\alpha$  o el  $\beta$ , en BSA-Tween-PBS por 48 h a 4°C. La inmunorreacción fue visualizada con la reacción de daminobenzidina. Entre cada uno de los pasos se realizaron tres lavados de PBS de 10 minutos cada uno. Las secciones de tejido fueron montadas sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina (Sigma), deshidratadas y los cubreobjetos se aplicaron con entelan (Merck). Todas las secciones de los grupos control y con exposición a Pb se procesaron al mismo tiempo y en paralelo para minimizar cualquier variación en el procedimiento de tinción.

#### *7.4.1 Determinación morfométrica*

Se realizó de manera manual utilizando un sistema de análisis de imágenes computarizado (Metamorph, versión 4.5; Molecular Devices, Downington, Pensilvania, Estados Unidos) acoplado a un microscopio de luz (DMLS, Leica, Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemania). Dos secciones representativas del nivel medio del APOm (Bregma -0.24, atlas estereotáxico, Paxinos y Watson, 1998) y de la MeA (Bregma -0.00, atlas estereotáxico, Paxinos y Watson, 1998) se seleccionaron de cada animal. Las laminillas fueron aleatorizadas y codificadas para realizar el análisis a "ciegas". El área y densidad óptica (las mediciones de densidad óptica reflejan cambios en la expresión de proteínas paralelos a aquellos obtenidos utilizando un ensayo de medición de proteínas bioquímico como el Western blot, Mufson y cols., 1997) del APOm y de la MeA fueron determinados a 40X. El propósito fue para determinar de manera indirecta las variaciones en la expresión de proteínas a nivel tejido.

El conteo de las células inmunorreactivas para cada tipo de receptor, así como la tinción con violeta de cresilo, fue realizado a 40X. La densidad celular fue expresada en  $40\,000\ \mu\text{m}^2$  (calculada del número de células contadas en relación con el área de la cual éstas fueron evaluadas). Las secciones teñidas con violeta

de cresilo se utilizaron para determinar si la exposición crónica a Pb induce un decremento en la población neuronal (número de células por unidad de área).

### *7.5 Análisis estadístico*

Los datos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (ESM). Los resultados obtenidos de Pb en sangre y tejido, concentración de T, las densidades celular y óptica, así como para los parámetros conductuales de latencia y frecuencias de intromisiones, montas y de eyaculación se realizaron mediante la prueba de "t" de Student para grupos independientes, con  $p < 0.05$  considerada como significativa.

## **8. Resultados**

### *8.1 Concentración de plomo en sangre y tejido en madres*

El valor promedio de la concentración Pb en sangre presentó un valor significativamente mayor ( $p=0.0011$ ) en las madres expuestas al metal presentando una media de  $14.51 \pm 0.47$  vs  $0.27 \pm 0.03$   $\mu\text{g/g}$  de los controles (Figura 8A). En el mismo orden, en ovario y el riñón también se bioacumulo significativamente el metal ( $p=0.0003$ ), ( $0.13 \pm 0.027$  vs  $1.20 \pm 0.04$ , Figura 8B), ( $p=0.0012$ ),  $0.37 \pm 0.03$  vs  $21.60 \pm 0.75$  (Figura 8C). En la tuba uterina, ( $p=0.0008$ ) los valores promedio fueron de  $0.13 \pm 0.042$  vs  $2.77 \pm 0.12$  (Figura 8D), y en el hígado ( $0.13 \pm 0.02$  vs  $2.96 \pm 0.40$ ,  $p=0.0196$ , figura 8E). Lo cual nos muestra una bioacumulación persistente del metal en las madres.

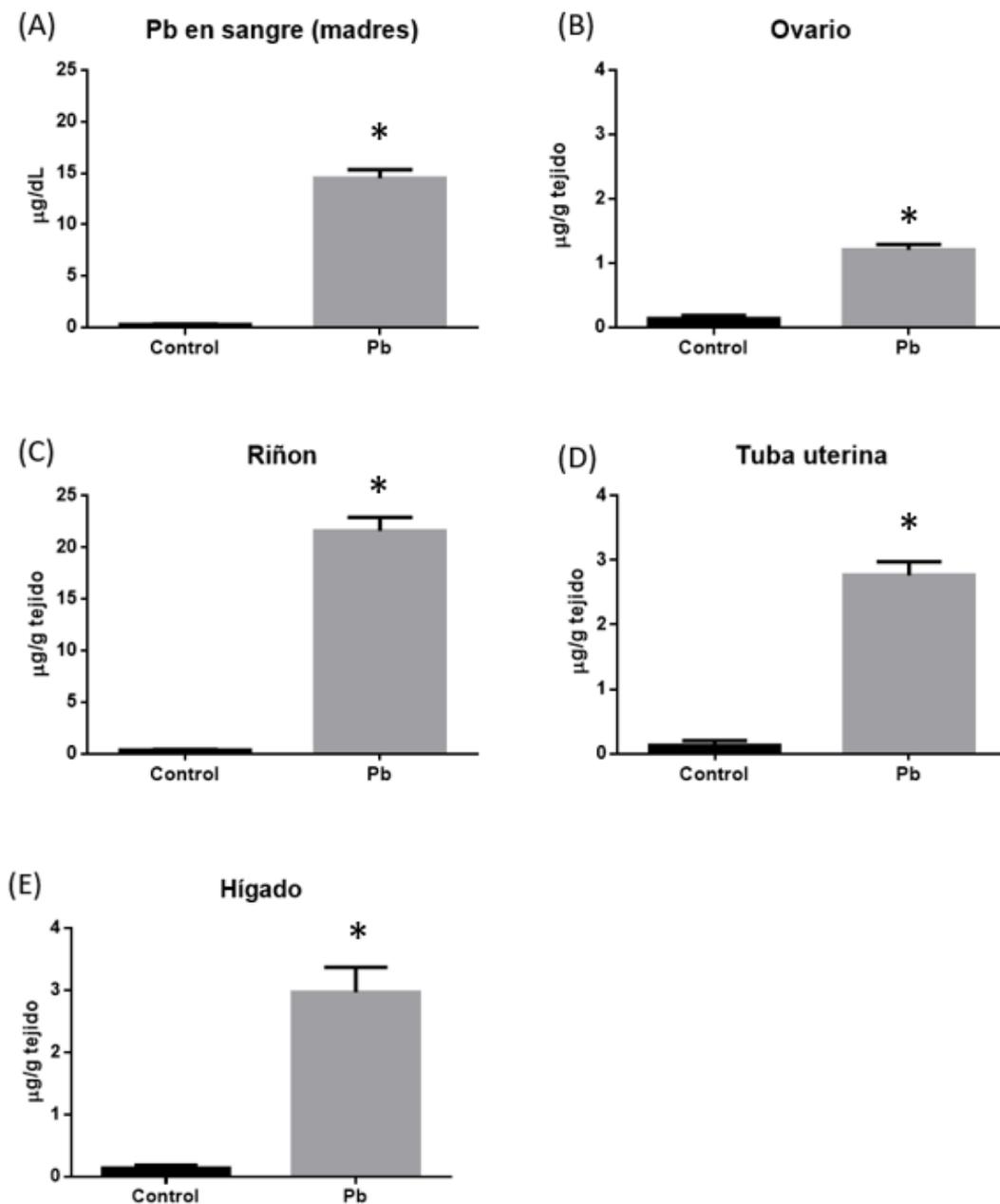


Figura 8. Se observa que las madres gestantes expuestas a Pb presentaron significativamente mayor concentración del metal en sangre (A), ovarios (B), riñón (C), tuba uterina (D), e hígado (E) con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n=6$  animales por cada grupo. \*  $p<0.001$ , "t" de Student para grupos independientes.

### 8.2 Influencia del plomo en el peso corporal

En la figura 9 se observa el peso corporal de las crías neonatas expuestas perinatalmente al Pb, mostrando una media de  $6.58 \pm 0.13$  g al nacimiento, vs

5.12 ± 0.16 de los controles (Figura 9A). Al destete (21 días), se observa que esta diferencia de pesos se acentuó, mostrando medias de 44.89 ± 1.3 para los controles vs 20.39 ± 0.17 g para el grupo expuesto a Pb (Figura 9B), mientras que al momento de la eutanasia a los 120 días de edad, se observa una media mayor del peso corporal por parte de los animales expuestos al metal 421.2 ± 7.39 vs 473.3 ± 4.68 g de los controles (Figura 9C) con una  $p < 0.05$ .

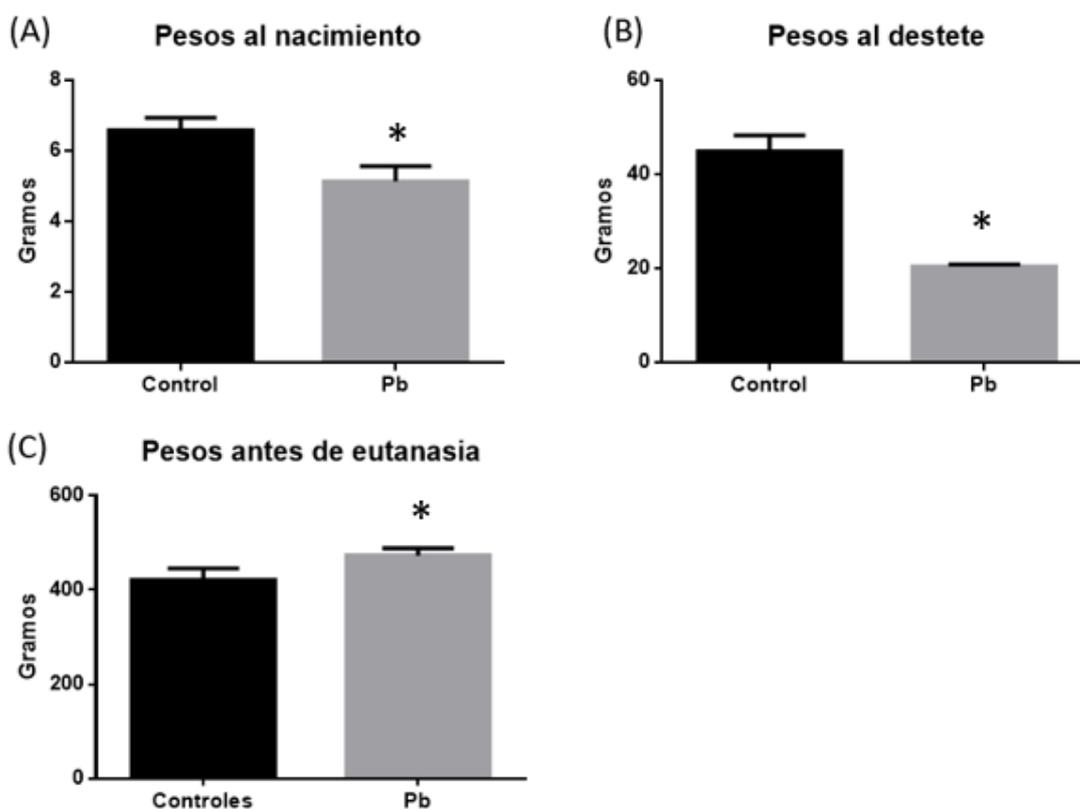
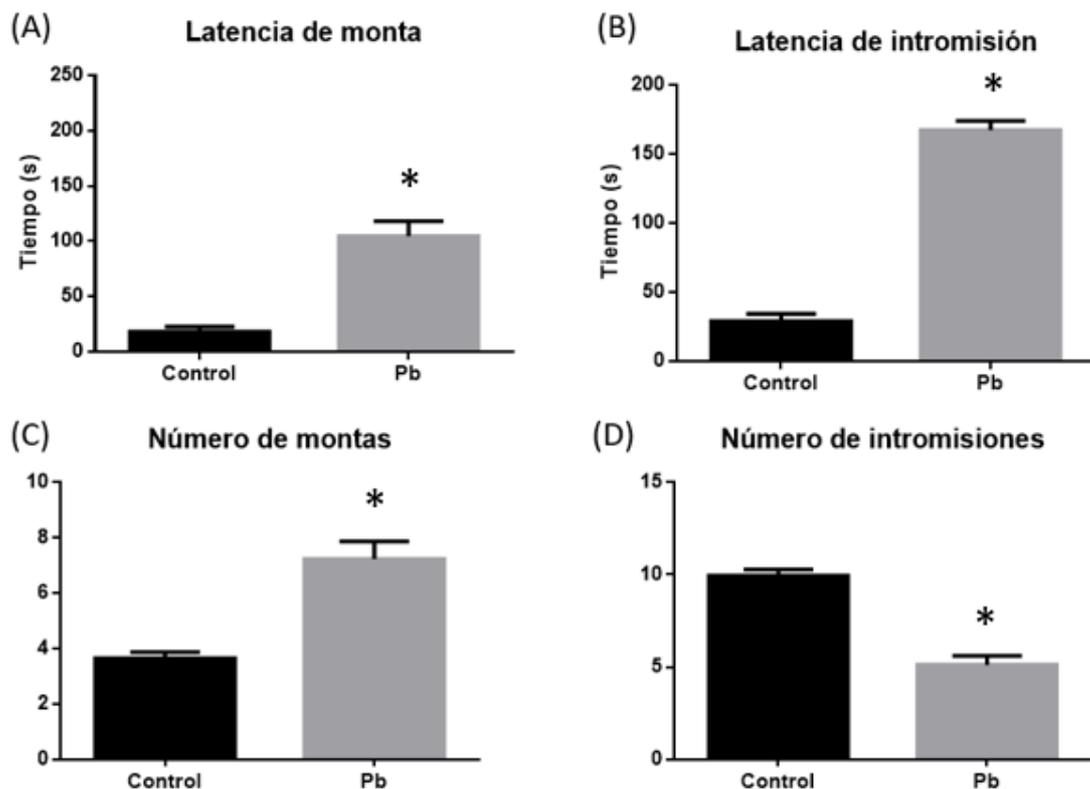


Figura 9. Los machos tratados con Pb perinatalmente pesaron significativamente menos al momento de su nacimiento (A), al destete (21 días) (B), mientras que al momento antes de su eutanasia se observa un mayor peso por parte de los animales expuestos al Pb (C), con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media ± ESM,  $n = 17$  animales por cada grupo. \* $p < 0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.

### 8.3 Conducta sexual masculina

Los resultados que se obtuvieron después de los registros de conducta sexual masculina muestran que los individuos expuestos perinatalmente a Pb presentaron un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) de sus latencias de monta, con

respecto a los controles, mostrando una media de  $104.5 \pm 3.29$  vs  $18.12 \pm 1.08$  del grupo control (Figura 10A). Las latencias de intromisiones también se aumentaron significativamente ( $p < 0.001$ ) en los individuos expuestos al metal, ( $167.5 \pm 6.46$  vs  $28.94 \pm 1.30$ ) del grupo control (Figura 10B). El número de montas aumento en los individuos expuestos a Pb ( $3.64 \pm 0.22$  vs  $7.23 \pm 0.63$ ,  $p < 0.001$ , figura 10C), mientras que el número de intromisiones se vieron disminuidos en los individuos expuestos al metal ( $9.941 \pm 0.33$  vs  $5.118 \pm 0.48$ ,  $p < 0.001$ , figura 10D). La latencia de eyaculación se alargó significativamente ( $1309 \pm 56.91$  vs  $465.9 \pm 36.35$  segundos) del grupo control ( $p < 0.001$ , figura 10E). El número de eyaculaciones fue significativamente menor en los individuos expuestos a Pb con respecto a los controles ( $p < 0.001$ ) (Figura 10F), y el periodo refractario de los animales expuestos a Pb se redujo significativamente ( $p < 0.001$ ), ( $1043 \pm 23.91$  vs  $432.7 \pm 11.61$  segundos) de los controles (Figura 11A). El hit rate o eficiencia copulatoria también fue significativamente menor en los animales expuestos a Pb ( $p < 0.001$ ), ( $0.41 \pm 0.01$  vs  $0.72 \pm 0.01$ ) al de los controles (Figura 11B).



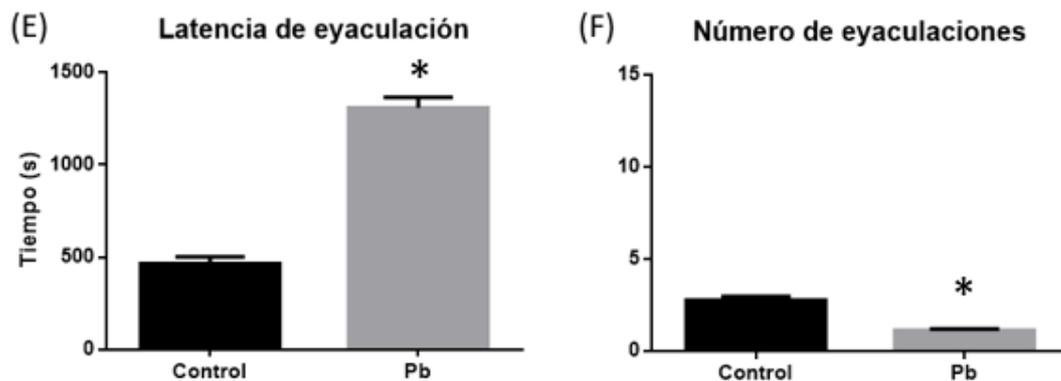


Figura 10. Se observa que los machos expuestos perinatalmente a Pb mostraron mayores latencias de monta (A) y latencias de intromisión (B) respecto a los controles. También se observa que el número de montas fue superior en los tratados con Pb (C) pero mostraron menor número de intromisiones (D), y sus latencias de eyaculación fueron mayores (E) aunque eyacularon menos veces que los controles (F). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n = 17$  animales por cada grupo. \* $p < 0.001$ , “t” de Student para grupos independientes.

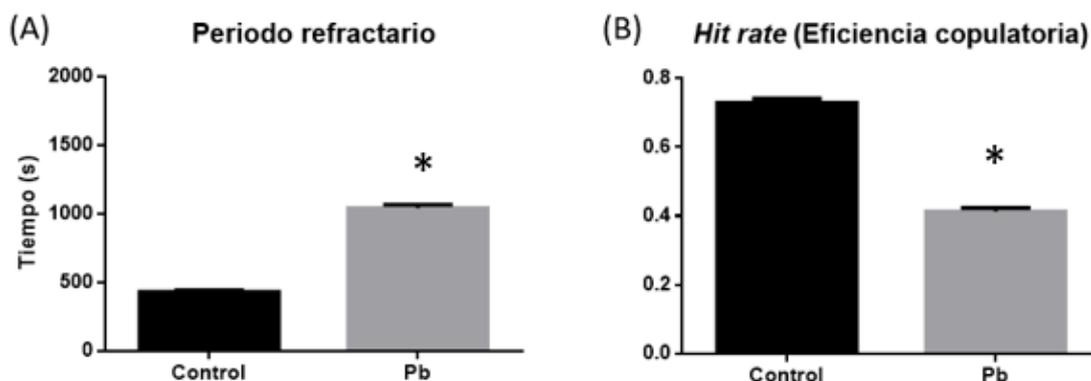


Figura 11. Se observa que los machos expuestos perinatalmente a Pb mostraron mayor un periodo refractario (periodo post eyaculatorio, con respecto a los controles) (A) así como un menor hit rate (B). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n = 17$  animales por cada grupo. \* $p < 0.001$ , “t” de Student para grupos independientes.

#### 8.4 Concentración de plomo en sangre y tejido en machos

La cantidad de Pb en sangre fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los individuos expuestos perinatalmente al metal ( $1.43 \pm 0.13$  vs  $0.18 \pm 0.03$   $\mu\text{g/dL}$ ) del grupo control (Figura 12).

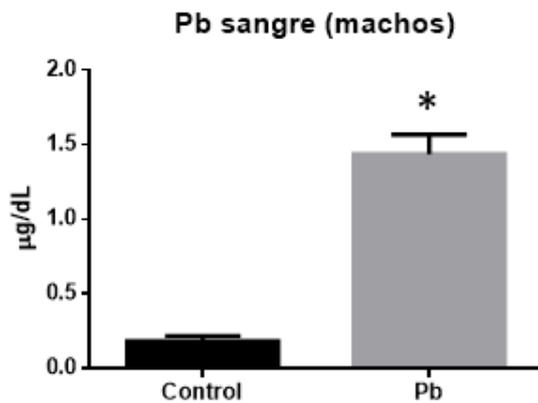


Figura 12. Se observa que los machos expuestos perinatalmente a Pb bioacumularon el metal hasta el momento antes de su eutanasia (120 días), mostrando diferencias significativas con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM, n= 11 animales por cada grupo. \* $p < 0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.

También se realizó las comparaciones de las concentraciones de Pb en sangre entre las madres y las crías macho ( $p = 0.006$ ), observándose medias de  $14.51 \pm 0.47$  y  $1.43 \pm 0.13$   $\mu\text{g/dL}$ , respectivamente (Figura 13). La bioacumulación del Pb en individuos expuestos al metal permanece hasta los 120 días de edad adulta. En el hipotálamo, se observó una acumulación del metal ( $p < 0.0001$ ) en los machos expuestos perinatalmente a Pb, ( $0.16 \pm 0.01$  vs  $0.03 \pm 0.00$   $\mu\text{g/dL}$ ) en los controles (Figura 14A). En MeA, la media fue significativamente mayor ( $0.19 \pm 0.01$  vs  $0.04 \pm 0.00$   $\mu\text{g/dL}$ ) de los controles ( $p < 0.0001$ ) (Figura 14B). En corteza prefrontal, de  $0.04 \pm 0.00$  para los animales tratados con Pb y  $0.02 \pm 0.00$  para el grupo control ( $p < 0.0001$ ) (Figura 14C). En hipocampo, la media fue significativamente mayor ( $0.14 \pm 0.00$  vs  $0.05 \pm 0.00$   $\mu\text{g/dL}$ ) para los animales del grupo control ( $p < 0.0001$ ) (Figura 14D). En bulbo olfatorio, se observó una media de  $0.16 \pm 0.22$  vs  $0.05 \pm 0.15$   $\mu\text{g/dL}$  para el grupo control ( $p < 0.0001$ ) (Figura 14E).

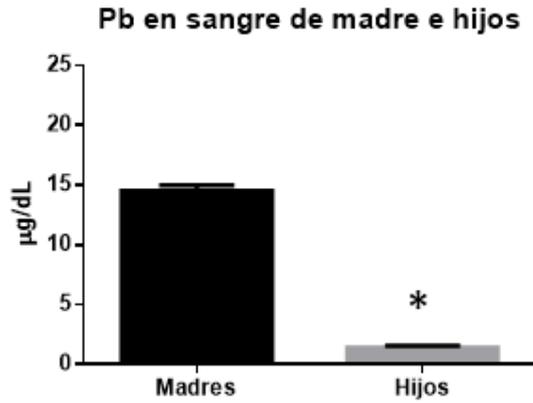
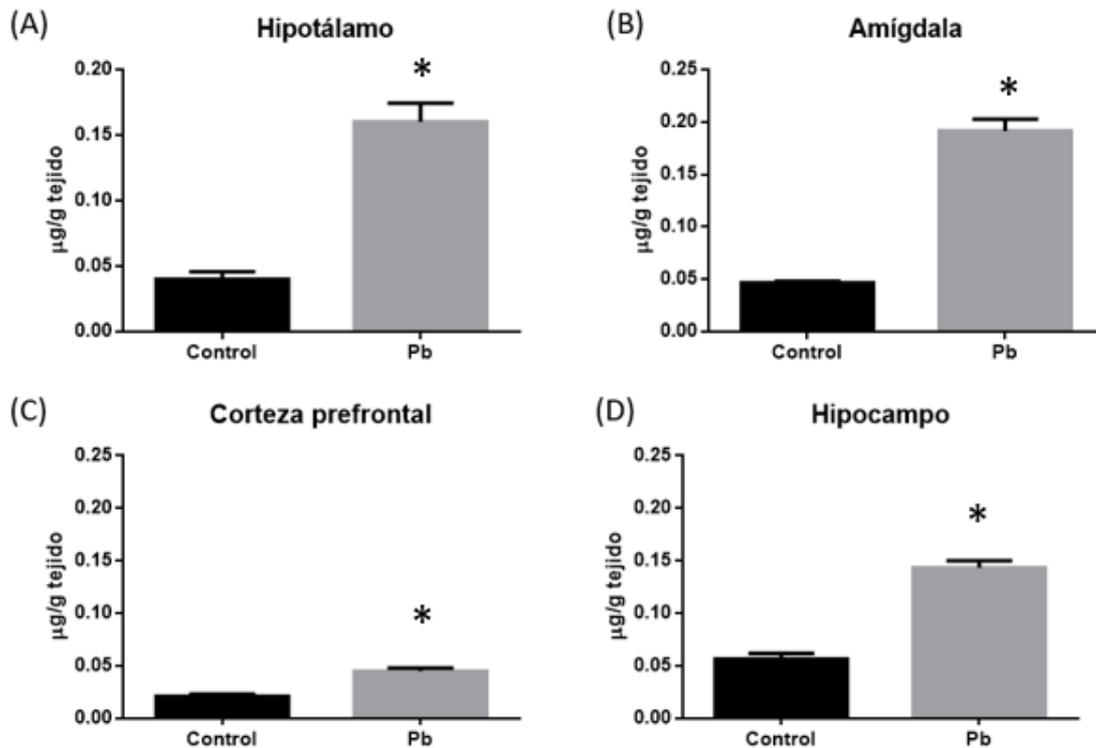


Figura 13. Observamos que las madres expuestas a plomo tienen mayor concentración del metal en la sangre con respecto a los hijos que también estuvieron expuestos al metal. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n= 13$  crías y 6 madres por cada grupo. \* $p<0.0001$ , "t" de Student para grupos independientes.



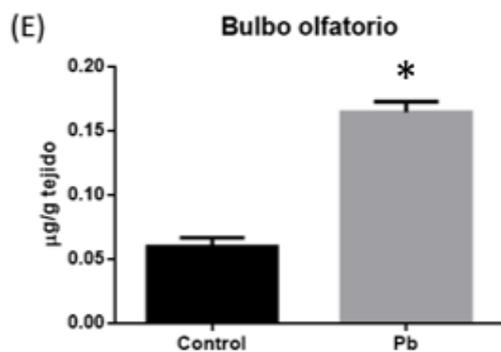


Figura 14. Se observa que los machos expuestos perinatalmente a plomo bioacumularon el metal en varias estructuras encefálicas hasta el día de su eutanasia, con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n=6$  animales por cada grupo.  $*p<0.0001$ , "t" de Student para grupos independientes.

### 8.5 Cuantificación de testosterona

Los animales expuestos perinatalmente a Pb presentaron concentraciones significativamente menores ( $p<0.05$ ) de T ( $7.75 \pm 0.67$  vs  $3.01 \pm 0.48$  ng/dL) del grupo control (Figura 15).

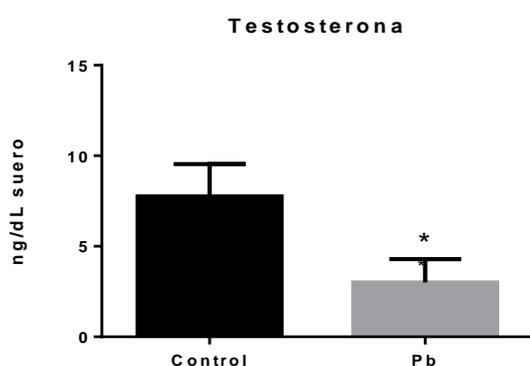


Figura 15. Se observan los resultados correspondientes a la cuantificación de testosterona (T) en suero sanguíneo, mostrando diferencias significativas comparadas con los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n=7$  animales por cada grupo.  $*p<0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.

### 8.6 Inmunorreactividad y Densidad óptica de receptores para andrógenos y estrógenos $\alpha$ y $\beta$ en el área preóptica medial y la amígdala medial

El número de células inmunorreactivas en el mPOA ( $62.38 \pm 2.62$ ) al RA (Panel 1) en los animales expuestos a Pb disminuyó significativamente ( $p=0.042$ ) en comparación al de los controles ( $98.78 \pm 3.04$ , figura 17A). También fue significativamente menor ( $p=0.0015$ ) el número de células inmunorreactivas a RE $\alpha$  (Panel 2) ( $64 \pm 3.10$ ) de los animales tratados con Pb y de ( $104.7 \pm 7.29$ ) para los del grupo control (Figura 17B). Para RE $\beta$ , encontramos también un menor número de células en los tratados animales tratados con Pb (Panel 3) ( $p=0.0083$ ), ( $68.50 \pm 4.79$  vs  $92.17 \pm 5.36$ ) de los controles (Figura 17C).

En MeA, se encontró también una diferencia significativa ( $p=0.0047$ ) de menos expresión de los RA en los machos tratados con Pb (Panel 4) ( $63 \pm 2.80$  vs  $96.5 \pm 7.38$  en el grupo control, figura 20A). La expresión de los RE $\alpha$  (Panel 5), disminuyó significativamente ( $p=0.0015$ ,  $67 \pm 4.04$  para los animales tratados con Pb y de  $104.3 \pm 6.99$  para el grupo control, figura 20B), y para la expresión de los Re $\beta$  (Panel 6) se observó una media de  $70.33 \pm 4.63$  para los animales tratados con Pb y  $97.67 \pm 7.78$  para el grupo control (Figura 20C).

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

#### Área preóptica medial (mPOA)

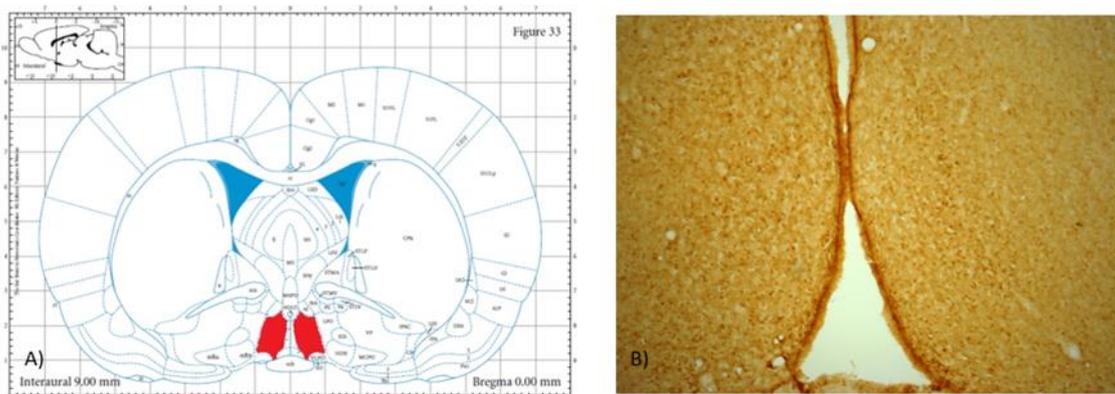
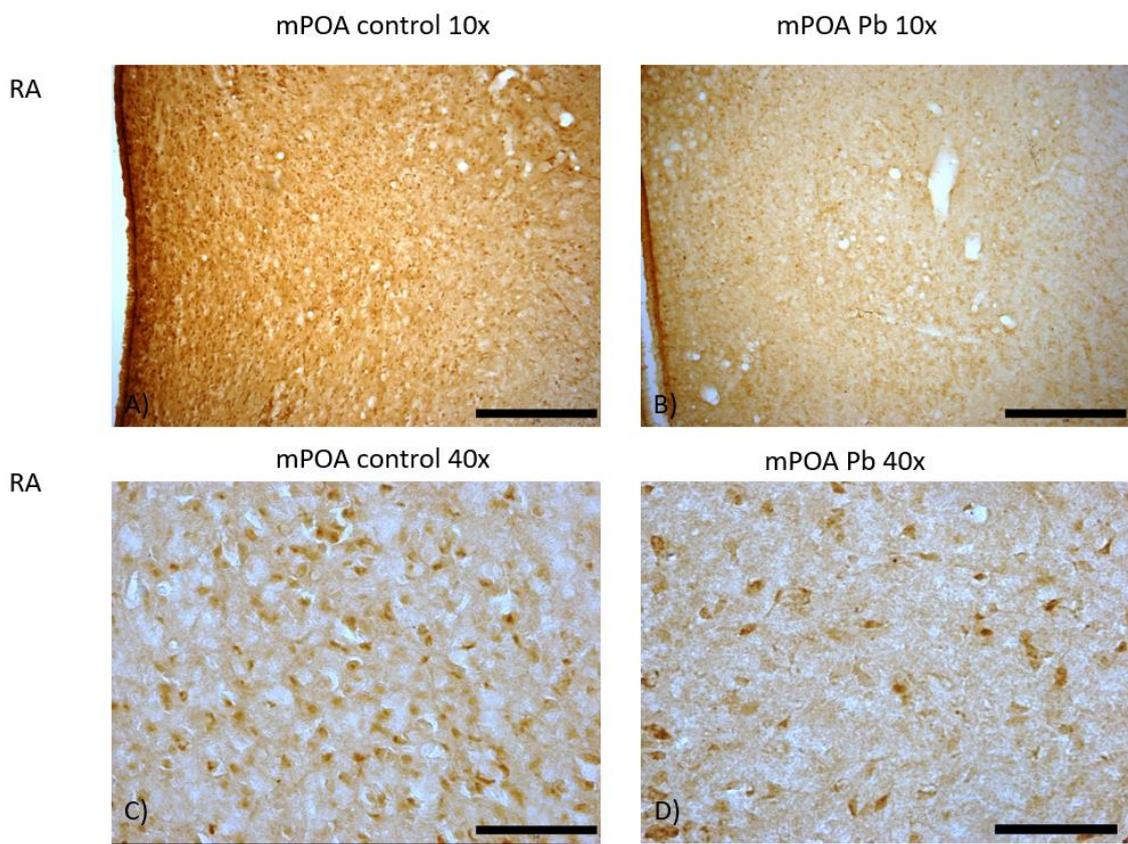
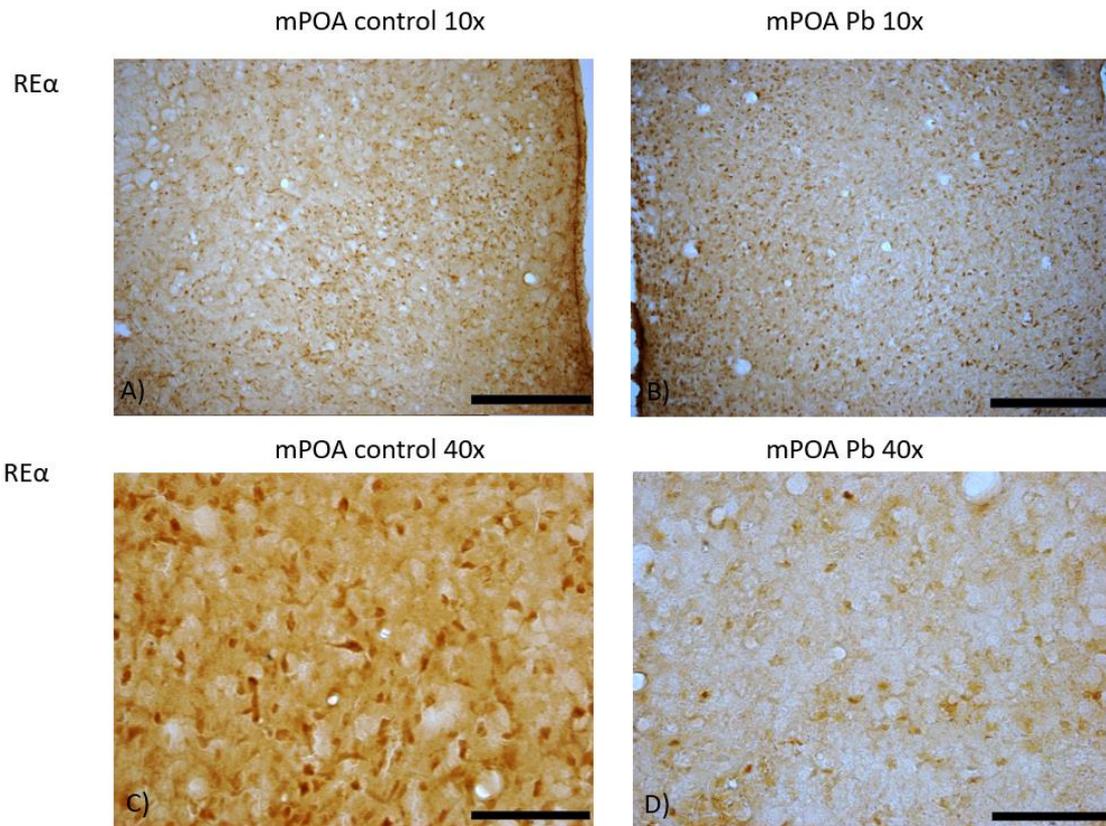


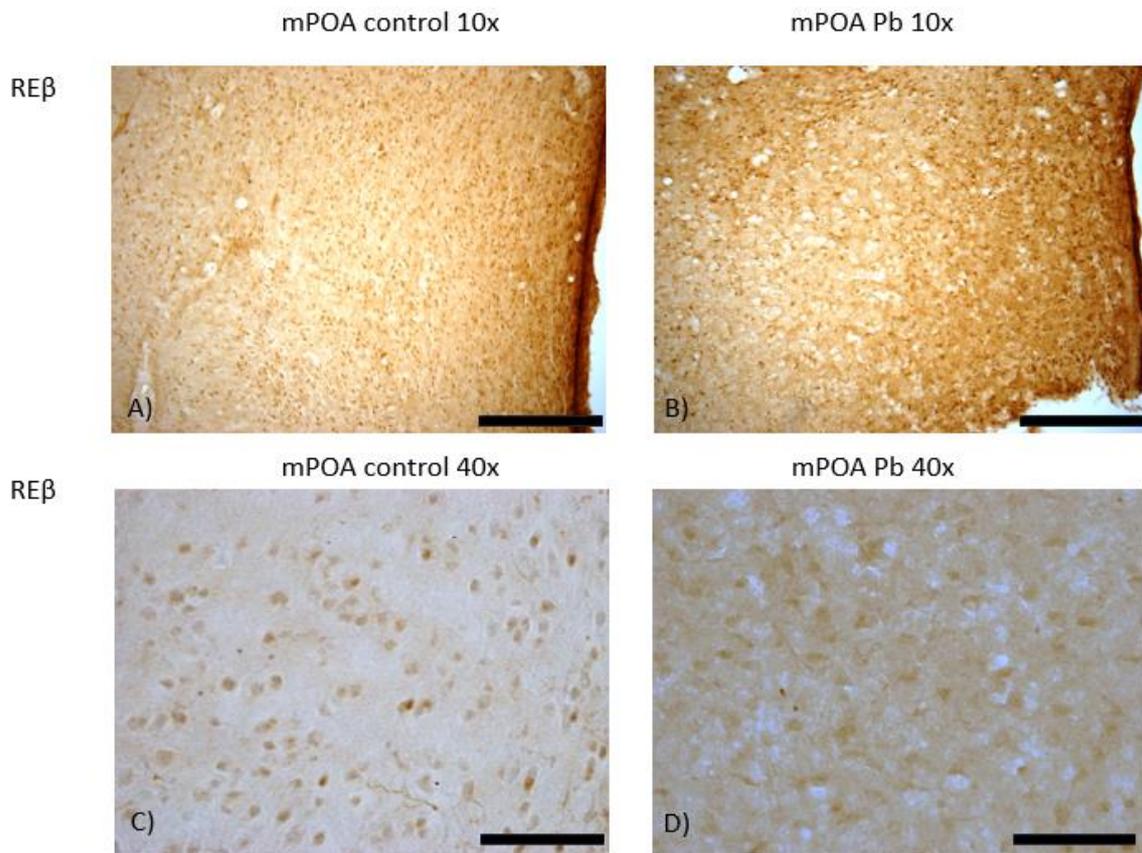
Figura 16. Se observan los límites seleccionados para delimitar el mPOA (Área preóptica medial). A) Esquema del Paxinos y Watson (2005) donde se muestra en color rojo parte del área que compone el mPOA. Figura 33, bregma 0.00 e interaural 9.00 B) Sección del mPOA teñida por inmunohistoquímica para RA de sujeto control a 10x.



Panel 1. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región del mPOA (área preóptica medial) en el hipotálamo. Inmunorreacción a RA (receptores para andrógenos) a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de células con RA. n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.



Panel 2. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región del mPOA (área preóptica medial), en el hipotálamo. Inmunorreacción a RE $\alpha$  (receptores para estrógenos alfa) a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de células con RE $\alpha$ . n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.



Panel 3. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región del mPOA (área preóptica medial) en el hipotálamo. Inmunorreacción a RE $\beta$  (receptores para estrógenos beta) a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de células con Re $\beta$ . n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.

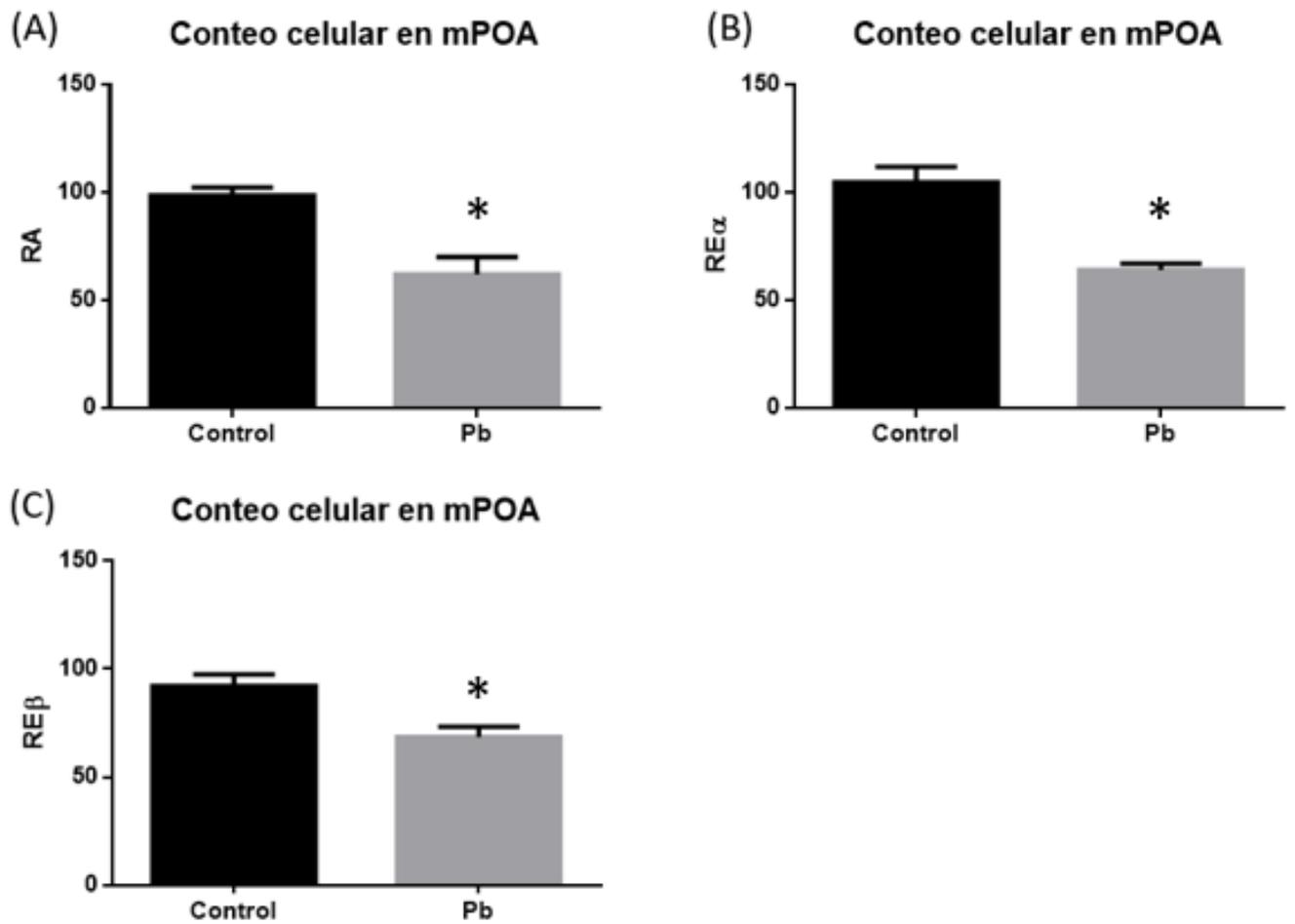


Figura 17. Número de células con receptores en un área de 40,000  $\mu\text{m}^2$  en mPOA. Se observa que los machos expuestos perinatalmente a Pb mostraron menos células inmunorreactivas en el mPOA con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n= 6$  animales por cada grupo. \* $p<0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.

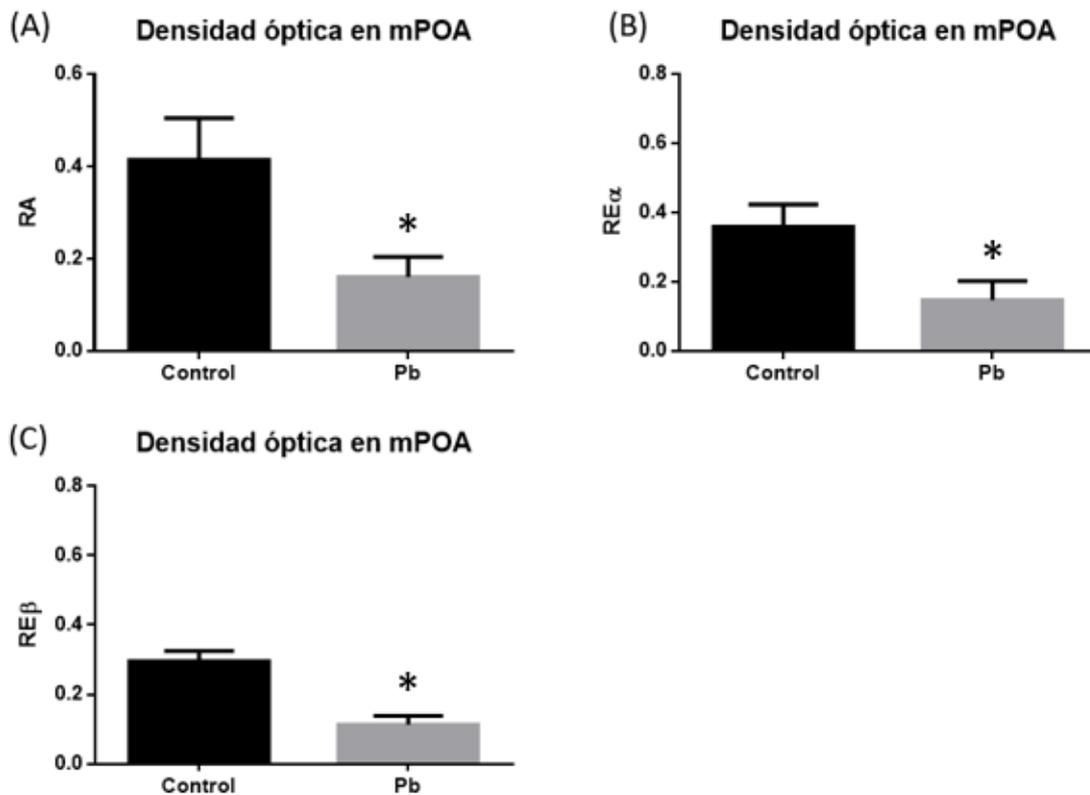


Figura 18. Efectos de la exposición a plomo (Pb) en el área preóptica medial (mPOA) sobre la densidad óptica en un área de  $40,000 \mu\text{m}^2$  en secciones de tejido inmunorreactivas a los receptores a andrógenos (RA) en A, a estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) en B y a estrógenos  $\beta$  en C (RE $\beta$ ). Se observa que los machos expuestos perinatalmente a Pb mostraron menor densidad óptica en mPOA con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n = 6$  animales por cada grupo. \* $p < 0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.

### Amígdala medial (MeA)

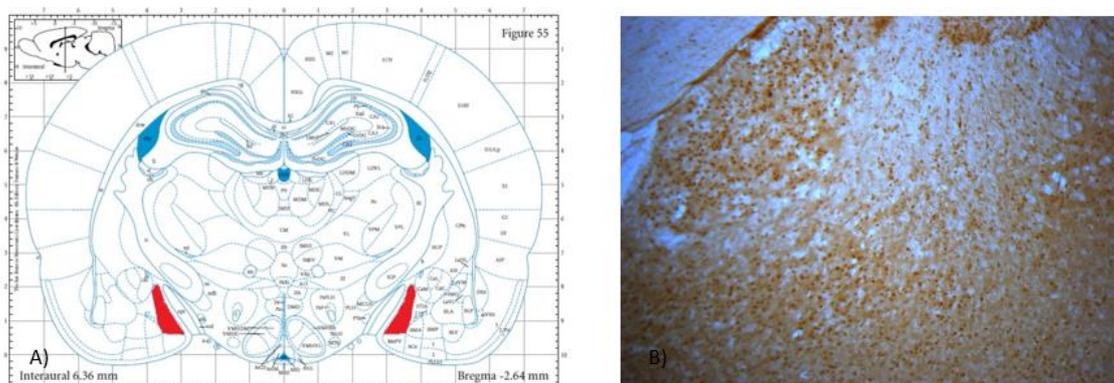
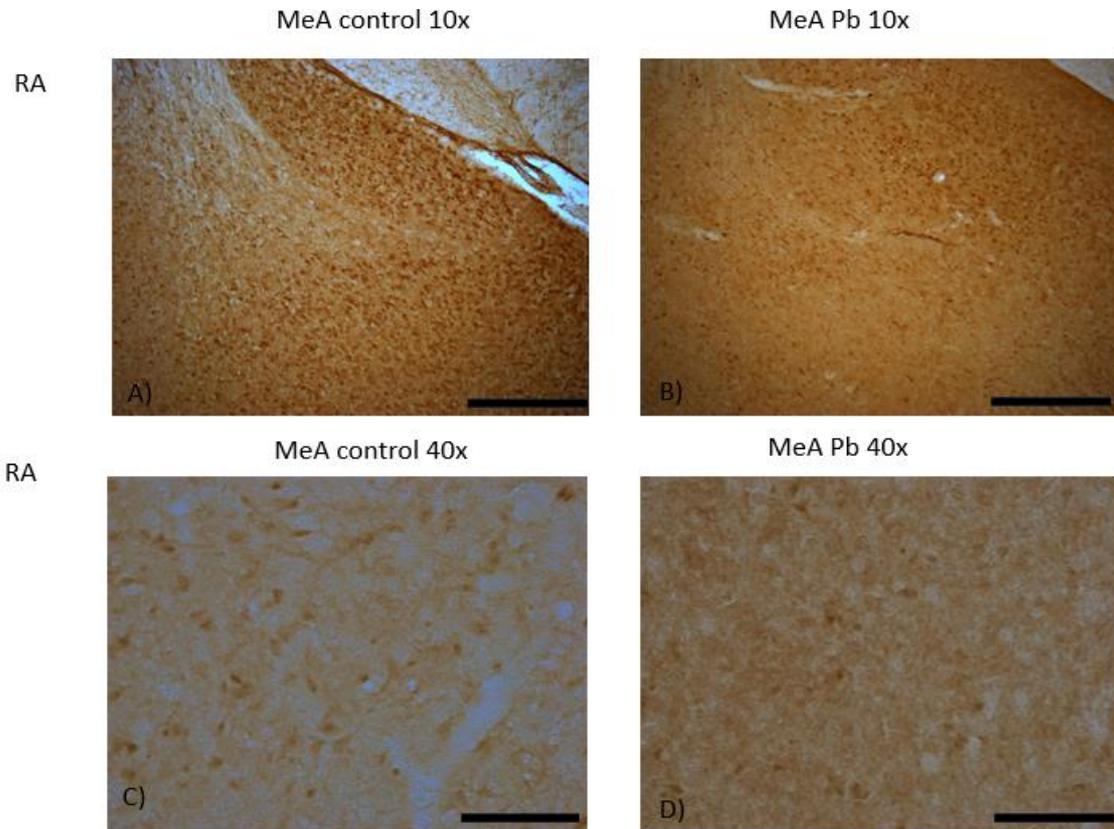
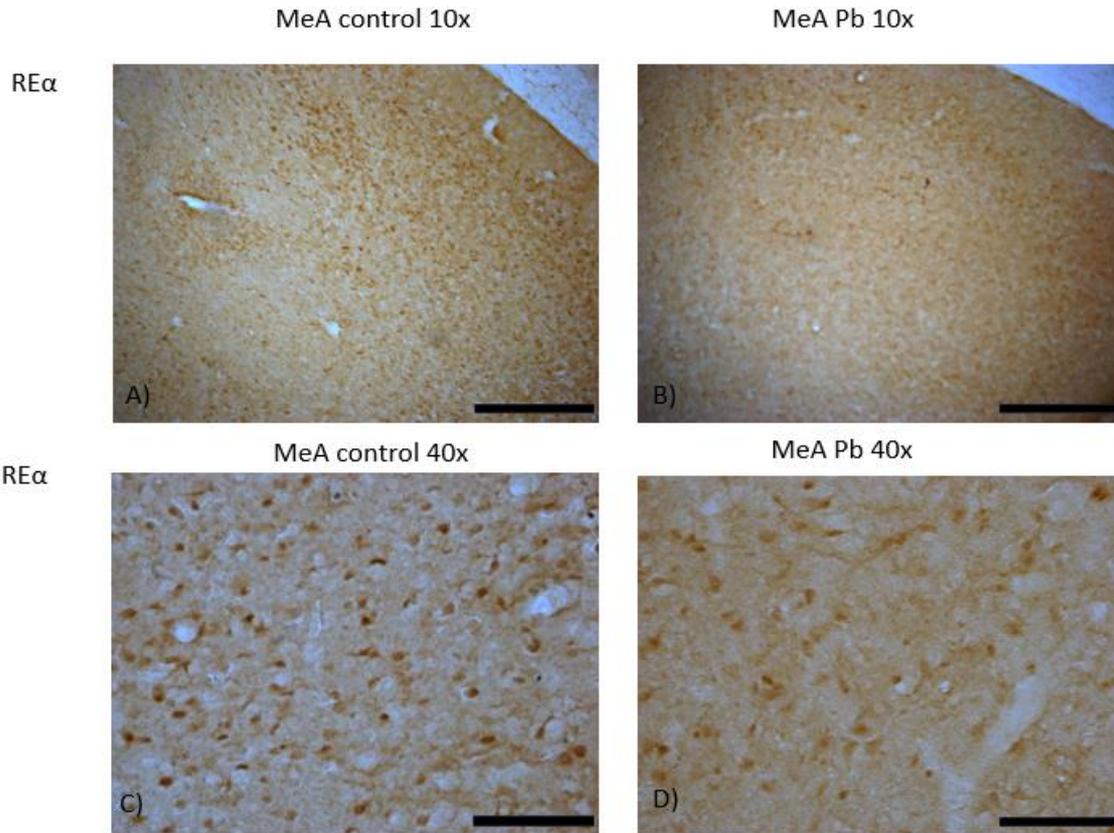


Figura 19. Se observa el MeA abarcando al núcleo medial amigdaloide. A) Esquema del Paxinos y Watson (2005) donde se muestra en color rojo parte del área que compone a la amígdala medial, abarcando al núcleo medial amigdaloide. B) Sección de la MeA

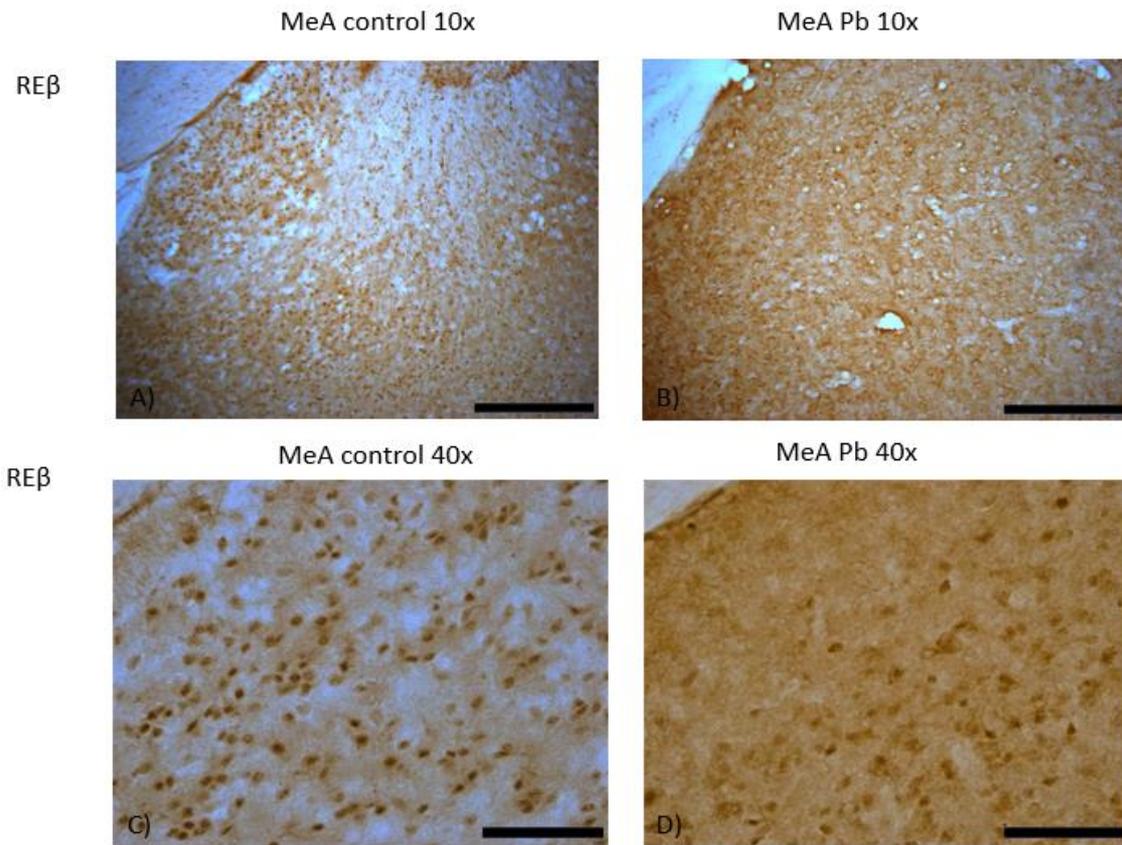
teñida por inmunohistoquímica para RA de sujeto control a 10x.



Panel 4. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región de la MeA (amígdala medial). Inmunorreacción a RA (receptores para andrógenos) a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de células con RA. n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.



Panel 5. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región de la MeA (amígdala medial). Inmunorreacción a RE $\alpha$  (receptores para estrógenos alfa) a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de células con RE $\alpha$ . n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.



Panel 6. Se muestran los resultados correspondientes a la inmunohistoquímica por flotación en cortes coronales que muestran la región de la MeA (amígdala medial). Inmunorreacción a RE $\beta$  (receptores para estrógenos beta) a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de células con Re $\beta$ . n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.

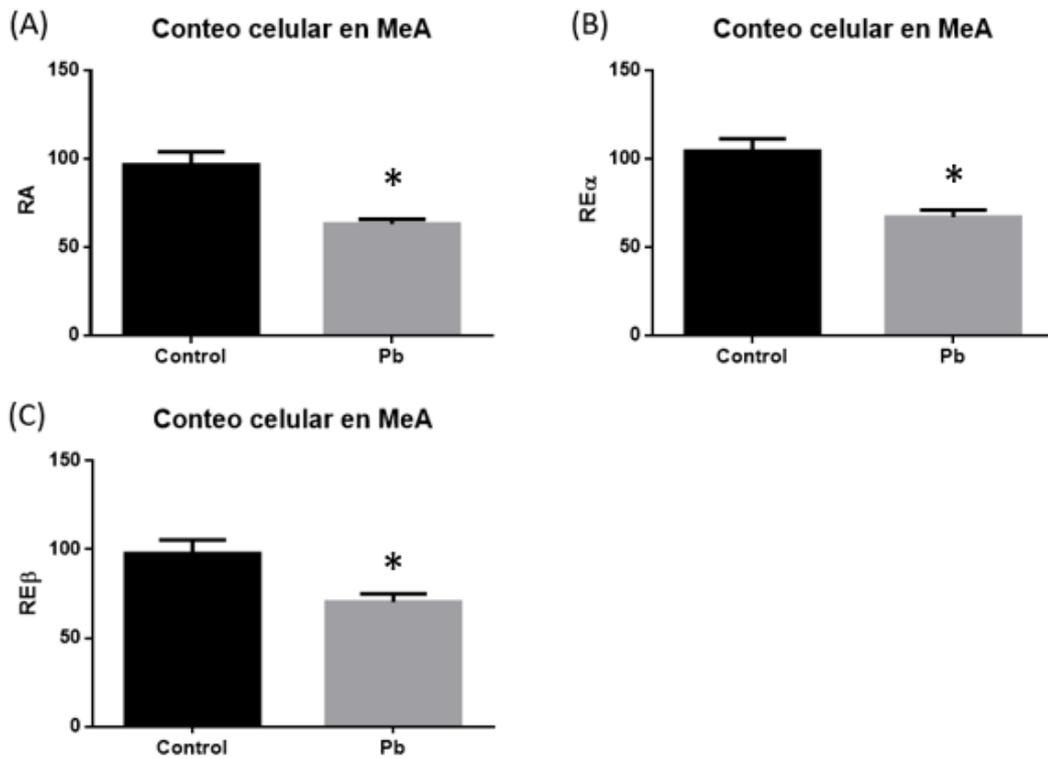


Figura 20. Número de células con receptores en un área de 40,000  $\mu\text{m}^2$  en MeA. Se observa que los machos expuestos perinatalmente a Pb mostraron menos células inmunorreactivas en el mPOA con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n = 6$  animales por cada grupo. \* $p < 0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.

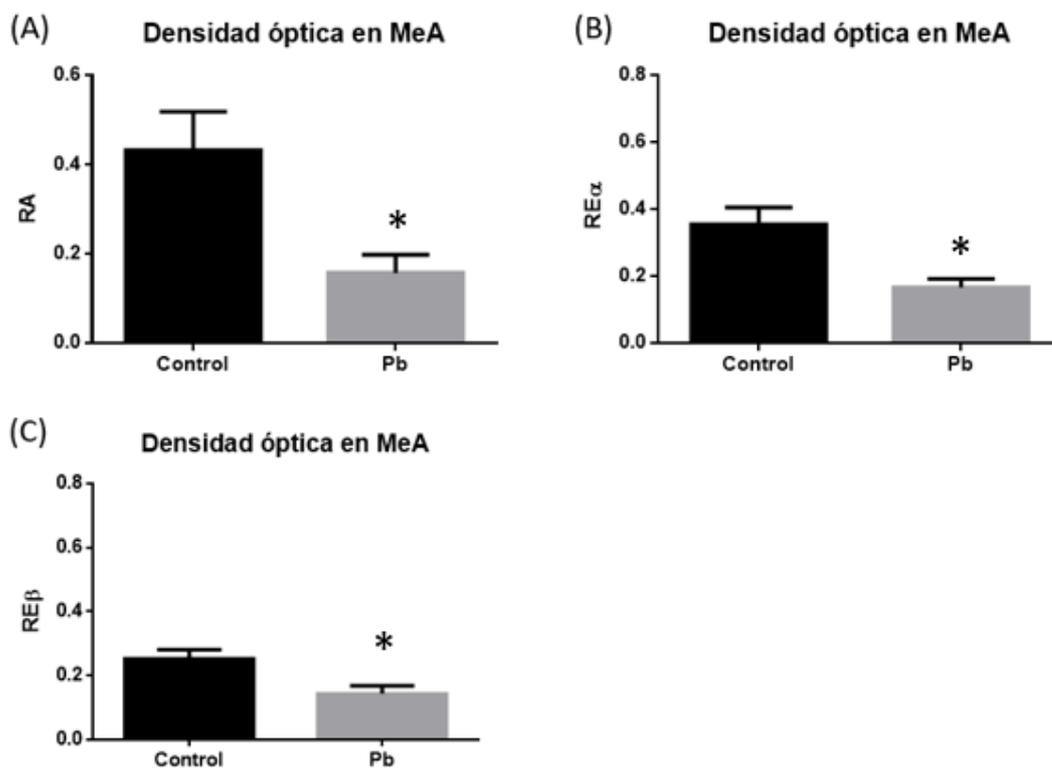


Figura 21. Densidad óptica en un área de  $40,000 \mu\text{m}^2$  en MeA. Se observa que los machos expuestos perinatalmente a Pb mostraron menor densidad óptica en MeA con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM,  $n=6$  animales por cada grupo. \* $p < 0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.

### 8.6.1 Evaluación de la población neuronal

Los resultados obtenidos muestran que la población neuronal en los animales expuestos al PB perinatalmente aumento significativamente ( $p=0.0351$ ) en el mPOA ( $100.5 \pm 2.56$  vs  $89.33 \pm 3.69$ ) de los controles (Figura 22, Panel 7). Los mismos datos fueron observados en la población neuronal de la región de la MeA, ( $p=0.0249$ ,  $101.0 \pm 2.97$  vs  $87.67 \pm 3.997$ ) (Figura 23, Panel 8).

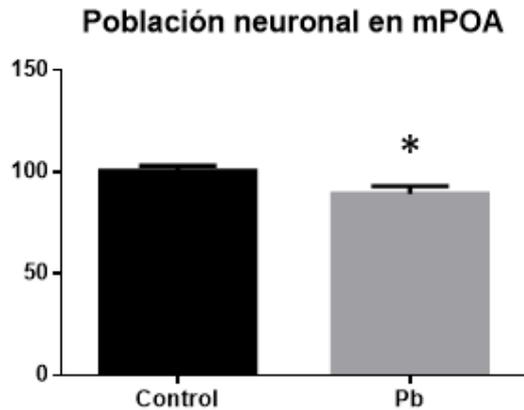
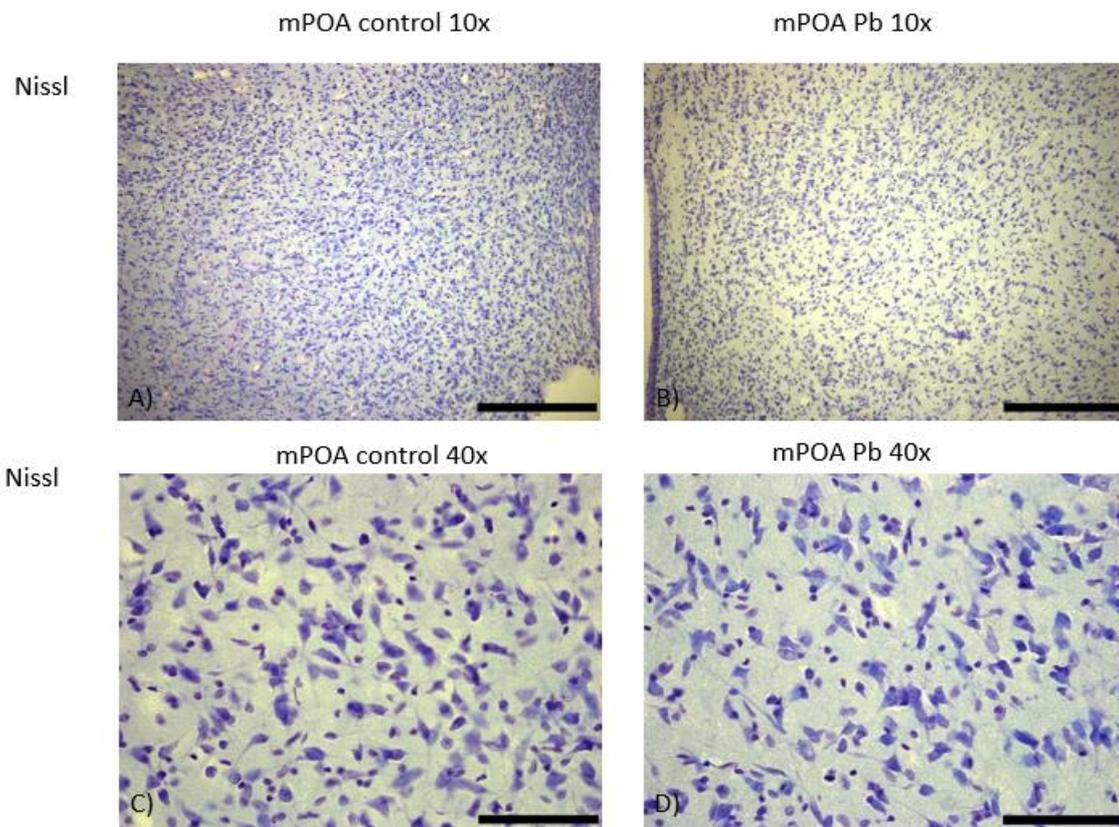


Figura 22. Se muestran los resultados de la población neuronal del APOm (Área preóptica medial) de los animales tratados con Pb, así como de los animales controles, observamos que los animales tratados con Pb presentaron una disminución en sus poblaciones neuronales del mPOA, con respecto a los controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM n= 6 animales por cada grupo. \* $p < 0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.



Panel 7. Se observan los resultados correspondientes a la tinción de Nissl en cortes coronales que muestran la región del mPOA (área preóptica medial) en el hipotálamo. Vista a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de neuronas en la región. n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.

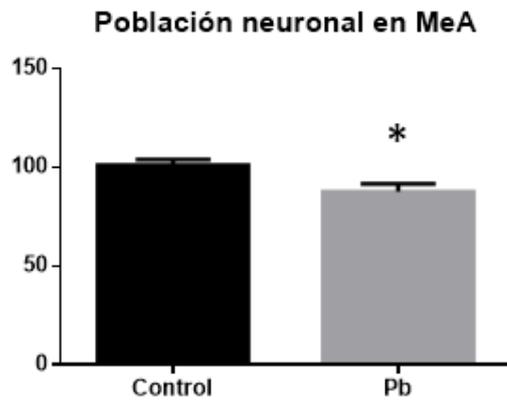
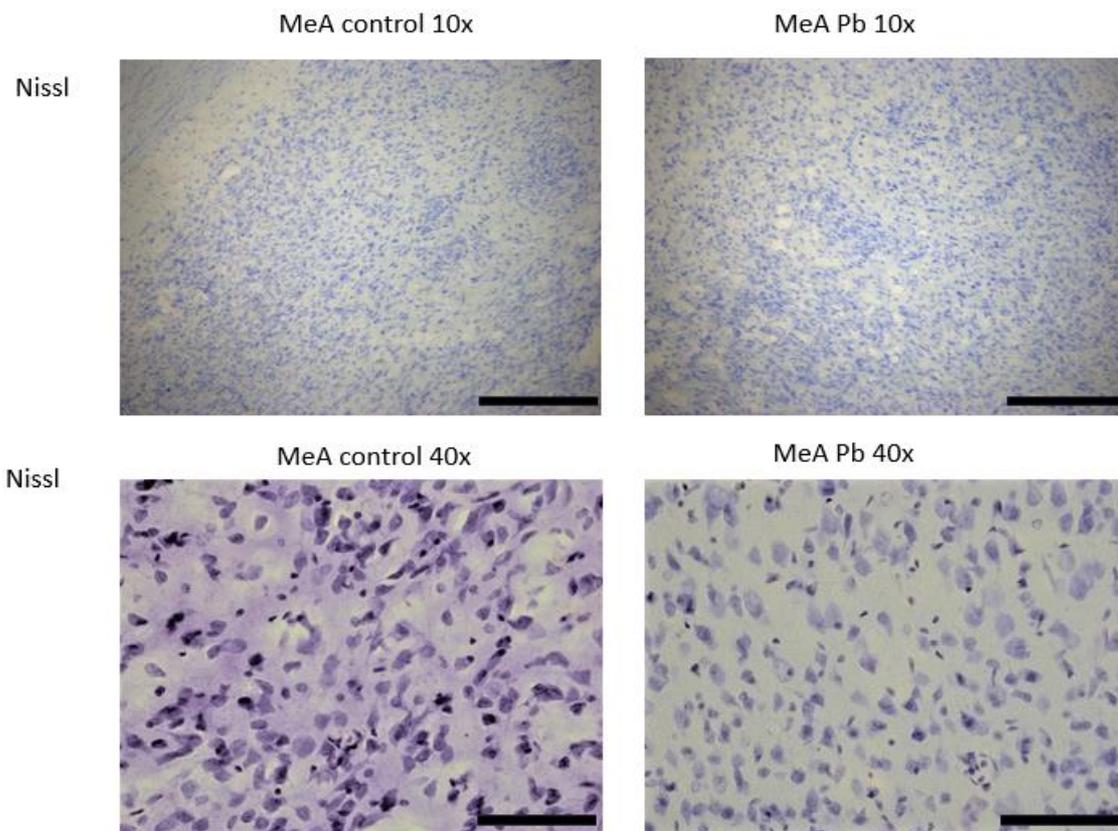


Figura 23. Se muestran los resultados de la población neuronal del MeA (Amígdala medial) de los animales tratados con Pb, así como de los animales controles. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ESM  $n=6$  animales por cada grupo. \* $p<0.05$ , "t" de Student para grupos independientes.



Panel 8. Se observan los resultados correspondientes a la tinción de Nissl en cortes coronales que muestran la región de la MeA (amígdala medial) en el hipotálamo. Vista a 10x de sujeto control y expuesto a Pb (A y B respectivamente) y los mismos a 40x (C y D). Se observa que los animales expuestos a Pb presentan menor número de

neuronas en la región. n= 6 animales por cada grupo. Escala de barra: 350  $\mu$ m.

## 9. Discusión

En el presente trabajo encontramos que la exposición a acetato de Pb al 0.2% (320 ppm) durante la gestación y lactancia en la rata Wistar afecta los pesos de los neonatos, bioacumulándose en diversos órganos incluyendo regiones cerebrales, perdurando hasta la edad adulta. Así también, observamos alteraciones en diversos parámetros de la CSM, en la presencia de receptores para andrógenos y estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ , en mPOA y MeA, así como el número de neuronas en estas regiones. Además, la administración oral de acetato de Pb se bioacumuló en diferentes órganos y en sangre de las madres gestantes, aumentando significativamente sus concentraciones de Pb en comparación con las madres controles (Figura 8), aunque las concentraciones del metal en sangre y tejidos fueron significativamente mayores en las madres que en los hijos (Figura 13), esto sugiere que parte del Pb que no pasó a las crías se quedó en los tejidos de sus madres. El Pb que pasó a los fetos en desarrollo (Huel y cols., 1992; Gardella, 2011), podría hacerlo a través de los canales para Ca y Zn o incluso por la molécula transportadora de cationes divalentes 1 "DCT1" (Ballatori, 2002).

En cuanto a los pesos de los individuos expuestos a Pb al nacimiento como al destete (Figura 9), se observó una disminución significativa en sus pesos corporales, así como lo reportado por Sant'Ana y cols., 2001. En adultos de tres meses de edad previo a la eutanasia, observamos que los sujetos tratados con Pb pesaban significativamente más que los controles (Figura 9C), se sabe que la exposición al Pb en el desarrollo se ha asociado con un menor peso corporal al nacimiento y la aparición tardía de obesidad en los ratones, como lo reportaron Faulk y colaboradores en un estudio del 2014, donde se administró acetato de Pb con una dosis de 32 ppm (0.02%) desde 2 semanas antes de la cópula hasta la lactancia, el cual se asoció con un aumento en la ingesta de alimentos, peso corporal, grasa corporal total, gasto de energía, actividad y respuesta a la insulina en ratones de 180 días. Esta ganancia de peso podría deberse a que como mencionamos anteriormente, el Pb interfiere con una gran cantidad de procesos fisiológicos, pero al ceder el suministro del metal y éste ser eliminado paulatinamente del organismo (como observamos al comparar las

concentraciones de Pb en sangre y cerebro) quizá pudo llevarse a cabo alguna compensación homeostática o un estado de ansiedad, que si bien no se midió en este experimento, fue observada en los individuos tratados con Pb, y se conoce que esta produce entre otras cosas, un aumento en la ingesta de alimento, como bien reportaron los mismos Faulk y colaboradores, así como estudios de Jurczak y colaboradores en 2018, donde reportaron una relación entre el nivel de Pb y la gravedad de la ansiedad. Esto pudo promover un aumento en la ingesta de alimento y por lo tanto el peso de los individuos.

La exposición perinatal a acetato de Pb tuvo repercusiones conductuales a largo plazo, como observamos al evaluar la conducta sexual ejecutoria, donde observamos un aumento en las latencias de montas y el número de estas (Figura 10), lo cual se vio reflejado en un aumento en el número de intentos que los animales realizaron antes de eyacular, lo que podría interpretarse como una imposibilidad de estos machos para copular; y verse aumentadas las latencias de monta y de intromisión, parámetros que también son considerados índices de motivación sexual, así como mayores latencias de eyaculación y los periodos post eyaculatorios o refractarios (Figura 11), coincidiendo con el mismo trabajo de Sant'Ana y colaboradores en donde al administrar el acetato de Pb al 0.1% en el agua potable durante 7 días abarcando el día 21 de gestación hasta la primera semana de vida de los neonatos, donde se observó en la madurez sexual un aumento significativo en las latencia de la eyaculación, en el número de montas, y en la duración del periodo post eyaculatorio. También Mokhtari y Zamboori en 2011 encontraron que el acetato de Pb al 0.01% (100 mg/kg) administrado por 28 días en el agua potable en ratas adultas provocaba una disminución en la conducta sexual masculina, disminuyendo el número de intromisiones, así como la eficiencia copulatoria en los individuos expuestos al tratamiento con Pb, con respecto a los controles. Estos resultados sugieren que el Pb podría estar afectando el período crítico del SNC, en donde existe una mayor susceptibilidad al efecto de las hormonas esteroides para organizar el sustrato y la función del SNC (Herrera Gutiérrez y cols., 2005), ocasionando el Pb una reducción en la T o incluso por las alteraciones de este metal en la síntesis de gonadotropinas (Biswas y Ghosh, 2004) y de esta forma tener repercusiones sobre el neurodesarrollo de estructuras como mPOA y MeA, afecciones que pueden persistir en la etapa adulta y afectar la conducta

reproductiva de los individuos y la perpetuación de muchas especies de vertebrados. Algo destacable es que se muestra un mayor número de montas por parte de los individuos expuestos a Pb con respecto a los controles. Sin embargo, al comparar con el número de intromisiones (Figura 10) de estos se refleja un bajo rendimiento por parte de los tratados con Pb, que posteriormente se refleja en el *Hit rate* (Figura 11). McGivern y colaboradores en 1991 a pesar de que no evaluaron conducta sexual masculina, observaron que en los machos tratados con Pb al 0.1% únicamente durante la tercera semana de gestación mostraron significativamente menor número de marcaje territorial y menor agresividad, comportamiento característico del sexo masculino en comparación con los controles. Estas repercusiones sobre la CSM pueden ser causadas por las afectaciones neuroendócrinas de este metal en los organismos.

Estas anomalías en la conducta sexual pueden estar mediadas por diversos factores, uno de los más importantes es la T (Figura 15). Múltiples trabajos han reportado disminución de este andrógeno por la administración del acetato de Pb como en el trabajo Mokhtari y Zamboori, los cuales observaron que los machos expuestos a Pb presentaban una disminución significativa de T al compararlos con las de los sujetos control, en diferentes dosis y esquemas de administración (Biswas y Ghosh, 2004; Ronis y cols., 1995; Pillai y cols., 2011). Por su parte, Ronis y colaboradores en 1995 administraron acetato de Pb al 0.6% de manera perinatal crónica, hasta los 85 días de edad y encontraron concentraciones menores de testosterona, Pillai y colaboradores en 2011 también reportaron disminuciones de T en los machos al haber suministrado acetato de Pb durante la gestación y lactancia por vía subcutánea a 0.000005% (0.05 mg/kg) y evaluar a los 56 días de edad. Esto reafirma que, pese a que puedan realizarse exposiciones a Pb en diferentes concentraciones, el Pb es capaz de afectar parámetros reproductivos a diferentes niveles del individuo y que no presenta una concentración umbral para ejercer su toxicidad (OMS, 2018). Esto podría ser en parte debido a que la administración de Pb disminuye la actividad de las 3 $\beta$ -HSD y 17beta-HSD, enzimas críticas durante la biosíntesis de T (Biswas y Ghosh, 2004). Además, de que se ha reportado que el Pb puede actuar a diferentes niveles en el eje hipotálamo-hipófisis-gonada ya que se han reportado, disminuciones en la concentración de FSH y LH, hormonas hipofisiarias necesarias para estimular la biosíntesis de T en las células de

Leydig en machos expuestos a Pb (McGivern y cols., 1991; Ronis y cols., 1995; Biswas y Ghosh, 2004). Ronis y cols., 1995 observó disminuciones de estradiol, LH y FSH en los animales tratados con Pb, coincidiendo con lo reportado por McGivern y su equipo en 1991, al reportar disminuciones de LH y FSH.

La exposición a Pb llevada a cabo desde la etapa embrionaria pudo interferir con la masculinización cerebral prenatal, la cual se lleva a cabo en la última semana de gestación que es dependiente de T y de su principal metabolito E2 (Sato y cols., 2004), los cuales son responsables de controlar el desarrollo de la conducta copulatoria propia del macho (Herrera Gutiérrez, 2005).

Estas hormonas sexuales deben ser reconocidas por RA y RE para que una vez llegada la pubertad, estas mismas hormonas puedan desencadenar efectos activacionales (Matsumoto y cols., 2003). Una posibilidad es que los efectos del Pb podrían llevarse a cabo en la etapa de la gestación, interrumpiéndose la llegada de T (McGivern y cols., 1991; Ronis y cols., 1995; Biswas y Ghosh, 2004), y por tanto de E2 (Ronis y cols., 1995). Al haber menos hormonas sexuales, habría cambios en la expresión de sus receptores y alteraciones en la disponibilidad de estos, así como se presentó en la inmunorreactividad para los RA y RE y que esto contribuya a que los machos presentaran el comportamiento sexual deficiente debido a las bajas concentraciones de T, como se ha reportado por Pilai y cols., 2012. Lo que llevaría a los individuos expuestos a Pb a tener una baja motivación, así como un cerebro parcialmente masculinizado producto de la baja en la concentración de T gestacional provocados por el Pb.

En cuanto a las concentraciones de Pb, observamos que los controles en general poseen algo del metal a pesar de no haber estado expuestos de ninguna forma, lo cual podría sugerirnos que el agua de las tuberías puede contar con Pb en las aleaciones de sus soldaduras (The Joint Academies Committee on the Mexico City Water Supply, Commission y cols., 1995). Observamos también, que en los riñones de las madres se observó una mayor bioacumulación del metal con respecto a otros órganos, esto debido a que el Pb en sangre es procesado por éstos, incrementando sus concentraciones del metal (Sabath, 2012). En los machos tratados con Pb observamos menores concentraciones del metal en sangre que lo reportado por Villeda-Hernández en 2006, utilizando las mismas dosis (320 ppm) durante toda la gestación hasta el día 21 de edad, día en el que se hicieron las determinaciones, mientras que en este estudio las

determinaciones se realizaron hasta los 120 días de edad, deteniendo la administración del metal desde el destete (al día 21 de edad), esta diferencia en los tiempos de determinación del Pb pudo servir para que el metal se almacenara en hueso, y en menor medida expulsando de su organismo por medio de la orina, en el pelo y uñas, y las heces (ATSDR, 2016).

Con respecto a la bioacumulación del Pb en las crías adultas, observamos que retuvieron el metal en estructuras encefálicas como hipotálamo, corteza prefrontal, hipocampo, amígdala medial y bulbos olfatorios hasta el momento de su eutanasia. Si bien, estuvo presente en menores concentraciones que lo encontrado en sangre, fue significativamente mayor con respecto a los controles, como lo reportado por Villeda-Hernández y colaboradores en 2006, al administrar de forma perinatal acetato de plomo a una dosis igual a la nuestra (0.2%) durante la gestación, sacrificando al nacimiento. Por su parte, Gassowska y colaboradores en 2016, administraron oralmente acetato de Pb al 0.1% abarcando de la gestación al destete, y sacrificando a los 28 días de vida. Esta bioacumulación del metal se promueve debido a que la barrera hematoencefálica aún no está madura, pues se conoce que su formación inicia en la tercera semana de gestación, aunque su maduración se alcanza hasta los 12 o incluso 24 días postnatales (Saunders y cols., 2012), por lo que viaja sin restricciones por el líquido cefalorraquídeo atravesando los plexos coroideos a través de las células ependimarias, las cuales cuentan con canales DCT1, que son de las principales vías de entrada del Pb.

Aunque la eliminación de Pb es lenta en el organismo, se han propuesto algunos mecanismos ante una intoxicación por metales pesados. Así, Ximenes da Silva en 2016, sugiere que después de cruzar la barrera hematoencefálica, los iones de Pb son absorbidos por los astrocitos, pues el Pb es capaz de atravesar las membranas celulares mediante transportadores para cationes divalentes DCT1, así como canales de glutamato NMDA, los cuales permiten que el metal ingrese al SNC y viaje mediante el líquido cefalorraquídeo, bioacumulándose principalmente en neuroglia como los astrocitos, así como células ependimarias (Tiffany-Castiglioni y Qian, 2001). El Pb puede aumentar la permeabilidad del agua a lo largo de aquaporina-4 (AQP4), lo que provoca inflamación de las células y liberación de glutamato de los astrocitos por canales aniónicos regulados por volumen (VRAC), aumentando la acumulación extracelular de

glutamato (Gunnarson y cols., 2005). El glutamato actúa a través del receptor NMDA en neuronas y astrocitos, aumentando la concentración de Ca y especies de reactivas de oxígeno (ROS), generando estrés oxidante. Pillai y su equipo en el mismo trabajo también observaron disminución en actividades de la catalasa y superóxido dismutasa contrastando con el aumento en las concentraciones de sustancia reactiva de ácido tiobarbitúrico (marcadores de riesgo de estrés oxidativo) El estrés oxidativo conduce a un aumento en AQP4 y AQP9 en los astrocitos, lo que conduce a la inflamación celular.

Con respecto a la inmunohistoquímica, observamos que la inmunorreactividad de los receptores para andrógenos en el mPOA fue significativamente menor en los animales tratados con Pb con respecto a los controles (panel 1), lo cual podría explicarse mediante la disminución de T, que por medio de sus mecanismos nucleares, estimula la biosíntesis de proteínas para formar nuevos receptores, pero al ser ésta menor, no alcanza a tener una gran cantidad de receptores, pues su retroalimentación es positiva (Davey y Grossmann, 2016). En el caso de los receptores para estrógenos, tanto en sus isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , (panel 2 y 3) requieren E2 para su síntesis, pues al igual que la T, actúa como un factor de transcripción. Al ser el estradiol un metabolito de la T por medio de la enzima aromatasa, es de esperarse que las concentraciones de estradiol también disminuyan, como Ronis y colaboradores reportaron en el trabajo mencionado anteriormente.

En el caso de MeA se sabe que está involucrada principalmente vía aferente por parte del bulbo olfatorio, y eferente hacia el mPOA, además de ser parte del sistema límbico y participar en el sistema de recompensa (Cádiz-Moretti y cols., 2016). En la MeA se encontró menos expresión de RA (panel 4), RE $\alpha$  (panel 5) y RE $\beta$  (panel 6) en los machos expuestos perinatalmente a Pb, con respecto a los controles, es probablemente que este efecto se deba a las mismas razones que en mPOA, en los cuales también observamos menor número de células con receptores, pues estos requieren T o de su aromatización para actuar como estradiol e iniciar la expresión de los receptores, pero la T se ve disminuida por el Pb.

A pesar de que la exposición de Pb solamente abarcó el periodo perinatal, se observó que sus efectos tóxicos pueden perdurar hasta la edad adulta, incluso meses después de dejar la exposición al metal, algo similar a lo observado por McGivern y sus colaboradores en 1991, donde al evaluar a los machos adultos

expuestos al Pb encontraron diversas alteraciones reproductivas, entre ellas una reducción de un 35% en el núcleo dimórfico sexual del hipotálamo. Rojas Castañeda y colaboradores en 2011, encontró una disminución en la densidad celular y expresión de neurotransmisores en el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo al dar un tratamiento con Pb perinatal con una dosis idéntica a la empleada en este trabajo. En este trabajo observamos que el Pb también provocó una disminución en las poblaciones neuronales del área preóptica medial (el cual se contiene el núcleo dimórfico sexual) (panel 7) así como en la amígdala medial (panel 8), mientras que Villeda-Hernández y colaboradores (2006) encontraron una disminución neuronal significativa en corteza parietal, cuerpo estriado, tálamo y cerebelo al administrar la misma dosis que nosotros durante los 21 días de gestación, aunque sacrificando al nacimiento, y no a los 120 días como se realizó en este trabajo, por lo que sugerimos que el Pb puede provocar efectos a largo plazo, posiblemente derivado de la pérdida de neuronas durante el desarrollo.

Antonio y colaboradores en 1998, también encontraron que la exposición a Pb durante los primeros 5 días postnatales en adultos disminuyen las concentraciones de neurotransmisores como serotonina y dopamina, mientras que Gassowska y colaboradores en el estudio anteriormente mencionado, encontraron alteraciones en las sinapsis neuronales como inflamación de los axones y dendritas, estructura de hendidura sináptica espesa y engrosada, así como densidad aumentada de vesículas sinápticas en el área presináptica de corteza prefrontal, cerebelo e hipocampo. Esto nos indica que el Pb no solo es capaz de bioacumularse en diferentes regiones del cerebro, sino que también alterar y disminuir las poblaciones neuronales de éstas, y afecta significativamente la diferenciación y maduración neuronal y su neurogénesis, como lo reportan Engstrom y colaboradores en 2015, por tanto, también podrían ser afectadas sus secreciones neuroendócrinas, como también ha sido el caso de hormonas hipotalámicas como la GnRH, como lo sugieren Sant' Ana y colaboradores en 2001 al encontrar las afectaciones a la conducta sexual masculina anteriormente mencionadas y mitigando estos efectos con suministros de GnRH exógena. Estas disminuciones neuronales pueden deberse a que el Pb promueve una mayor actividad de caspasas-3, y por tanto la apoptosis (Chetty y cols., 2007).

Con estos resultados proponemos el siguiente esquema (Figura 24) de cómo el Pb podría estar actuando. El paso del Pb por el organismo, desde la administración prenatal por medio del agua a las madres gestantes, el cual fue absorbido mediante los enterocitos del intestino delgado, los cuales poseen transportadores de cationes divalentes DCT1, el cual le permite la entrada del metal al organismo. Posteriormente, fue metabolizado por el hígado y ligado por metalotioneínas, las cuales después del filtrado glomerular del metal es absorbido en el túbulo contorneado proximal, provocando un incremento en las concentraciones del metal afectando la homeostasis del calcio y el funcionamiento de la calmodulina, provocando la actividad de las MAP cinasas y un incremento de radicales libres, pudiendo provocar daño renal. El Pb, mediante DCT1 llega al torrente sanguíneo, unido a metalotioneínas o a otras moléculas que utilicen Ca, Fe o Zn, que por su radio iónico similar y mayor electronegatividad lo hace más afín a las moléculas. Atravesando la placenta mediante la sangre con Pb, se pudo afectar el desarrollo, e incluso interrumpir la masculinización cerebral (A), dañados que permanecen en la etapa adulta (B). Al llegar el Pb al SNC, una vez que atraviesa la barrera hematoencefálica por medio de canales de glutamato NMDA, sustituyendo al calcio y provocando excitotoxicidad en las neuronas. Además, por transportadores DCT1 se incrementan las concentraciones de calcio intracelular. A nivel mitocondrial, el Pb se acumula y promueve la liberación de Citocromo C, lo cual desencadena fenómenos de apoptosis y de esta manera puede disminuir el número de neuronas en regiones encefálicas como en el mPOA y la MeA, así como pérdida de células en otros tejidos, como las células de Leydig, provocando una disminución en las concentraciones de T. Trayendo como consecuencia una disminución en parámetros de la conducta sexual, así como en un menor número de neuronas con receptores para andrógenos y estrógenos.

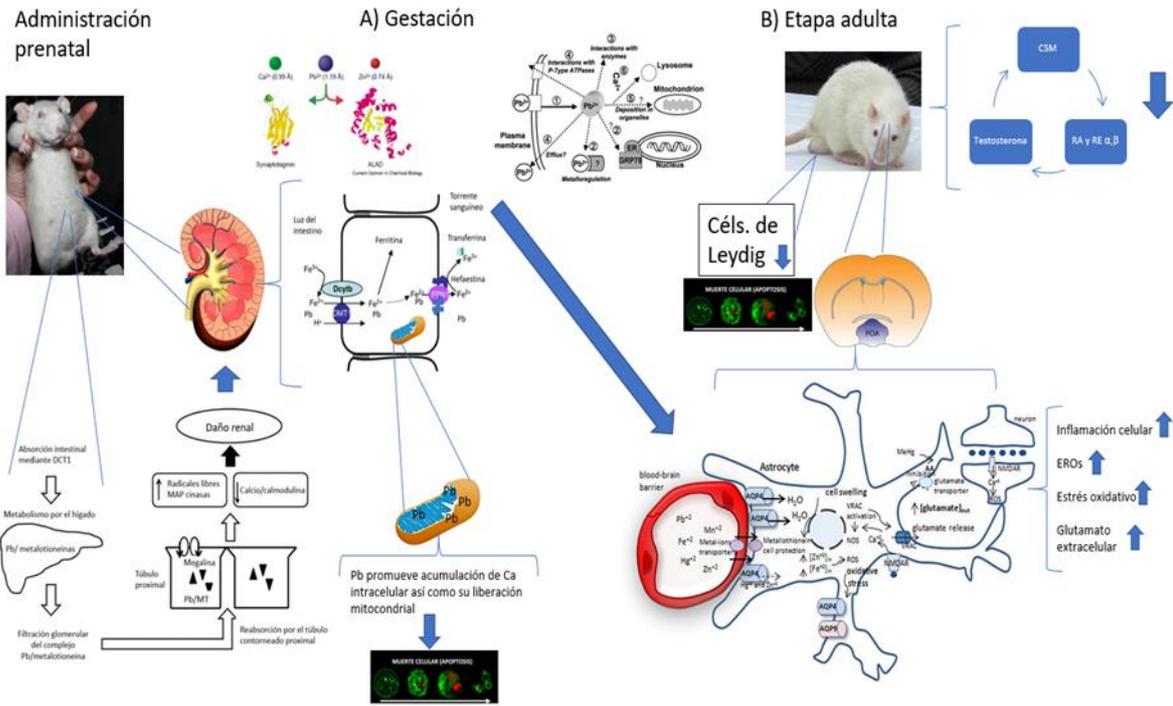


Figura 24. Efectos de la administración de Pb sobre la etapa perinatal y la repercusión en reproducción en la etapa adulta de la rata macho. Obsérvese como el Pb llega al feto a través de la madre (A) y en la etapa adulta de la rata (B) se presenta una disminución en la concentración de T y por consiguiente la alteración de la CSM.

**10. Conclusiones**

El Pb administrado por vía oral durante el periodo perinatal se bioacumula en sangre y tejidos, donde puede permanecer hasta la edad adulta y provocar disminución en la concentración de T, el número de RA y RE y de neuronas en mPOA y MeA y por lo tanto afectar también la CSM, en la etapa adulta de la rata Wistar. Esto sugiere que la exposición al plomo en etapa de desarrollo cerebral en los mamíferos, incluido el humano, podría generar repercusiones en la eficiencia copulatoria y, por tanto, verse afectado el éxito reproductor por parte del macho.



## 11. Referencias

Ágmo, A. (1999). Sexual motivation—an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 105, 129–150.

Ágmo, A. (2010). La conducta sexual desde el punto de vista epicúreo: Reforzamiento, recompensa e incentivos sexuales. En: Aproximaciones al estudio de la motivación y la ejecución sexual. Guevara-Pérez, M. A., Hernández-González, M., Chacón Gutiérrez, L. y Barradas-Bribiesca, J. A. (Eds). Universidad de Guanajuato y Grupo Bioseñales, México. pp. 15-61.

Altman, J., and Bayer, S.A. (1986). The development of the rat hypothalamus. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 100, 1–178.

Amado-Flórez (2003). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. In *Farmacología Humana*, (Barcelona), pp. 887–912.

Arteaga-Silva M., Viguera-Villaseñor R., Hernández-Rodríguez J., Montes-López S., Flores-Mancilla L, Limon-Morales O., and Rojas-Castañeda J.C. (2017). La influencia de los metales pesados en la función reproductiva: alteraciones vinculadas al plomo, mercurio y cadmio. En *Psicobiología Conductual y Cognitiva*, (México: Coordinadores Medina-Fragoso AC), pp. 139–181.

Ascione (2001). Intoxicación por plomo en pediatría. *Arch. Pediatr. Urug.* 72(2), 133–138.

Ballatori (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect.* 110, 689– 694.

Bayer, S.A., and Altman, J. (1987). Development of the preoptic area: Time and site of origin, migratory routes, and settling patterns of its neurons. *J. Comp. Neurol.* 265, 65–95.

Berranoch, E. E. (2015). La amígdala, Organización funcional y su participación en trastornos neurológicos. En *implicancias clínicas de la investigación neurocientífica*. Department of Neurology, Mayo Clinic, Rochester, MN.

Beyer, C., Morali, G., Larsson, K., and Söderstein, P. (1976). Steroid regulation of sexual behavior. *J Steroid Biochem.* 11-12:1171-6.

Biswas, N.M., and Ghosh, P. (2004). Effect of lead on male gonadal activity in albino rats. *Kathmandu Univ. Med. J. KUMJ* 2, 43–46.

Brock O, B.J. and De Mees, C (2015). Hypothalamic expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and androgen receptor is sex-, age- and region-dependent in mice. *J Neuroendocrinol.* 4, 264–276.

Cádiz-Moretti, B., Otero-García, M., Martínez-García, F., and Lanuza, E. (2016).

Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Struct. Funct.* 221, 1033–1065.

Cámara minera de México (2006). Manual para el manejo ambientalmente responsable del plomo. (México: Industrias Peñoles), pp. 41–46.

Canfield, R.L., Henderson, C.R., Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A., and Lanphear, B.P. (2003). Intellectual Impairment in Children with Blood Lead Concentrations below 10  $\mu\text{g}$  per Deciliter. *N. Engl. J. Med.* 348, 1517–1526.

Chetty, C.S., Vemuri, M.C., Reddy, G.R., and Suresh, C. (2007). Protective effect of 17- $\beta$ -estradiol in human neurocellular models of lead exposure. *NeuroToxicology* 28, 396–401.

Cooke, B.M. (2005). Sexually Dimorphic Synaptic Organization of the Medial Amygdala. *J. Neurosci.* 25, 10759–10767.

Craaig, A., McArdle and Mark S. Roberson, 2015. Neurobiology of male sexual behavior. In: Neill J. D., y cols., editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Fourth edition. New York. pp. 335–378.

Crews, D. (2010). Neural Control of Sexual Behavior. In *Encyclopedia of Animal Behavior*, (Elsevier), pp. 541–548.

Davey, R.A., and Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin. Biochem. Rev.* 37, 3–15.

De Jonge, F.H., Lowerse, A.L., Evers, P., and van de Poll, N.E., Changes in male copulatory behavior after sexual exciting stimuli: Effects of medial amygdala lesions. *Physiol. Behav.* 1992, 52, 327-332.

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

Dominguez, J.M., and Hull, E.M. (2001). Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. *Brain Res*, 917 (2), 225-229.

Dominguez, J.M., and Hull, E.M. (2005). Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physéol Behav*, 8 (3), 356-368.

Dominguez, J.M., Muschamp, J.W., Schmich, J.M., and Hull, E.M. (2004). Nitric oxide mediates glutamate-evoked dopamine release in the medial preoptic area. *Neurosci*, 125 (1), 203-210.

Domínguez-Salazar, E., Bateman, H.L., and Rissman, E.F. (2004). Background matters: the effects of estrogen receptor alpha gene disruption on male sexual behavior are modified by background strain. *Horm. and Behav.* (46): 482-490

Doumouchtsis, K.K., Doumouchtsis, S.K., Doumouchtsis, E.K., and Perrea, D.N. (2009). The effect of lead intoxication on endocrine functions. *J. Endocrinol. Invest.* 32, 175–183.

Eder, I.E., Culig, Z., Putz, T., Nessler-Menardi, C., Bartsch, G., and Klocker, H. Molecular biology of the androgen receptor: from molecular understanding to the clinic. *Eur. Urol.* 2001; 40:241-51

Enmark, E. and Gustafsson, J. A. (2001). Oestrogen receptors – an overview. *J. Int. Med.* (246): 133-138

Engstrom, A., Wang, H., and Xia, Z. (2015). Lead decreases cell survival, proliferation, and neuronal differentiation of primary cultured adult neural precursor cells through activation of the JNK and p38 MAP kinases. *Toxicol. In Vitro* 29, 1146–1155.

Everitt, B.J. (1990). Sexual motivation: a neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14 (2), 217-232.

Faulk, C., Barks, A., Sánchez, B.N., Zhang, Z., Anderson, O.S., Peterson, K.E., and Dolinoy, D.C. (2014). Perinatal Lead (Pb) Exposure Results in Sex-Specific Effects on Food Intake, Fat, Weight, and Insulin Response across the Murine Life-Course. *PLoS ONE* 9, e104273.

Fernández-Guasti, A., Arteaga-López, P., and Antonio-Cabrera, E. (2010). Copulation modifies AR and ER $\alpha$  mRNA expression in the male rat brain. *Physiol. Behav.* 101, 738–745.

Ferretti A., Caulo M., Del Gratta C., Di Matteo R., Merla A., Montorsi F., Pizzella V., Pompa P., Rigatti P., Rossini P.M., Salonia A., Tartaro A., Romani G.L. Dynamics of male sexual arousal: distinct components of brain activation revealed by fMRI. *Neuroimage.* 2005 Jul 15;26(4):1086-96.

Florea, Jasmin Taban, Elizabeth Varghese, Blane T. Alost, Stacy Moreno, and Dietrich Büsselberg. (2013). Lead (Pb<sup>2+</sup>) neurotoxicity: Ion-mimicry with calcium (Ca<sup>2+</sup>) impairs synaptic transmission. *J. local glob. health sci.* Abril 4 4, 1–38.

Gardella, C. (2001). Lead exposure in pregnancy: a review of the literature and argument for routine prenatal screening. *Obstet. Gynecol. Surv.* 56, 231–238.

Garza, A., Vega, R., and Soto, E. (2006). Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 12, RA57-65.

Gandhi, J., Hernandez, R.J., Chen, A., Smith, N.L., Sheynkin, Y.R., Joshi, G., and Khan, S.A. (2017). Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning. *Zygot.* 25, 103–110.

Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor

monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* 15:391-407.

Godwin, H.A. (2001). The biological chemistry of lead. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 223–227.

Goyer, A.R. (1993). Lead toxicity: Current concerns. *Environ. Health Perspect.* 100, 177-187

Greco, B., Edwards, D.A., Michael, R.P., and Clancy, A.N. (1998). Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinol.* 67:18–28.

Greene, G., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Scienc.* 231, 1150–1154.

Gunnarson, E., Axehult, G., Baturina, G., Zelenin, S., Zelenina, M., and Aperia, A. (2005). Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4. *Neurosci.* 136, 105–114.

Gurer, H., and Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* 29, 927–945.

Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., and Claessens, F. (2007). The Hinge Region Regulates DNA Binding, Nuclear Translocation, and Transactivation of the Androgen Receptor. *Cancer Res.* 67, 4514– 4523.

Hamp, N., Zimmerman, A., and Hoffen, J. (2018). Advocating for Automatic Eligibility for Early Intervention Services for Children Exposed to Lead. *Pediatr. Ann.* 47, e413–e418.

Harding, S.M., McGinnis, M.Y., (2004). Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN: effects on male sociosexual behaviors. *Physiol. Behav.* 81:671–80

He, X., Wu, J., Yuan, L., Lin, F., Yi, J., Li, J., Yuan, H., Shi, J., Yuan, T., Zhang, S., et al. (2017). Lead induces apoptosis in mouse TM3 Leydig cells through the Fas/FasL death receptor pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56, 99–105.

Heinlein, C.A., and Chang, C. (2002). The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Mol. Endocrinol.* 16, 2181–2187.

Heinlein C.A., and Chang C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr.*; 23:175- 200

Herbison, A.E. Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction.* 5. San Diego, CA, USA: Elsevier Inc.; 2015. p. 399–467

Hernández-González, M. and Prieto-Beracochea, C.A. (2002). Un acercamiento a la Motivación. En. Hernández –González ed. Motivación animal y humana. 1a ed. Manual moderno. pp. 3-17.

Herrera Gutiérrez, H., Vergara Onofre, M., Rosado García, A., and Rosales Torres, A.M. (2005). Sexual differentiation in the central nervous system. *Vet. Méx.*, 36(6): 339- 360

Hewitt, S., and Korach, K. (2002). Estrogen Receptors: Structure, Mechanisms and Function. 3:193-200.

Honda, S. H., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y., and Macda, S. (1998). Disruption of Sexual Behavior in Male AromataseDeficient Mice Lacking Exons 1 and 2 of the cyp19 Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252:445-449.

Hull, E.M., Du, J., Lorrain, D.S., and Matuszeich, L. (1995). Extracellular dopamine in the medial preoptic area: implications for sexual motivation and hormonal control of copulation. *Journal Neurosci*, 15 (11), 7465-7471.

Huel G., Tubert P., Frery N., Moreau, T., and Dreyfus, J. (1992). Joint effect of gestational age and maternal lead exposure on psychomotor development of the child at six years. *Neurotoxicol.* 13:249–54.

Hull, E., Wood, R. I. and McKenna, K. E. (2006). Neurobiology of male sexual behavior. In: Neill J. D., y cols., editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Third edition. New York. pp. 1729–1824.

Hull, E.M., and Dominguez, J.M. (2015). Male Sexual Behavior. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (Elsevier), pp. 2211–2285.

Humphrey, T. (1968). The development of the human amygdala during early embryonic life. *J. Comp. Neurol.* 132, 135–165.

Hurtazo, H.A., Paredes, R.G., and Ágmo, A. (2008). Inactivation of the medial preoptic area/anterior hypothalamus by lidocaine reduces male sexual behavior and sexual incentive motivation in male rats. *Neurosci.* 152, 331–337.

Jelliffe-Pawlowski, L.L., Miles, S.Q., Courtney, J.G., Materna, B., and Charlton, V. (2006). Effect of magnitude and timing of maternal pregnancy blood lead (Pb) levels on birth outcomes. *J. Perinatol.* 26, 154–162.

Jurczak, A., Brodowska, A., Szkup, M., Prokopowicz, A., Karakiewicz, B., Łój, B., Kotwas, A., Brodowska, A., and Grochans, E. (2018). Influence of Pb and Cd levels in whole blood of postmenopausal women on the incidence of anxiety and depressive symptoms. *Ann. Agric. Environ. Med.*

Kang H.Y., Cho C.L., Huang K.L., Wang J.C., Hu Y.C., and Lin H.K. Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2004; 19:1181- 90.

- Kaprara, A., and Huhtaniemi, I.T. (2017). The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism*.
- Karama, S., Lecours, A.R., Leroux, J.M., Bourguin, P., Beaudoin, G., Joubert, S., and Beauregard, M. (2002). Areas of brain activation in males and females during viewing of erotic film excerpts. *Hum. Brain Mapp.* 16(1):1-13.
- Kudwa, A.E., Michopoulos, V., Gatewood, J.D., and Rissman, E.F. (2006). Roles of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in differentiation of mouse sexual behavior. *Neurosci.* 138, 921–928.
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to ap-1. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74:311-317.
- Lamont, K.R., and Tindall, D.J. (2011). Minireview: Alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer. *Mol. Endocrinol.* 25:897-907.
- Lidsky, T.I., and Schneider, J.S. (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain: J Neurol.* 126, 5–19.
- Leal-Escalante, C., Baltazar, R., Lino, G., Palazuelos, R., and Meneses, G., (2007). Concentraciones de Plomo en sangre y reprobación de escolares en la ciudad de México. *Gac. Méd. Méx.* 143: 5
- Lephart, E.D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 22, 1–26.
- Li, P.J., Sheng, Y.Z., Wang, Q.Y., Gu, L.Y., and Wang, Y.L. (2000). Transfer of lead via placenta and breast milk in human. *Biomed. Environ. Sci.* BES 13, 85–89.
- Lucio, R.A., Tlachi-López, J.L. (2008). Análisis de la cópula y el eyaculado en la rata albina (*Rattus norvegicus*). *Manual de Laboratorio.* Góngora Ediciones. Tlaxcala, México. pp. 1-48.
- MacLean, H.E., Warne, G.L., and Zajac, J.D. (1997). Localization of functional domains in the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 233–242.
- MacLean, H.E., Chu S., Warne G.L., and Zajac, J.D. (1993). Related individuals with different androgen receptor gene deletions. *J. Clin. Invest.* 91:1123–8.
- Matochik, J.A. and Barfield, R.J. (1994). Dissociation of androgen-dependent sociosexual behaviors in response to castration in Long-Evans rats. *Physiol. Behav.* 55(3):533-6.
- Martinez-Haro, M., Taggart, M.A., Martín-Doimeadiós, R.R.C., Green, A.J., and Mateo, R. (2011). Identifying Sources of Pb Exposure in Waterbirds and Effects

on Porphyrin Metabolism Using Noninvasive Fecal Sampling. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6153–6159.

Matsumoto, T., Honda, S., and Harada, N. (2003). Alteration in Sex-Specific Behaviors in Male Mice Lacking the Aromatase Gene. *Neuroendocrinol.* 77, 416–424.

McGivern, R.F., Sokol, R.Z., and Berman, N.G. (1991). Prenatal lead exposure in the rat during the third week of gestation: long-term behavioral, physiological, and anatomical effects associated with reproduction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 206–215.

Meisel, R. L. and Sachs, B. D. (1994). The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Physiol. Reprod.* Raven Press; New York. pp. 3–106

Mendoza-Mendoza T. (2012). “Evaluación de la conducta sexual y expresión de receptores para andrógenos y estrógenos en cerebros de ratas macho Wistar tratadas con cadmio” (Tesis de maestría) Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, Ciudad de México.

Mielke, H.W. (1999). Lead in the inner Cities. *Amer. Sci.*, 87 (1): 62-73.

Mokhtari M., and Zanboori M. (2011). The Effects of Lead Acetate on Sexual Behavior and the Level of Testosterone in Adult Male Rats. *Int. J. Fertil Steril* 5.

Morán-Martínez, J., Carranza-Rosales, P., Morales-Vallarta. M., Heredia-Rojas, J. A., Bassol- Mayagoitia, S., Betancourt-Martínez, N.D., and Cerda-Flores, R.M. (2013). Chronic environmental exposure to lead affects semen quality in a Mexican men population. *Iran J. Reprod. Med.* 11, 267–274.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49–53.

Navarrete-Espinosa, L., Sanín-Aguirre, H., Escandón-Romero, C., Benitez-Martínez, G., Olaiz-Fernández G., and Hernández-Avila, M. (2000). Niveles de plomo sanguíneo en madres y recién nacidos derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud publica Mex.* 42, 391–396.

Needleman, H. (2004). Lead Poisoning. *Annu. Rev. Med.* 55, 209–222.

Pape, H.C. and Pare, D. (2010). Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. *Physiol Rev.* 90(2): 419–463.

Paredes, R.G., Tzschentke, T. and Nakach, N. (1998). Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Res.* 813:1–8.

Parker, M.G. (1995). Estructure and function of strogen receptors. *Vitam. Horm.*

51: 267-287.

Pfaff, D. W. and Ågmo, A. Reproductive motivation. In H. Pashler y R. Gallistel (Eds.), *Steven's Handbook of Experimental Psychology. Volume 3, Learning, Motivation, and Emotion.* (pp. 709-736). New York: Wiley, 2002.

Pfaff, D.W., and Baum, M.J. (2018). Hormone-dependent medial preoptic/lumbar spinal cord/autonomic coordination supporting male sexual behaviors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 467, 21–30.

Pfaus, J. G., Kippin, T. E., and Coria-Avila, G. (2003). What can animal models tell us about human sexual response? *Annual Review of Sex Research*, 14(1), 1-63.

Phillips-Farfán, B.V., Lemus, A.E., and Fernández-Guasti, A. (2007). Increased estrogen receptor alpha immunoreactivity in the forebrain of sexually satiated rats. *Horm. Behav.* 51, 328–334.

Pillai, P., Pandya, C., Bhatt, N., and Gupta, S.S. (2012). Biochemical and reproductive effects of gestational/lactational exposure to lead and cadmium with respect to testicular steroidogenesis, antioxidant system, endogenous sex steroid and cauda-epididymal functions: Testicular steroidogenesis and oxidative stress. *Androl.* 44, 92–101.

Pizent, A., Tariba, B., and Živković, T. (2012). Reproductive Toxicity of Metals in Men. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 63.

Portillo, W., Basañez, E., and Paredes, R.G. (2003). Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain Res.* 961, 10:14.

Portillo, W., Diaz, N.F., Cabrera, E.A., Fernandez-Guasti, A., and Paredes, R.G. (2006). Comparative Analysis of Immunoreactive Cells for Androgen Receptors and Oestrogen Receptor alpha in Copulating and Non-Copulating Male Rats. *J. Neuroendocrinol.* 18, 168:176.

Rana, K., Davey, R.A., and Zajac, J.D. (2014). Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian J Androl.* 16, 169: 77.

Puelles, L., and Rubenstein, J.L.R. (2015). A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model. *Front. Neuroanat.* 9, 27.

Pulido, M.D., and Parrish, A.R. (2003). Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat. Res.* 533, 227:241.

Siiteri, P.K., Murai, G.L. Hammond, J.A. Nisker, W.J. Raymoure, and R.W. Kuhn. (1982). The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 38, 457:510.

Rodríguez Pimentel, Amada Wilkins Gámiz, Santamaría Rodolfo Silva, and Rocío Olvera Romo. (2005). Panorama epidemiológico de las intoxicaciones en México. *Med. Int. Mex.* 123:132.

Rojas-Castañeda, J.C., Viguera-Villaseñor, R.M., Rojas, P., Chávez-Saldaña, M., Pérez, O.G., Montes, S., and Ríos, C. (2011). Alterations induced by chronic lead exposure on the cells of circadian pacemaker of developing rats: Lead and suprachiasmatic nucleus. *Int. J. Exp. Pathol.* 92, 243:250.

Rojas-Castañeda Julio César (2012). Efecto de la administración crónica de acetato de plomo sobre el núcleo supraquiasmático de la rata. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Romano-Torres, M., Phillips-Farfan, B.V., Chavira, R., Rodriguez-Manzo, G., and Fernandez Guasti, A. (2007). Relationship between sexual satiety and brain androgen receptors. *Neuroendocrinol.* 85, 16:26.

Saavedra Juarez, N., Chavez Ramos, J. E.; Gomez Alonso, C., and Rodriguez Orozco, A. R. (2010), Peso y talla bajos asociados a intoxicación crónica por plomo en un grupo de niños provenientes de familias alfareras. *Nutr. Hosp.* 25, 470:470.

Sabath, E., L.N. (2012). Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. *Nefrología.* 32:279-86

Salas, M.A., Valverde, C.A., Sánchez, G., Said, M., Rodriguez, J.S., Portiansky, E.L., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., Donoso, P., and Kranias, E.G., et al. (2010). The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 1298:1306.

Sant'Ana, M.G., Spinosa, H.S., Florio, J.C., Bernardi, M.M., Oliveira, C.A., Sarkis, J.E., and Kakazu, M.H. (2001). Role of early GnRH administration in sexual behavior disorders of rat pups perinatally exposed to lead. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 203:212.

Saunders, N.R., Liddelow, S.A., and Dziegielewska, K.M. (2012). Barrier Mechanisms in the Developing Brain. *Front. Pharmacol.* 3. 29:3:46

Sato, Y., Wada, H., Horita, H., Suzukia, N., Shibuyaa, A., Adachia, H., Katoa, R., Tsukamotoa, T., and Kumamoto, Y. (1995). Dopamine release in the medial preoptic area during male copulatory behavior in rats. *Brain Res.* 692, 66:70.

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K. -i., Krust, A., Yamada, T., et al. (2004). Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1673:1678.

See, R.E., Fuchs, RA, Ledford, C.C., and Mclaughlin, J. (2003). Drug Addiction, Relapse, and the Amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 985,

294:307.

Sikka, S.C., and Wang, R. (2008). Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J. Androl.* 10, 134:145.

Schoenmakers, E., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W., and Claessens, F. (2000). Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J. Biol. Chem.* 275, 12290:12297.

Sharifi, A.M., Baniasadi, S., Jorjani, M., Rahimi, F., and Bakhshayesh, M. (2002). Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neurosci. Lett.* 329, 45:48.

Stoléru, S., Fonteille, V., Cornélis, C., Joya, I. C., and Moulrier, V. (2012). Functional neuroimaging studies of sexual arousal and orgasm in healthy men and women: a review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav. Rev.* 36, 1481:509.

Struzyńska, L., and Rafałowska, U. (1994). The effect of lead on dopamine, GABA and histidine spontaneous and KCl-dependent releases from rat brain synaptosomes. *Acta Neurobiol. Exp.* 54, 201:207.

Sundaram, T., Jeong, G.W., Kim, T.H., Kim, G.W., Baek, H.S., and Kang, H.K. (2010). Time-Course Analysis of the Neuroanatomical Correlates of Sexual Arousal Evoked by Erotic Video Stimuli in Healthy Males. *Korean J Radiol.* 11, 278–285.

Tamayo y Ortiz, M., Téllez-Rojo, M.M., Hu, H., Hernández-Ávila, M., Wright, R., Amarasiriwardena, C., Lupoli, N., Mercado-García, A., Pantic, I., and Lamadrid-Figueroa, H. (2016). Lead in candy consumed and blood lead levels of children living in Mexico City. *Environ. Res.* 147, 497:502.

Tapia-Saavedra, A. (2007). Proponiendo biomarcadores para evaluar las alteraciones en la homeostasis cerebral de hierro y su relación con la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev. Chil. Neuro. Psiquiatr.* 45.

Terrazas-Meraz, M.A., Hernández-Cadena, L., Rueda-Hernández, G.E., Romano-Riquer, S.P., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Téllez-Rojo Solís, M.M., and Hernández-Ávila, M. (2015). Use of lead-glazed ceramic as a source of exposure in children of marginalized indigenous zones of Oaxaca, Mexico. *Salud Publica Mex.* 57, 260:264.

Tiffany-Castiglioni, E., and Qian, Y. (2001). Astroglia as Metal Depots: Molecular Mechanisms for Metal Accumulation, Storage and Release. *Neuro. Toxicol.* 22, 577:592.

Toscano, C.D., and Guilarte, T.R. (2005). Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Res. Rev.* 49, 529:554.

The Joint Academies Committee on the Mexico City Water Supply, Commission

on, Geosciences, Environment, and Resources, National Research Council, Academia, Nacional de la Investigacion Cientifica, A.C., Academia Nacional de Ingenieria, and A.C. (1995). Mexico City's Water Supply: Improving the Outlook for Sustainability (THE NATIONAL ACADEMIES PRESS) 238.

Vadakkadath Meethal, S., and Atwood, C.S. (2005). Alzheimer's disease: the impact of age-related changes in reproductive hormones: The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 62, 257:270.

Van de Wijngaart, D.J., Dubbink, H.J., van Royen, M.E., Trapman, J., Jenster, G. (2012). Androgen receptor coregulators: Recruitment via the coactivator binding groove. *Mol. Cell. Endocrinol.* 352, 57:69.

Verstraeten, S.V., Aimo, L., and Oteiza, P.I. (2008). Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch. Toxicol.* 82, 789:802.

Villeda-Hernandez, J., Méndez-Armenta, M., Barroso-Moguel, R., and Trejo-Solis, M.C., Guevara, J., and Rios, C. (2006). Morphometric analysis of brain lesions in rat fetuses prenatally exposed to low-level lead acetate: correlation with lipid peroxidation. *Histol. Histopathol.* 21, 609:617.

Wagner, K.R., Sharp, F.R., Ardizzone, T.D., Lu, A., and Clark, J.F. (2003). Heme and Iron Metabolism: Role in Cerebral Hemorrhage: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 629:652.

Wersinger, S.R., and Rissman, E.F. (2000). Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *J. of Neuroendocrinol.* 12, 103:110.

White, L.D., Cory-Slechta, D.A., Gilbert, M.E., Tiffany-Castiglioni, E., Zawia, N.H., Virgolini, M., Rossi-George, A., Lasley, S.M., Qian, Y.C., and Basha, M.R. (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 225, 1:27.

Wilson, E.M. (2011). Analysis of interdomain interactions of the androgen receptor. *Methods Mol. Biol.* 776, 113:29.

Wilson, M.A., and Brunger, A.T. (2003). Domain flexibility in the A resolution structure of Pb<sup>2+</sup>-calmodulina. *Acta Crystallogr D Biol. Crystallog.* 59, 1782:1790.

Yamaki, T., and Nobusada, K. (2003) Theoretical Study of Metal-Ligand Bonds in Pb (II) Porphyrins. *J. Phys. Chem. A.* 107, 2351:2355.

Yeh, K.Y., Pu, H.F., Wu, C.H., Tai, M.Y., and Tsai, Y.F. (2009). Different subregions of the medial preoptic area are separately involved in the regulation of copulation and sexual incentive motivation in male rats: A behavioral and

morphological study. Behav. Brain Res. 205, 219:225.

Zhou, F., Chen, Y., Fan, G., Feng, C., Du, G., Zhu, G., Li, Y., Jiao, H., Guan, L., and Wang, Z. (2014). Lead-induced iron overload and attenuated effects of ferroportin 1 overexpression in PC12 cells. Toxicol. In Vitro. 28, 1339:1348.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Caso abierto al tiempo  
No. 00061  
Matrícula: 2163891093

**ACTA DE EXAMEN DE GRADO**

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A PLOMO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA, LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA Y LA INMUNORREACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES PARA ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS EN EL ÁREA PREÓPTICA MEDIAL Y LA AMÍGDALA MEDIAL DE LA RATA.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
27 NOV 2018

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 26 del mes de noviembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO MONTES LOPEZ  
DR. PORFIRIO GOMORA ARRATI  
DRA. PILAR DURAN HERNANDEZ  
DRA. OFELIA LIMON MORALES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaría la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL  
DE: GUSTAVO GUILLEN HERRERA

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

**Aprobar**

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

REVISÓ  
LIC. JULIO CÉSAR DE LARA VASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE  
DR. SERGIO MONTES LOPEZ

VOCAL  
DR. PORFIRIO GOMORA ARRATI

VOCAL  
DRA. PILAR DURAN HERNANDEZ

SECRETARIA  
DRA. OFELIA LIMON MORALES