



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**“POSIBLE EFECTO DEL NEUROTÓXICO (DE-79) SOBRE LA CONDUCTA
SEXUAL MASCULINA EN RATAS WISTAR MACHO DE 4 MESES DE EDAD A
TRAVÉS DE SUS ACCIONES SOBRE LA OXITOCINA Y LA SINTASA DE
ÓXIDO NÍTRICO.”**

TESIS

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biológico

Presenta:

Alejandro Velázquez Alvarado

Directores de Tesis

**Dr. René Garduño Gutiérrez
Q.F.B. Patricia Vidal Millán**

Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al laboratorio de Neuromorfología Funcional, en la división de investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón De La Fuente Muñiz", a cargo de la Dra. Martha León Olea, por todas las facilidades otorgadas y al proyecto NC093290.0 por el patrocinio de reactivos.

Así también, se le agradece al laboratorio 18 del CINVESTAV sede Sur, a cargo de la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, por proporcionar los animales y hormonas utilizadas en este trabajo.

DEDICATORIA

ABREVIATURAS

- **5HT:** Serotonina
- **Amig:** Amígdala
- **APOM:** Área Preóptica Media
- **ASB:** Albúmina sérica bovina
- **ATV:** Área Tegmental Ventral
- **CPFm:** Corteza prefrontal media
- **DA:** Dopamina
- **DE-79:** Difenil éter 79
- **DO:** Densidad óptica
- **E:** Eyaculación
- **I:** Intromisión
- **IPE:** Intervalo post-eyaculatorio
- **IR-OT:** Inmunorreactividad a Oxitocina
- **IR-SOxN:** Inmunorreactividad a Sintasa del Óxido Nítrico
- **KDa:** Kilodaltones
- **LE:** Latencia de eyaculación
- **LI:** Latencia de intromisión
- **M:** Monta
- **NAcc:** Núcleo Accumbens
- **ON:** Óxido nítrico
- **NPV:** Núcleo Paraventricular
- **NSO:** Núcleo Supraóptico
- **OT:** Oxitocina

- **OTr:** Receptor a oxitocina
- **PBS:** Solución amortiguadora de fosfatos complementada con 0.9% de cloruro de sodio
- **PBDE:** Polibromodifenil éteres
- **PCB:** Bifenilos policlorados
- **PM:** Peso molecular
- **RC:** Reinicio de cópula
- **SML:** Sistema mesolímbico
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SOxN:** Sintasa de Óxido Nítrico
- **T4:** Tiroxina
- **VP:** Vasopresina

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Neurotóxicos Polibromodifenil Éteres (PBDE).....	3
1.1.2. ¿Cómo actúa un retardante de flama?	4
1.1.3. Interacción de los PBDE con el ser humano.....	6
1.1.4. Vida media de los PBDE en el organismo	6
1.1.5. Mecanismos de acción en el organismo	7
1.1.5.1. Interferencia con la señalización de calcio	8
1.2. Conducta sexual	8
1.2.1. Conducta sexual de la rata macho.....	9
1.2.2. Conducta precopulatoria	10
1.2.3. Conducta copulatoria	10
□ Monta	11
□ Intromisión.....	11
□ Eyaculación	11
1.2.4. Parámetros evaluados en la conducta sexual masculina de la rata.....	12
□ Numéricos	12
□ Temporales.....	12
1.2.5. Conducta sexual como modelo de estudio.....	13
1.3. Áreas cerebrales involucradas en la conducta sexual masculina	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVO GENERAL	22
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	23

5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
5.1 METODOLOGÍA.....	24
5.1.1. Animales.....	24
5.1.2. Pruebas de conducta sexual.....	24
5.2 Determinación de OT y SOxN por medio de doble inmunohistoquímica de fluorescencia y microscopia confocal.....	26
5.2.1. Diseño experimental.....	26
5.2.2. Procedimiento inmunohistoquímico.....	27
5.2.3. Análisis de la inmunofluorescencia.....	28
5.3. Determinación de la expresión del receptor a oxitocina y actina por medio western blot.....	31
5.3.1 Protocolo de homogenización del tejido para western blot.....	31
5.3.2 Western blot.....	32
6. RESULTADOS	34
6.1 Influencia del DE-79 sobre la conducta sexual masculina	34
6.2 Influencia del DE-79 sobre la expresión de OT y SOxN en diferentes áreas cerebrales involucradas con la cópula.....	36
6.3 Influencia del DE-79 sobre la expresión del receptor a Oxitocina (OTr) en la conducta sexual masculina	40
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	42
8. CONCLUSIONES	45
9. PERSPECTIVAS	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

INTRODUCCIÓN

Las sustancias químicas tienen un papel crucial en la vida diaria de los seres humanos, ya que están presentes en un número importante de cosas que nos rodean. Los contaminantes ambientales, polibromodifenil éteres (PBDE), son compuestos organobromados, utilizados como retardantes de flama y se les puede encontrar en diversos aparatos electrónicos, textiles, muebles, tapizados, etc. Estos compuestos permiten que el material que los contiene resista al fuego cuando se expone a una fuente de ignición de baja energía, como un cigarrillo, un fósforo, una vela, o un quemador de cocina.

Sin embargo, en el momento en que fueron diseñados y fabricados este tipo de compuestos no fueron estudiadas sus consecuencias a corto, mediano y largo plazo sobre la salud de los seres humanos y las consecuencias en el medio ambiente. Por lo anterior es que en la actualidad existen pequeños grupos de investigadores, los cuales se han dedicado a desarrollar diversos modelos experimentales para así entender y analizar los mecanismos de acción de estas sustancias en el organismo al ser usadas indiscriminadamente.

En este trabajo, se desea conocer si los contaminantes ambientales PBDE, en particular el difenil éter 79 (DE-79, componente de las mezclas de retardantes de flama que se usan más frecuentemente en el comercio), provocan alteraciones a nivel de conducta sexual, especialmente en áreas cerebrales relacionadas con ésta, así como en algún neurotransmisor involucrado en la regulación de la misma. Se ha reportado que algunos PBDE, guardan cierto grado de similitud estructural

con algunas hormonas esteroideas que participan en la modulación del proceso conductual, lo cual pudiera afectar la expresión de la conducta sexual.

Debido a esto, se diseñó un modelo experimental que permitió llevar a cabo en tiempo y reproducibilidad la observación y registro de los efectos del contaminante DE-79 sobre la conducta sexual masculina de la rata, y determinar si dichos cambios se deben a alteraciones en la expresión de oxitocina (OT, neurotransmisor) y la sintasa de óxido nítrico (SOxN, enzima que participa en la síntesis de óxido nítrico), sustancias involucradas en la regulación de la conducta sexual, en las áreas cerebrales donde se ha reportado su existencia, las cuales se mencionan a detalle más adelante.

Una vez registrada la conducta sexual, dicho fenómeno se reportó en medidas de respuestas sexuales, las cuales se dividieron en parámetros numéricos y temporales, durante 3 series copulatorias. Posteriormente, se utilizaron estos mismos animales para determinar el grado de expresión de OT y SOxN en diferentes áreas cerebrales por medio de inmunohistoquímica de doble fluorescencia y ser analizados por medio de microscopía confocal. Finalmente se determinó si existe una diferencia significativa en el efecto que produce este contaminante ambiental sobre organismos vivos reflejándose en una expresión natural como lo es la conducta sexual.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Neurotóxicos Polibromodifenil Éteres (PBDE)

Los PBDE son una clase de hidrocarburos bromados estructuralmente similares entre ellos, en los cuales de 2-10 átomos de bromo están unidos a la estructura molecular principal (Figura 1). Existen 209 posibles combinaciones moleculares (llamadas congéneres) para los PBDE; aunque sólo existe un número limitado utilizado en mezclas comerciales. Basándose en el número de sustituyentes de bromo, hay 10 grupos homólogos de congéneres de PBDE que van desde monobromados hasta los decabromados (ATSRD, 2015). La estructura química general de los PBDE se muestra a continuación:

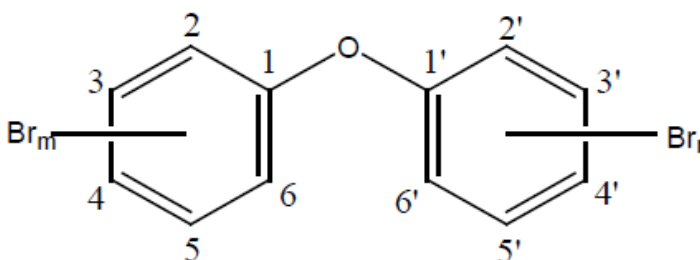


Figura. 1: Estructura química de los PBDE. Br, bromo; m y n, número de bromos unidos a la estructura principal (tomado de: ATSRD, 2015).

Estos compuestos son utilizados en la inhibición de la ignición y propagación del fuego o como retardantes de la fase inicial del mismo (Birnbbaum y Cohen-Hubal, 2006); se encuentran en una variedad de bienes de consumo, como artículos electrónicos y electrodomésticos, materiales de construcción, espumas, telas, muebles tapizados, etc. (Hale y Col., 2006; Harrad y Col., 2008; Abdallah y Col.,

2009; Lagalante y Col., 2009), lo que los hace compuestos altamente frecuentes en la vida cotidiana de los seres humanos.

1.1.2. ¿Cómo actúa un retardante de flama?

Un retardante de flama halogenado sigue un mecanismo de interacción con los radicales libres presentes en la fase gaseosa (Ulsamer y Col., 1980). Cuando se expone a altas temperaturas, libera radicales libres de halógeno (X^\cdot) los cuales reaccionan con las moléculas de gas del combustible, el producto de estos reacciona con los radicales de alta energía (H^\cdot y OH^\cdot), generando agua y más radicales (X^\cdot) que quedan disponibles para realizar otro ciclo de captura de H^\cdot y OH^\cdot (Troitzsch, 1983), evitando así que se lleve a cabo la ignición (Figura 2) . Por lo tanto, la efectividad del retardante halogenado dependerá de la cantidad de átomos halógenos que contenga y la facilidad que presente para liberarlos.

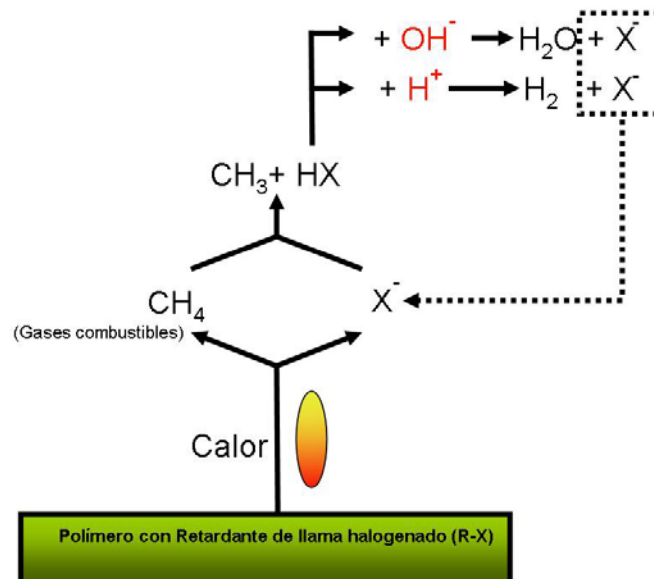


Figura 2: Mecanismo de acción química por captura de radicales de los retardantes de flama halogenados (tomado de: De La Torre-Haro, 2010).

En función del halógeno, podrán existir retardantes de flúor, cloro, bromo e iodo. Teniendo en cuenta que la energía de disociación heterolítica para el enlace carbono-halógeno sigue la siguiente secuencia $C-F > C-Cl > C-Br > C-I$ (*Morrison y Boyd, 1998*) los retardantes de iodo resultarían aparentemente los más efectivos, ya que el enlace C-I es más débil. Sin embargo, existe otro factor condicionante, la estabilidad térmica del retardante con respecto a la del polímero. Para que la efectividad sea máxima el retardante deberá descomponerse $50^{\circ}C$ por debajo de la temperatura de pirólisis del polímero (*Rahman y Col., 2001*). Los retardantes iodados son poco estables, mientras que los más estables son los fluorados y necesitan temperaturas demasiado altas para descomponerse (*Alaee y Col., 2003*). Por este motivo los retardantes de flama halogenados más utilizados son los bromados y los clorados. Dentro de estas dos opciones (bromados y clorados) los bromados resultan ser los más efectivos, debido a que sus enlaces son más débiles, y a que el rango de temperaturas en el que se forma ácido bromhídrico es más estrecho. Por el contrario, el intervalo en el que se forma el ácido clorhídrico (para el caso de los clorados) es más amplio dando como resultado una menor eficiencia en la captura de radicales (*Hindersinn y Wagner, 1967*).

Los retardantes bromados pueden ser: alifáticos, cicloalifáticos y aromáticos. (*Green, 1996*). Es importante que el retardante permanezca estable durante el proceso de fabricación del producto y por este motivo los aromáticos son los más usados (*WHO, 1997; Fabrellas y Col., 2004*).

1.1.3. Interacción de los PBDE con el ser humano.

Debido a su alta lipofilia, solubilidad en agua muy baja, persistencia (unión alta a las partículas del suelo) y bioacumulación (ATSDR, 2015), los PBDE poseen propiedades que les permiten estar presentes en el aire, el agua, así como en peces, aves, animales terrestres y también seres humanos, incluso en regiones lejanas a las zonas industriales (Safe, 1994; Petreas y Col., 2003; Hites y Col., 2004; Yogui y Sericano, 2009). Por lo anterior las principales vías de contaminación para el humano son, la inhalación, la cutánea y la ingestión (ATSDR, 2015).

1.1.4. Vida media de los PBDE en el organismo

La absorción de estos compuestos en los seres vivos se ve facilitada debido a las vías de contaminación antes mencionadas. Sin embargo, su eliminación del organismo es determinada dependiendo del número de sustituciones de bromo en la estructura química principal. La vida media de los PBDE menos bromados es mucho mayor (20-120 días) a la de los compuestos más bromados (PBDE decabromado, menor a 15 días) (Costa y Col., 2014). Se ha reportado que los congéneres menos bromados son más propensos a absorberse a través de los pulmones y estómago para así pasar al torrente sanguíneo (ATSRD, 2015), fenómeno que no ocurre con los más bromados. Los PBDE y sus metabolitos pueden salir del cuerpo, principalmente en las heces y una cantidad muy pequeña en la orina. Los PBDE menos bromados pueden permanecer en el organismo durante muchos años, almacenados principalmente en la grasa corporal. El PBDE decabromado también se acumula en la grasa corporal, pero en menor grado.

Tanto los PBDE de baja bromación como el PBDE decabromado pueden concentrarse en la grasa de la leche materna y pueden ingresar al cuerpo de los niños a través de la lactancia. Los PBDE con bajo contenido de bromo y el PBDE decabromado también pueden ingresar al cuerpo de los bebés a través de la placenta (ATSRD, 2015).

1.1.5. Mecanismos de acción en el organismo

En la literatura existen varios reportes referentes a otros compuestos anteriormente utilizados como retardantes de flama. Dichos compuestos se denominaron como “policlorados bifenilos” (PCB), ya retirados en su mayoría del mercado por sus efectos nocivos a la salud, cuya estructura química es muy similar a los PBDE, por lo que pudieran compartir los mismos mecanismos de acción. En el caso de los PCB, se reportó que afectaban las hormonas tiroideas, causando estrés oxidativo y alteraban la transducción de la señal mediada por Ca^{2+} a nivel neuronal (Kodavanti y Col., 2015); mientras que, para los PBDE, se han descrito dos mecanismos generales: uno indirecto, relacionado con los efectos en las hormonas tiroideas, y el otro con posibles efectos directos en el desarrollo cerebral (Costa y Giordano, 2007; Alm y Scholz, 2010). En la misma línea, se sabe que las hormonas tiroideas desempeñan un papel relevante en el desarrollo cerebral (Chan y Rovet, 2003; LaFranchi y Col., 2005). Dado que, los PBDE son estructuralmente similares a las hormonas tiroideas, pudieran alterar la homeostasis de éstas [como se ha reportado en el caso de la hormona tiroxina (T4) y de los PCB]. Se ha investigado ampliamente la posibilidad de que los PBDE

puedan actuar a través de mecanismos similares a los PCB, aunque en la actualidad aún no hay datos contundentes al respecto (*Zhou y Col., 2001*).

1.1.5.1. Interferencia con la señalización de calcio

Kodavanti y Ward (2005) demostraron que los PBDE interfieren con la homeostasis de Ca^{2+} de una manera similar a los PCB (el DE-71, inhibió la captación de Ca^{2+} en microsomas y, particularmente en las mitocondrias aisladas del cerebro de rata) y más tarde, *Coburn y Col. (2008)* confirmaron estos hallazgos de manera similar con el DE-99 y con el DE-47. Dadas las similitudes entre los PCB y los PBDE, estos últimos pudieran afectar de una manera similar que los primeros, al sistema nervioso central (SNC), la regulación hormonal, el comportamiento y la reproducción (*ATSRD, 2015*).

1.2. Conducta sexual

La reproducción es una función esencial de los organismos vivos, la reproducción sexual, a diferencia de la asexual, permite la recombinación del material genético de dos organismos de la misma especie y de esta forma se asegura y promueve la variabilidad genética. Todos los mamíferos, incluyendo el hombre, se reproducen sexualmente (*Curtis y Barnes, 1993*). Por lo tanto, la conducta sexual es una de las expresiones conductuales más importantes de las especies superiores y constituye un aspecto central en la vida de los mamíferos y mantenimiento de las especies.

Beach y Holz-Tucker (1949) implementaron el uso de modelos animales para el estudio de la sexualidad humana, argumentando que la comprensión de la

neurobiología que sustenta la respuesta sexual se puede llevar a cabo utilizando estos modelos. Lo anterior permitió grandes avances en el conocimiento de las bases neuroanatómicas y los mecanismos neuroquímicos involucrados en la expresión de la conducta sexual; así mismo se inició el estudio de la farmacología sexual (*Pfaus y Col., 2003*).

En los mamíferos, la conducta sexual es un comportamiento natural y espontáneo que está controlado por una sofisticada interacción entre hormonas esteroideas (andrógenos, estrógenos y progestinas) y neurotransmisores en el cerebro [dopamina (DA), noradrenalina, serotonina (5HT) etc.] (*Pfaus y Col., 2001, 2003; Scepkowski, 2005*). Las hormonas esteroideas mantienen la fisiología del deseo y la excitación sexual; esta última se puede definir como el incremento de la activación autonómica que prepara al cuerpo para la actividad sexual (*Pfaus y Col., 2001; Bancroft, 2005; Pfaff, 2005*). Por otro lado, ciertos neurotransmisores como la DA y 5HT, están relacionados con la experimentación de la gratificación sexual, que promueve el aprendizaje y la formación de preferencias asociadas al reforzamiento positivo que provee la actividad sexual y a su vez se genera así, experiencia sexual (*Pfaus y Col., 2001*).

1.2.1. Conducta sexual de la rata macho

La conducta sexual masculina de la rata comprende un complejo patrón estereotipado de respuestas motoras y genitales las cuales son provocadas, dirigidas y mantenidas por señales internas y externas. Entre las señales internas se encuentran la interacción entre hormonas esteroideas (testosterona, estradiol y

progesterona) y neurotransmisores en el cerebro [oxitocina (OT), DA, 5HT, entre otras], mientras que entre las señales externas se incluyen las feromonas (emitidas por las hembras sexualmente receptivas), que a su vez son detectadas por medio de quimiorreceptores presentes en los machos (*Pfaus y Col., 2003; Pfaus y Scepkowski, 2005*). De esta manera el macho puede evaluar su potencialidad de apareamiento con ella (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

La conducta sexual de la rata macho está constituida a su vez por la conducta precopulatoria y la copulatoria, mismas que se describen a continuación.

1.2.2. Conducta precopulatoria

Consiste en una exploración anogenital del macho a la hembra, que puede o no incluir acicalamiento, emisión de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz, que son mutuamente excitantes (*Geyer y Barfield, 1978; Pomerantz y Clemens, 1981*), lo que le permite al macho localizar a una hembra sexualmente receptiva, así como detectar la manifestación de lordosis (una dorsiflexión reflexiva de la columna vertebral, acompañada de una deflexión de la cola hacia un lado) por parte de la misma (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

1.2.3. Conducta copulatoria

La rata macho exhibe un patrón copulatorio altamente estereotipado, formado por tres patrones motores comportamentales distintos: montaje, intromisión y eyaculación (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

➤ **Monta**

Durante la monta, el macho aborda a la hembra dorsalmente y desde atrás, posa sus patas delanteras sobre la espalda de esta y sus patas posteriores en el suelo. La hembra asume una postura de lordosis. El macho entonces realiza movimientos pélvicos sin conseguir la inserción peneana en la vagina de la hembra y posteriormente el macho desmonta a la hembra lentamente (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

➤ **Intromisión**

En la intromisión, el macho monta a la hembra, realizando un empuje pélvico profundo, que coincide con la penetración vaginal, seguido de un desmontaje abrupto con marcha hacia atrás y el aseo de sus genitales (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

➤ **Eyacuación**

En el patrón de eyacuación, el macho monta a la hembra y hace empujes pélvicos en los cuales uno de ellos es más profundo y más largo en tiempo, lo que a su vez coincide con una intromisión y con la expulsión seminal y a la par se observa retracción de los flancos laterales del macho. El acto culmina cuando el macho levanta sus patas delanteras y desmonta lentamente a la hembra (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

1.2.4. Parámetros evaluados en la conducta sexual masculina de la rata

El carácter estereotipado del patrón copulatorio de la rata macho ha conducido al desarrollo de medidas conductuales estandarizadas que se utilizan para evaluar experimentalmente la conducta sexual masculina. Dichos parámetros se pueden clasificar en numéricos y temporales (Figura 3):

- **Numéricos**

Montas: Número de montas que se presenta antes de la eyaculación.

Intromisiones: Número de intromisiones que requiere un animal para alcanzar la eyaculación.

Eyaculaciones: Número de eyaculaciones que preceden a la saciedad sexual (*Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti, 1995*).

- **Temporales**

Latencia de intromisión: Tiempo transcurrido desde la introducción de la hembra a la arena de observación, hasta que se presenta la primera intromisión de la prueba.

Latencia de eyaculación: Tiempo que transcurre desde la primera intromisión de la serie hasta que se presenta la eyaculación que la da por terminada.

Intervalo post-eyaculatorio: Tiempo transcurrido entre una eyaculación y el inicio de una nueva serie, determinado por la siguiente intromisión (*Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti, 1995*).

Cuando se toma en consideración al conjunto de eventos que van desde la LI hasta la LE se le denomina serie eyaculatoria y cuando se considera en estos eventos al IPE se le llama serie copulatoria (Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti, 1995).

PATRÓN COPULATORIO DE LA RATA MACHO

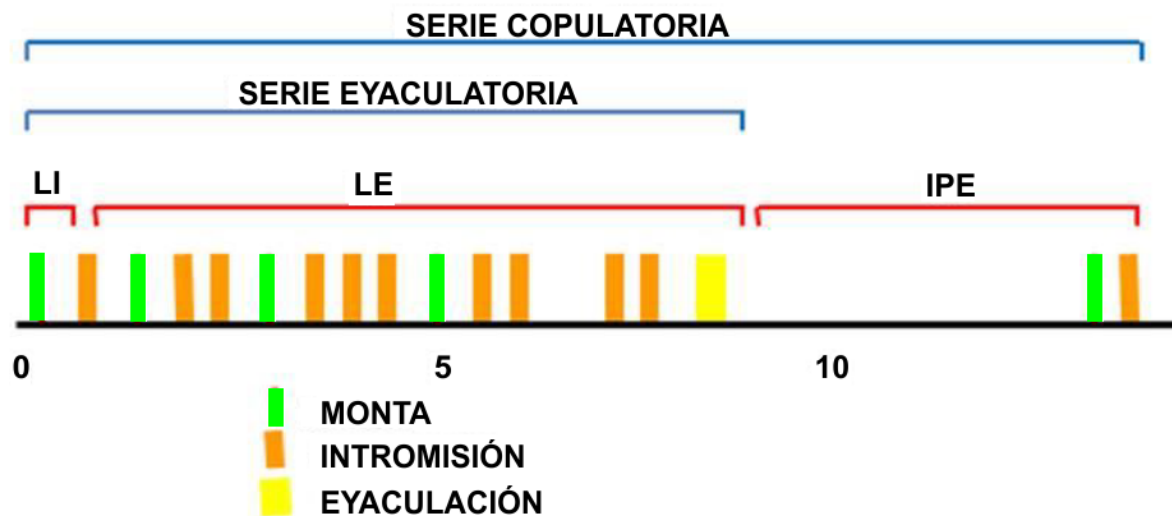


Figura. 3: Parámetros evaluados durante la conducta sexual masculina de la rata. Parámetros temporales (color rojo), LI: latencia de intromisión; LE: latencia de eyaculación; IPE: intervalo post-eyaculatorio y parámetros numéricos, Montas (barras verticales verdes); Intromisiones (barras verticales naranjas); Eyaculaciones (barras verticales amarillas) (Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti, 1995).

1.2.5. Conducta sexual como modelo de estudio

De acuerdo con ciertas diferencias en la expresión de la conducta sexual de la rata macho se han logrado clasificar diferentes modelos experimentales para estudiar la conducta sexual masculina, entre los que se encuentran los individuos:

- **Sexualmente expertos:** Eyaculan en menos de 15 minutos, en 3 de 5 sesiones de entrenamiento.
- **Eyaculadores precoces:** Eyaculan en un rango de tiempo de 0.5 segundos a 4 minutos.
- **Copuladores lentos (Sluggish):** Logran la eyaculación después de 30 minutos.
- **No copuladores:** No realizan copula (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

La experiencia juega un papel importante en la conducta sexual masculina, ya que reduce el tiempo necesario para iniciar la cópula, lograr la penetración, tener la estimulación necesaria para llegar a la eyaculación favoreciendo así que la copula se presente de manera más frecuente (*Pfeiffer y Johnston, 1994; Pfaus y Wilkins, 1995*), llegando así a desarrollar una eficiencia copulatoria por la rata macho (*Domjan, 1992; Pfaus y Col., 2001; Woodson, 2009*).

La capacidad de copulación se adquiere entre los 45 y los 75 días de edad, tiempo en el cual los animales tienen una madurez sexual que les permite ejecutar la conducta sexual de manera óptima (*Meisel y Sachs, 1994*).

1.3. Áreas cerebrales involucradas en la conducta sexual masculina

Dentro del SNC, se encuentra el sistema mesolímbico (SML) el cual está constituido por el área tegmental ventral (ATV) y el núcleo accumbens (NAcc). Este sistema juega un papel importante en la regulación de las conductas motivadas naturales como la ingesta de alimento y agua, así como en la regulación de la conducta sexual y también en los comportamientos adictivos,

como lo es el consumo y abuso a las drogas. Aun cuando se han realizado estudios con diferentes fármacos para entender la vía de la activación y mecanismos de acción que involucran a dicho sistema, se sabe poco sobre su completo funcionamiento en condiciones normales y de su sobre estimulación (*Balfour y Coolen, 2004*). No obstante, existen otras áreas cerebrales (figura 4) involucradas en la conducta sexual masculina, entre las cuales se encuentran:

- **Bulbos olfatorios**

La importancia de las señales quimiosensoriales varía según la especie, pero estas señales son especialmente importantes en roedores y otras especies nocturnas. En esencia, los olores volátiles son transducidos por receptores localizados en la mucosa nasal, cuyos axones se proyectan a hacia el bulbo olfatorio principal. Tanto señales no volátiles como señales volátiles especie-específica se detectan en el órgano vomeronasal ubicado en la base de la cavidad nasal. Las señales vomeronasales son muy importantes en los roedores, pero no tanto en humanos. La bulbectomía olfativa suprime el apareamiento de hámsteres sirios machos. En el caso de las ratas macho, la bulbectomía bilateral comprometió severamente el apareamiento en algunos machos y aumentó la LI y LE en los que lograron copular (Edwards y Col., 1990, 1996; revisado en Hull y Col. 2006).

- **Área preóptica media (APOm)**

Esta área es importante para la regulación del comportamiento sexual masculino. Reportes bibliográficos indican que, lesiones en esta área interrumpen la iniciación de la cópula, así como su rendimiento, lo que

sugiere que contribuye también a la motivación sexual (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*).

La inyección intra-APOm de OT facilitó el apareamiento en ratas macho sexualmente expertas (*Gil y Col., 2011*) y la cópula aumentó el gen del receptor de OT y la expresión de proteínas en esta región del cerebro, lo que sugiere una interacción entre la OT y el comportamiento sexual (*Gil y Col., 2013*). También se ha reportado incrementos en esta área de concentraciones de SOxN durante la conducta sexual (*Domínguez y Col., 2006*).

- **Sistema mesolímbico (SML)**

Comprende cuerpos celulares dopaminérgicos (DA) en el ATV los cuales envían proyecciones ascendentes al NAcc y a la corteza prefrontal media (CPFm). Dicho sistema juega un papel central en los comportamientos motivados (*Alcaro y Col., 2007*). Estudios de estimulación eléctrica han implicado a este sistema en estados positivos gratificantes (*Wise y Rompre, 1989*) y en conductas motivadas por el apetito (*Berridge y Robinson, 1998*). El comportamiento sexual es un comportamiento natural, gratificante y de refuerzo que activa el sistema mesolímbico (*Balfour y Col., 2006*). El ATV y el NAcc, están activados durante la excitación sexual (*Guevara y Col., 2008*). Grabaciones de actividad neuronal en el NAcc de ratas macho durante el comportamiento sexual mostró que muchas neuronas de la corteza del NAcc mostraban cambios de actividad durante la actividad sexual, así como durante el procesamiento relacionado con la recompensa y la inhibición del comportamiento sexual que sigue a la eyaculación

(*Matsumoto y Col., 2012*). Lesiones en el ATV incrementan el IPE (*Brackett y Col., 1986*), mientras que las lesiones del NAcc afectan tanto la copula como las erecciones sin contacto, sugiriendo que el NAcc juega un papel excitatorio en la regulación de la excitación sexual (*Kippin y Col., 2004*). Se ha demostrado que la estimulación eléctrica del ATV facilita la cópula (*Markowski y Hull, 1995*); sin embargo, el efecto facilitatorio es restringido a la porción dorsal del ATV, puesto que la estimulación en la porción ventral inhibe la cópula (*Rodríguez-Manzo y Pellicer, 2007*). Por su parte, la estimulación eléctrica del NAcc facilita la conducta sexual en ratas macho sexualmente expertas, pero carece de efecto en ratas sexualmente saciadas (*Rodríguez-Manzo y Pellicer, 2010*). Se ha reportado que la administración de OT en el ATV induce erecciones (*Melis y Argiolas, 2011*).

- **Núcleo supraóptico (NSO)**

Ubicado bilateralmente en el quiasma óptico, este núcleo está compuesto por células neurosecretoras magnocelulares responsables de la síntesis y liberación de OT y vasopresina (VP) a la neurohipófisis (*Da Silva y Col., 2014*). Las inyecciones intracerebroventriculares de OT facilitaron la cópula en ratas macho, reduciendo la LE e IPE. Por el contrario, las inyecciones intracerebrovasculares de un antagonista de OT alteraron o abolieron la cópula en ratas sexualmente expertas (*Argiolas y Melis, 2005*). El tratamiento con OT redujo las LI, LE e IPE y aumentó el número de animales capaces de reanudar la cópula después de la primera eyaculación (*Arletti y Col., 1990*). También se ha reportado que el óxido nítrico (ON) ejerce predominantemente un efecto inhibitorio sobre las neuronas del NSO

provocando una retroalimentación negativa en el control de la liberación de OT y VP (*Liu y Col., 1997*), poniendo en manifiesto que el ON puede estar involucrado en el control de la liberación de OT y VP.

- **Núcleo paraventricular (NPV)**

El NPV del hipotálamo comprende una división magnocelular, la cual libera OT y VP en la circulación desde la neurohipófisis, y una división parvocelular, que proyecta a varias áreas cerebrales y a la médula espinal. Es un importante sitio integrador para funciones endócrinas y autónomas, entre las que destacan las erecciones sin contacto, las erecciones reflexivas (aquellas producidas por estimulación sexual obvia) y la emisión seminal. Las lesiones en el NPV por ácido N-metil-D-aspartico o por radiofrecuencia disminuyen las erecciones sin contacto en ratas macho, sin afectar la cópula. Las lesiones más extensas tanto de las divisiones parvo como magnocelulares inhiben tanto las erecciones reflexivas como las “sin contacto” y paulatinamente conducen a algún deterioro en la cópula o en las erecciones reflexivas, aunque no de manera constante (*Liu y Col., 1997*).

Se ha reportado que, la infusión de OT en el NPV de ratas macho estimula la erección del pene (*Kita y Col., 2006*), este efecto también se obtiene cuando se inyecta OT en áreas cerebrales que reciben proyecciones del NPV, por ejemplo, ATV, hipocampo, amígdala y médula espinal (*Melis y Argiolas, 2011*). De una manera análoga la administración de una dosis alta de L-arginina, precursor de ON, en el NPV provocó erecciones en ratas macho, mientras que el L-NAME, inhibidor de SOxN, disminuyó las

erecciones sin contacto en dichos animales (*Melis y Col., 1998*). La administración de L-NMMA (inhibidor de la SOxN), disminuyó las erecciones reflexivas, mientras que la L-arginina aumentó las erecciones; sin embargo, ninguno de estos fármacos afectó la cópula de los machos (*Sato y Col., 1999*).

- **Amígdala (Amig)**

La región corticomedia de la amígdala sirve como un sitio de integración para estímulos quimiosensoriales, somatosensoriales y hormonales a su vez proyecta al área preóptica media (APOm) y otras áreas reguladoras centrales. La Amig media también recibe información somatosensorial de los genitales. Las lesiones del núcleo central y la división basolateral de la amígdala tienen poco efecto sobre la cópula, aunque deterioran las respuestas condicionadas durante el miedo y el refuerzo (*Everitt y Bancroft, 1991*). Por el contrario, las lesiones a nivel corticomedia afectan la cópula, dependiendo de la gravedad de la ubicación específica y la especie.

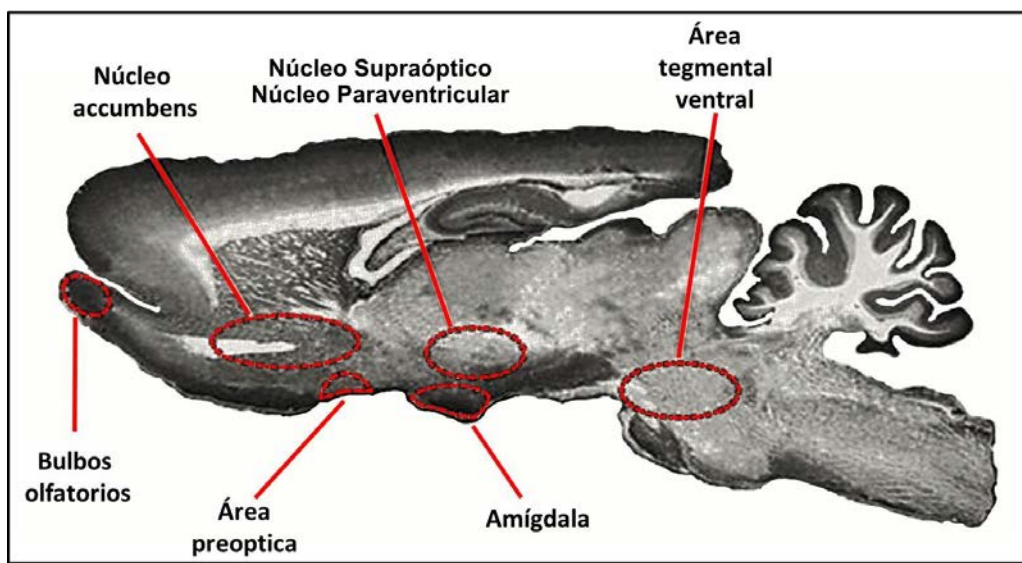


Figura 4: Ubicación de las áreas cerebrales involucradas en la conducta sexual (tomado de: *Paxinos y Watson, 1998*).

- **Oxitocina (OT)**

La OT es un neuropéptido constituido por 9 aminoácidos la cual ha aparecido desde el inicio de la evolución reportándose incluso en caracoles, sanguijuelas y anélidos (*van Kesteren y Col., 1995*). La OT está involucrada directamente en acciones dirigidas al mantenimiento de la socialización de grupos y/o especies (por ejemplo, ovulación, parto, lactación, conducta sexual, e interacción social) (*Engelmann y Col., 2000*). En los vertebrados la OT se sintetiza en dos regiones hipotalámicas, en el NPV y en el NSO, así como en los núcleos accesorios situados entre el NPV y el NSO (*Farina-Lipari y Valentino, 1993; Farina-Lipari y Col., 1995*), también se encuentran neuronas OT en las neuronas parvocelulares del NPV y núcleo supraquiasmático, en la Amig medial, hipotálamo dorsomedial y locus coeruleus (*Buijs, 1978; Caffé y van Leeuwen, 1983, van Leeuwen y Caffé, 1983*). En ratas, pero no ratones, también se localiza en el hipotálamo dorsomedial y bulbo olfatorio (*Caffé y van Leeuwen, 1983; Tobin y Col., 2010*). La expresión de OT empieza a los pocos días del nacimiento (entre el día 2 y 6 post natal) (*Lipari y Col., 2001*).

Se almacena en gránulos o vesículas secretoras junto con su acarreador respectivo, la neurofisisina. La OT actúa directamente sobre sus receptores a OT (receptores acoplados a proteínas G_i y G_q) (*Strakova y Col., 1998; Wiegand y Gimpl, 2012*).

- **Óxido Nítrico (ON)**

El ON es un radical libre, gaseoso, de vida media corta generado a partir de la L-arginina por una de tres isoformas de la SOxN (*Moncada y Higgs., 2002*) : sintasa del óxido nítrico neuronal (SOxNn), sintasa del óxido nítrico endotelial (SOxNe) y la sintasa del óxido nítrico inducible (SOxNi), aisladas originalmente del cerebro de rata (*Bredt y Snyder., 1990*), de aorta de bovinos (*Pollock y Col., 1991*) y de macrófagos de murinos (*Xie y Col., 1992*), respectivamente. La SxONe y la SOxNn se expresan constitutivamente y se caracterizan por una baja producción de ON en sus tejidos de origen (*Feelisch y Stamler, 1996*). Así mismo el ON es un gas soluble que actúa como un segundo mensajero y como un neurotransmisor, el cual ha sido implicado en la actividad sexual masculina, funciones que incluyen la erección del pene (*Andersson, 2001*) y control cerebral del comportamiento sexual (*Bialy y Col., 1996*). Los inhibidores de la SOxN administrados sistémicamente perjudican la cópula, disminuyendo la proporción de animales sexualmente naive (animal que no ha tenido contacto sexual alguno), (*Hull y Col., 1995*) y sexualmente expertos (*Bialy y Col., 1996; Hull y Col., 1994*) capaces de eyacular.

En este estudio se determinó trabajar con el modelo de ratas macho de 4 meses de edad, sexualmente expertos por motivos de practicidad y fácil reproducibilidad, así como también de que a esta edad los animales ya han alcanzado la madurez sexual. Como ya se explicó, existen varios neurotransmisores, péptidos, hormonas y gases que participan durante la conducta sexual, nosotros nos enfocaremos a la OT y en la SOxN como posibles blancos del efecto causado por el DE-79.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a su sobreexplotado uso en los bienes consumibles que poseen PBDE en la vida diaria de las personas, el contacto en exceso con estos contaminantes químicos, como lo es el DE-79, pudiera repercutir en la homeostasis de la salud, reflejándose en posibles alteraciones de la expresión de la conducta sexual masculina, así como en algunas áreas del SNC involucradas con dicha conducta a través de sus efectos sobre la OT y el ON.

3. HIPÓTESIS

La exposición de ratas macho sexualmente expertos al neurotóxico DE-79 afectará los niveles de OT, así como de SOxN en áreas cerebrales blanco involucradas en la regulación de la conducta sexual masculina, provocando cambios en la expresión de dicha conducta.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del neurotóxico DE-79 sobre la conducta sexual masculina de la rata macho a través de sus acciones sobre la OT y SOxN en áreas cerebrales que tienen un papel importante en la modulación de la misma.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar en ratas macho sexualmente expertos de 4 meses de edad, el efecto del DE-79 a una dosis de 10.2 mg/kg de peso sobre la conducta sexual.
- Determinar la posible variación sobre las concentraciones de OT y SOxN en NAcc, ATV, APOm, NSO, NPV y Amig de ratas macho que presentaron conducta sexual con previa administración de DE-79 a una dosis de 10.2 mg/kg de peso.

NOTA: Cabe mencionar de manera importante que, la cuantificación del receptor a OT (OTr) no estaba inicialmente contemplada dentro del trabajo de esta tesis. Sin embargo, al contar con estos cerebros y los reactivos necesarios se consideró importante poder determinar si existían cambios en la expresión de estos receptores en los animales expuestos al neurotóxico DE-79.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 METODOLOGÍA

5.1.1. Animales

Se utilizaron ratas macho, sexualmente expertas, de la cepa Wistar (con un peso de 250-300 g) de 4 meses de edad, que se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad invertido (12/12h, luz apagada a las 10:00 h), con temperatura controlada y con libre acceso al agua y alimento. A las ratas macho que alcanzaron la eyaculación en un lapso menor de 15 minutos, en al menos 3 de 5 pruebas de conducta sexual, se les consideró sexualmente expertas y fueron seleccionadas para los experimentos. Asimismo, se utilizaron ratas hembras Wistar (4 meses de edad), sexualmente receptivas que sirvieron como estímulo. La receptividad sexual se indujo por medio de la inyección secuencial de benzoato de estradiol (4 µg/animal) y progesterona (2 mg/animal) 48 h y 4 h antes de la prueba de conducta sexual, respectivamente.

5.1.2. Pruebas de conducta sexual

Los registros de conducta sexual se realizaron en cilindros de acrílico transparente (50 cm de alto x 50 cm de diámetro, conteniendo aserrín aproximadamente de 6 cm de espesor), en la etapa oscura del ciclo, bajo iluminación tenue con luz roja. Los machos se colocaron en los cilindros y se les permitió 5 minutos de adaptación al espacio antes de la introducción de la hembra receptiva. La conducta sexual se registró y se determinaron los siguientes parámetros específicos de la cópula: la LI, la LE, el IPE, el número de M y el número de I que

precedieron a la eyaculación y el número de eyaculaciones presentadas durante el periodo de observación. Así mismo se determinó el porcentaje de animales que presentó las conductas de M, I, E y RC.

5.1.2.1. Fármacos

Se utilizó el neurotóxico DE-79 (donado por el Dr. Kodavanti) disuelto en aceite comestible de maíz (mazola) a una dosis de 10.2 mg/kg (ya que en estudios previos, en nuestro laboratorio se ha determinado y comprobado que es la dosis menor a la cual los animales sufren menos efectos tóxicos).

El benzoato de estradiol (Sigma, cat. E-8515) y la progesterona (sigma, cat. P-0130) administrados a las hembras fueron disueltos en aceite de maíz (mazola) y se inyectaron por vía subcutánea en un volumen de 1ml/kg.

5.1.2.2. Diseño Experimental

Se utilizaron 2 grupos de ratas macho sexualmente expertas (n = 7). Grupo 1, grupo control y grupo 2, grupo experimental, que a continuación se describe: grupo 1) a estos animales se les proporcionaron palomitas de maíz impregnadas de aceite comestible (vehículo) durante 5 días y al día 6 fueron sometidos a la prueba de conducta sexual (3 series copulatorias); grupo 2) a estos animales se les proporcionaron palomitas impregnadas con el neurotóxico DE-79 a una dosis 10.2 mg/kg por animal durante 5 días, al día 6 se les sometió a la prueba de conducta sexual. De ambos grupos se escogieron 3 animales para las pruebas de inmunohistoquímica de doble marcaje de fluorescencia y su posterior análisis por

microscopia confocal; y 4 animales para evaluar la cuantificación del receptor a OT por medio de western blot.

5.1.2.3 Actividad locomotora

Al finalizar la prueba de conducta sexual se evaluó la actividad locomotora de las ratas macho para descartar la presencia de efectos inespecíficos del tratamiento neurotóxico que pudieran haber interferido con la ejecución de la cópula. Para ello, las ratas macho se colocaron individualmente en una caja de acrílico de 48 cm x 36 cm de base x 19 cm de altura. La base de la caja fue dividida en 12 cuadrantes (12 X 12 cm), y se cuantificó el número de veces que el animal cruzó con las patas delanteras de un cuadrante a otro. Dicho registro se hizo durante 5 minutos. Entre cada registro la caja se limpió perfectamente.

5.2 Determinación de OT y SOxN por medio de doble inmunohistoquímica de fluorescencia y microscopia confocal.

Dado que el ON es un gas cuya vida media es sumamente corta, razón por la cual es muy difícil cuantificarlo, se optó por cuantificar la SOxN, la cual al ser una enzima es más estable, con una vida media más larga que el ON lo que nos permitió poder localizarla y cuantificarla.

5.2.1. Diseño experimental

En general, de los animales que se tomaron (n= 3, cada uno) tanto del grupo control como del experimental (posterior a la prueba de conducta sexual) se sacrificaron 1 h después de la actividad sexual. Se usó la técnica de

inmunofluorescencia de doble marcaje para detectar a la OT, así como a SOxN. Después de las pruebas de conducta sexual, los animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos +0.9% de NaCl (PBS) 0.1M pH 7.2 intracardiamente (por gravedad durante 40 minutos) y se obtuvo su cerebro. Éste se colocó en sacarosa (Merck, cat. CAS 57-50-1) al 30% en PBS 0.1M pH 7.2 durante 48 h, posteriormente se hicieron cortes coronales de 30 micras de grosor, de las áreas cerebrales (en la anterioridad correspondiente) y de las cuales se tomaron un número de cortes coronales representativos (tabla 1).

ÁREA CEREBRAL	Bregma (mm)	Núm. Cortes Representativos
NAcc	2.7 – 0.48	13
APOm	(-0.26) – (-1.3)	8
NSO	(-0.8) – (-1.88)	16
NPV	(-0.92) – (-4.52)	14
Amig	(-0.24) – (-5.04)	11
ATV	(-5.2) – (-6.8)	13

Tabla 1: Anterioridades, en micras, de las áreas cerebrales de las cuales se obtuvieron los cortes coronales para la cuantificación de la OT y la SOxN, así como la cantidad de cortes representativos de cada una de estas áreas (*Paxinos y Watson, 1998*).

5.2.2. Procedimiento inmunohistoquímico

Los cortes cerebrales de las áreas antes mencionadas se lavaron 4 veces por 15 minutos con PBS 0.01M, pH 7.2. Posteriormente fueron incubados durante 2 h en

solución de bloqueo conformada por 2.2% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, Cat. A-7888), 0.25% de tritón X-100 (Sigma, Cat. T-9284), 1% de gelatina (Sigma, Cat. G-7765) y 5% de suero de burro (Sigma, Cat. D-9663) todo en PBS 0.01M + 0.09% NaCl pH 7.2. Las incubaciones se realizaron bajo agitación suave y constante. Una vez transcurrido este tiempo, los cortes se incubaron durante una noche a 4°C más 30 minutos a temperatura ambiente con los conjuntos de anticuerpos primarios Mouse Anti OT (Anticuerpo policlonal, donado por el Dr. Gainer, dilución 1:700) y Rabbit Anti SOxN (marca Immunostar, Cat. 24287, dilución 1:500) en la misma solución usada para bloquear. Una vez terminada la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron 4 veces con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 0.01M por 10 minutos cada lavado. Posteriormente, las secciones se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con los conjuntos de anticuerpos secundarios Alexa 555 Donkey Anti-Rabbit (marca Invitrogen, Cat. A31572 dil. 1:300) y Alexa 488 Donkey Anti-Mouse (marca Life Technologies, Cat. A21202, dil. 1:350), en la solución de bloqueo descrita anteriormente. En los controles inmunocitoquímicos se omitieron los anticuerpos primarios). Terminada la incubación con los anticuerpos secundarios, los cortes se lavaron 4 veces con Tritón X-100 al 0.1% en PBS 0.01M por 10 minutos cada lavado. Finalmente, las secciones fueron montadas en portaobjetos con un medio de montaje "Antifade Kit" (marca Molecular Probes, cat. P7481) para su posterior análisis.

5.2.3. Análisis de la inmunofluorescencia

Previo al análisis de los cortes, se realizó un "lambda stack" para obtener el espectro de emisión de cada fluoróforo conjugado (Alexa 488, Alexa 555) a los

anticuerpos secundarios utilizados, a diferentes longitudes de onda, para generar la curva espectral de los mismos. Posteriormente se colocaron filtros barrera para obtener sólo el máximo de emisión de cada fluóroforo, evitando así el solapamiento de las curvas espectrales de emisión (Figura 5).

ESPECTROS DE EMISIÓN

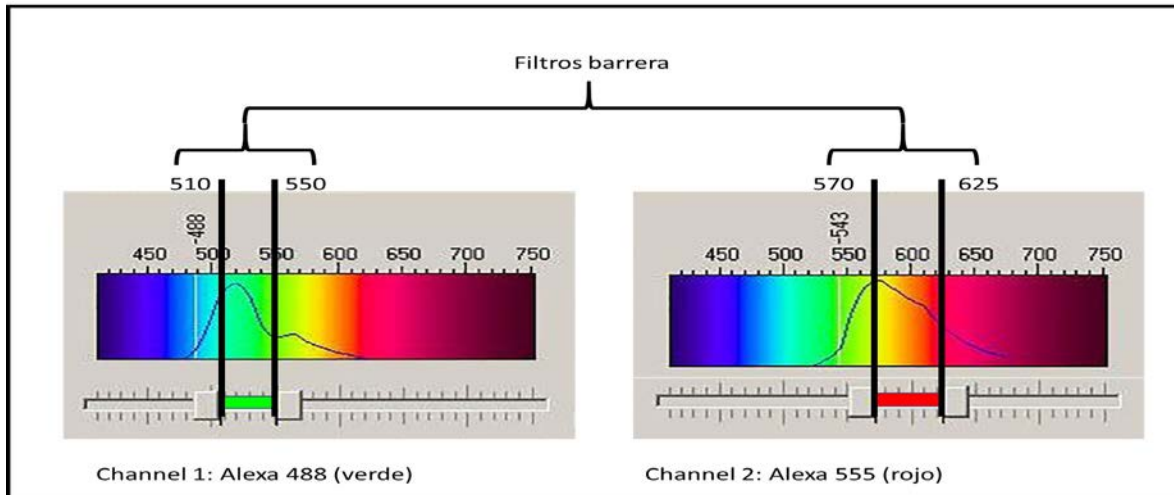


Figura 5: La imagen contiene dos espectros de emisión correspondientes a los fluóroforos Alexa 488 (izquierda) y Alexa 555 (derecha), en ambas imágenes en la parte inferior se localizan cuadrados los cuales son, filtros barrera, y en la parte superior se muestran los datos de la longitudes de onda correspondientes a estos filtros, los cuales solo permiten adquirir los picos máximos de emisión de cada fluóroforo a la vez que evitan la adquisición de señal inespecífica correspondiente al solapamiento de las curvas de emisión de los mismos.

Para la adquisición de las imágenes se utilizó la herramienta “multitracking”, que consiste en hacer un barrido con el láser He-Ne/543 nm que excita al Alexa 555 y posteriormente otro con el láser Ar/488 nm que excita al Alexa 488. El “pinhole” (apertura del diafragma por el cual atraviesa un haz de luz de un láser a una determinada longitud de onda) fue de “1 airy-unit” (primera onda emitida por el choque de las partículas del láser sobre la muestra, la cual tiene mayor nitidez) (LSM 510 v.4.1, Carl Zeiss). Cada corte se analizó bilateralmente, capturando secciones ópticas en el eje de las Z de 0.37 μm de profundidad, con un área de 50625 μm^2 , por medio de un objetivo 40X oil AN 1.2. En cada una de estas áreas

se cuantificaron las marcas para OT y SOxN. Las marcas obtenidas en cada campo se separaron en sus dos diferentes canales (canal 1, Alexa 488 y canal 2, Alexa 555). La inmunoreactividad (IR) de OT con SOxN fue obtenida en función de medidas de área (μm^2) por medio del software LSM 510 v 4.0sp1 Carl Zeiss, por lo que la cuantificación de la densidad de OT con SOxN fue expresada como la proporción del área IR al neurotransmisor/peptido en cuestión/ área del campo óptico analizada. El mismo software proporcionó ambos valores (Figura 6). Para corregir posibles vías en la cantidad de neurotransmisor/peptido colocalizado detectado, los valores de colocalización fueron transformados dividiéndolos entre el valor de densidad del neurotransmisor/péptido obtenido en los mismos campos ópticos.

CUANTIFICACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE OT Y SOxN POR MICROSCOPIA CONFOCAL

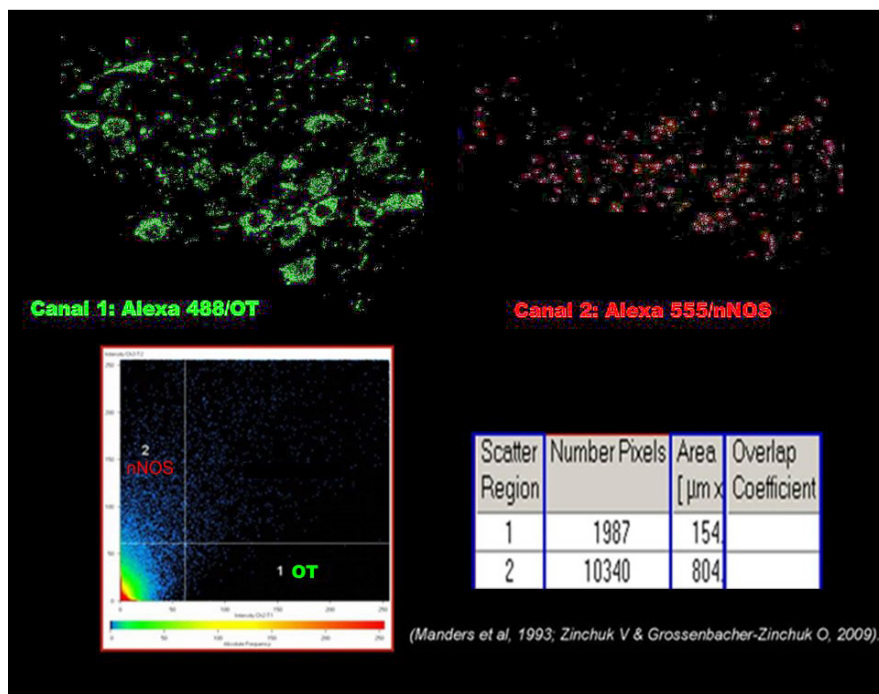


Figura. 6: En la parte superior de la imagen se muestra un campo óptico separado en 2 canales: Alexa 488 en verde, Alexa 555 en rojo. En la parte inferior izquierda se observa un diagrama de dispersión correspondiente a los canales anteriormente mencionados y en la parte inferior derecha se encuentra una tabla que contiene los datos del número de píxeles y el área en μm^2 obtenidos en las diferentes regiones (canales).

5.3. Determinación de la expresión del receptor a oxitocina y actina por medio western blot.

5.3.1 Protocolo de homogenización del tejido para western blot.

De los animales restantes (4 controles y 4 tratados con el toxico DE-79) se obtuvieron sus cerebros en fresco, previa anestesia con pentobarbital sódico (PISA, cat. Q-7833-215) 200 mg/kg, intraperitoneal por medio de disección, con ayuda del atlas de Paxinos y Watson (1998). Se obtuvieron cortes de 500 micras de grosor con un micrótomo marca Leica y se recolectaron las áreas cerebrales mencionadas en la tabla 1, con ayuda de un sacabocados quirúrgico de 1.7 mm de diámetro interno a una temperatura de 18°C. Una vez que se obtuvieron las muestras de tejido se congelaron con hielo seco, y se guardaron a -80°C hasta su posterior uso.

El tejido se homogenizó en frío con ayuda de un homogenizador (de vástago de teflón y camisa de vidrio); en presencia de buffer de homogenización 1 mM EDTA, 10 mM HEPES, 10 mM TRIS, pH 7.4 (9 ml /gr de tejido + 1 pastilla de cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Boehringer Mannheim; 1 pastilla por cada 40 ml de buffer). La homogenización se llevó a cabo a alta velocidad (de 10 – 12 “strokes”) y a 52000 rpm, el homogenizado se recolectó y se centrifugó a 3,000 x g por 15 min a 4°C. Posteriormente el sobrenadante obtenido de la anterior centrifugación se recolectó y nuevamente se centrifugó a 22,000 x g por 45 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteína total por medio del kit Micro BCA™ Protein assay reagent kit (Pierce, cat.23235).

5.3.2 Western blot

Se usó una carga estándar para cada muestra de 30 µg por carril de gel (tris-acrilamida). El gel concentrador fue hecho a una concentración del 4% mientras que el gel separador fue de 7.5%; el voltaje de corrimiento electroforético fue de 90 y 120 volts respectivamente. Una vez terminada la electroforesis se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con un poro de 20 µm de diámetro, con base en el siguiente protocolo para el inmunoblot:

Las membranas con las muestras transferidas se lavaron en dos ocasiones con PBS 10 mM, cloruro de sodio 0.09% a un pH 7.4; por 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron por 1 h en solución bloqueadora, 0.3% Tween 20 (BioRad, Cat. 170-6531), 3% Gelatina, teleostan (Sigma, Cat. G7765), 0.5% de leche Svelty, 1% suero de burro, todo en PBS 10 mM, cloruro de sodio 0.09% a un pH 7.4. Una vez transcurrido el bloqueo, se agregaron en dicha solución los anticuerpos primarios: Rabbit monoclonal anti Oxytocin receptor, (Abcam, Cat ab181077, dilución 1:2500) y Goat anti actin, (Santa cruz, Cat. SC-1616, dilución 1:8333) dejándolos incubar por 1 noche a 4°C más 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. A continuación, se realizaron 4 lavados con una solución 0.3% Tween 20, 3% Gelatina en PBS 10 mM, cloruro de sodio 0.09% pH 7.4 por 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron por 2 h con los anticuerpos secundarios (HRP donkey anti Rabbit (Jackson immunoresearch, Cat. 711-035-152, dilución 1:1500) y HRP donkey anti Goat (Sta. Cruz, Cat. SC-2020, 1:10000), en la siguiente solución, 0.3% Tween 20, 3% Gelatina, 0.5% de leche

Svelty, 1% suero de burro, todo en PBS 10 mM, cloruro de sodio 0.09% a un pH 7.4. Pasada la incubación se realizaron 4 lavados, con 0.1% Tween 20 en PBS 10 mM, cloruro de sodio 0.09%, pH 7.4, 10 minutos cada uno. Se realizaron 2 últimos lavados con PBS 10 mM, cloruro de sodio 0.09%, pH 7.4, 10 minutos cada uno. Finalmente se detectaron bandas de interés de las muestras por medio de película radiográfica X-omat K, de Kodak, Art. Ref. 6031876; y quimioluminiscencia con ayuda del kit de western lighting chemiluminescence Reagent Plus, NE, Cat. NEL 105 Plus.

Al cuantificar al OTr, se realizó un “pool” de las áreas cerebrales en cuestión de los diferentes cerebros de las ratas macho que recibieron el tóxico DE-79.

5.1.2.4 Análisis Estadístico

Conducta sexual. - El porcentaje de animales sexualmente expertos que presentaron M, I, E y RC después de la eyaculación durante las 3 series copulatorias se analizaron mediante la prueba F de Fisher. Los parámetros finos, esto es, los parámetros temporales como numéricos de la cópula, fueron evaluados por una prueba U de Mann-Whitney. Los datos de la actividad motora se analizaron con un ANOVA de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunnett y se expresaron como el promedio +/- el error estándar (X +/- EE).

Microscopia confocal. - Las comparaciones estadísticas se realizaron entre los grupos por medio de una U de Mann Whitney.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma Plot, versión 12.

6. RESULTADOS

6.1 Influencia del DE-79 sobre la conducta sexual masculina

El 100% de los animales expuestos al neurotóxico DE-79 fueron capaces de realizar las M, I, E y RC, razón por la cual no se obtuvieron diferencias estadísticas con respecto al grupo control. La actividad ambulatoria (conducta motora) tampoco se vio afectada, motivos por los cuales no se reportan estos datos. Sin embargo, a pesar de que todos los individuos son capaces de presentar conducta sexual, su expresión se vio afectada como se muestra a continuación.

En la figura 7 se muestra un panel donde se observa el efecto del neurotóxico DE-79 sobre la expresión de la conducta sexual de ratas machos sexualmente expertas con 4 meses de edad; las diferentes gráficas pertenecen a parámetros tanto numéricos como temporales con los que se evaluó la expresión de la conducta sexual: LI, LE, RC, M e I.

Los resultados obtenidos muestran que en el grupo de animales tratados con el DE-79 no se modificaron los parámetros de LI al inicio de la prueba conductual (figura 7a), el M (figura 7b) ni el RC (figura 7e) en las tres series copulatoria que se les permitió realizar. Sin embargo, en el caso del I (figura 7c), se observó una disminución significativa de esta conducta en el grupo de animales tratados con el DE-79 tanto en la segunda como en la tercera serie copulatoria al ser comparados con su respectivo grupo control (U de Mann-Whitney $p= 0.009$, $p = 0.010$ respectivamente). Este mismo grupo de animales también presenta una disminución significativa en el tiempo requerido para alcanzar la eyaculación en las mismas series copulatorias (U de Mann-Whitney $p= 0.008$, $p = 0.005$

respectivamente), cuando se compararon contra su respectivo grupo control (figura 7d).

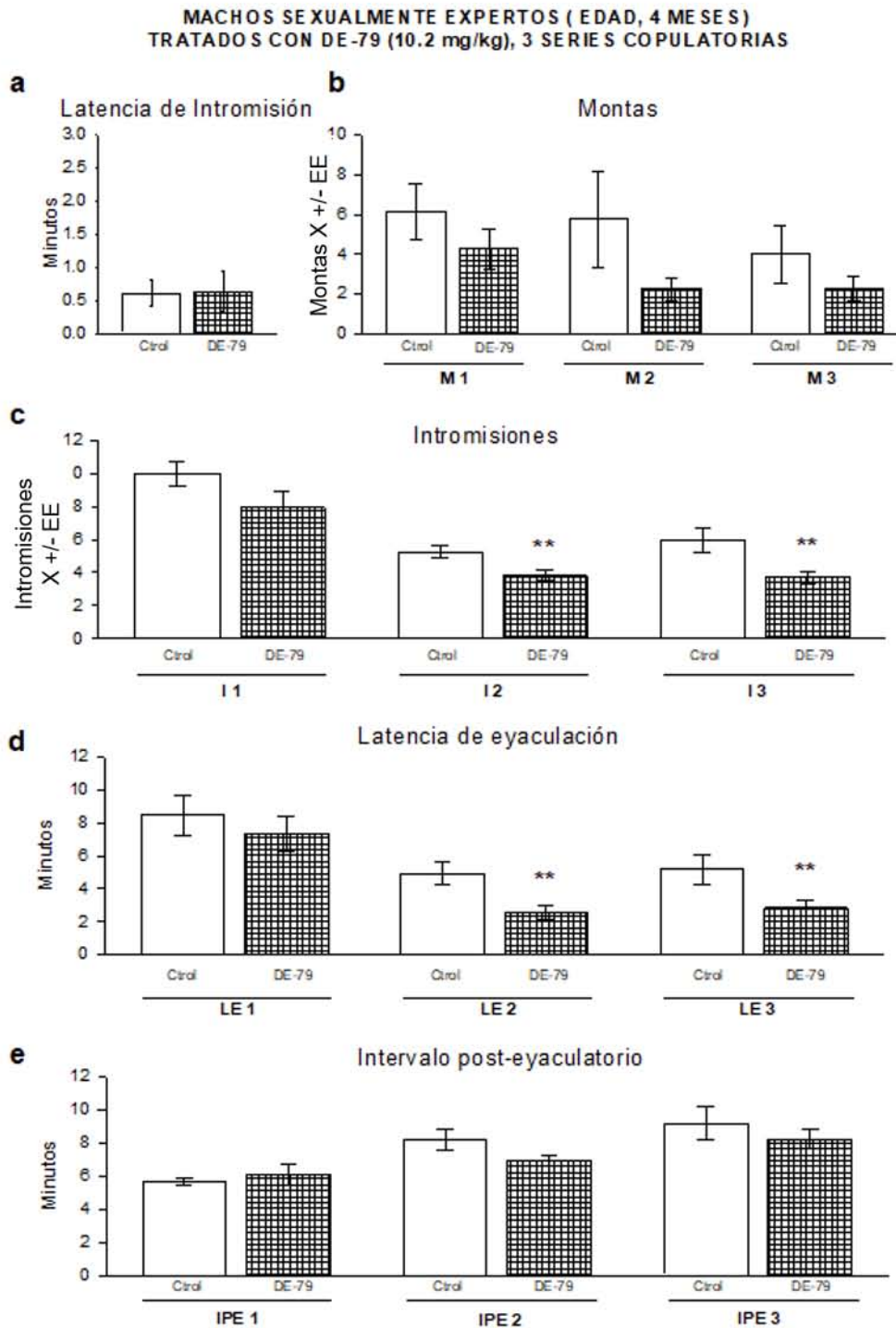


Figura 7: Gráficas de Latencia de Intromisión (a), Montas (b), Intromisiones (c), Latencia de Eyacuación (d) e Intervalo Post-Eyaculatorio (e) Prueba estadística, Mann-Whitney, ** $p \geq 0.01$.

6.2 Influencia del DE-79 sobre la expresión de OT y SOxN en diferentes áreas cerebrales involucradas con la cópula.

En la figura 8 se puede observar un panel distribuido en 4 columnas y 6 filas, de imágenes obtenidas por medio de inmunofluorescencia de doble marcaje y a su vez analizadas y semicuantificadas por microscopia confocal. Las imágenes son un ejemplo representativo de cada área cerebral evaluada, de animales sexualmente expertos en presencia o ausencia del neurotóxico DE-79. Dichas imágenes exponen en color verde, zonas inmunorreactivas a OT (IR-OT) y en color rojo, la inmunoreactividad (IR) a la SOxN. Las filas de arriba hacia abajo muestran: fila 1, NAcc; fila 2, APOm; fila 3, NSO; fila 4, NPV; fila 5, ATV y fila 6, Amig. Las columnas de izquierda a derecha están organizadas de la siguiente manera: columna I y II, imágenes inmunorreactivas a OT, columnas III y IV imágenes con IR- SOxN, columnas I y III son muestras provenientes de animales control y columnas II y IV, son muestras provenientes de animales tratados con el neurotóxico DE-79. Como se puede observar en la figura 9, a pesar de que cada área expresa de una manera diferencial a la OT, exceptuando al NAcc y Amig, donde la IR-OT se observa marcadamente disminuida o casi inexistente, las imágenes muestran que en las áreas provenientes de los animales sexualmente expertos a los que se les administró el DE-79, la IR-OT se encontró evidentemente disminuida en comparación a las áreas cerebrales de los animales control. En las áreas positivas IR-OT se pueden apreciar la IR tanto en fibras como en cuerpos neuronales distribuidos tanto en citoplasma como en la membrana celular.

**INMUNOFLUORESCENCIA DE DOBLE MARCAJE DE AREAS CEREBRALES
DE ANIMALES SEXUALMENTE EXPERTOS CON Y SIN DE-79**

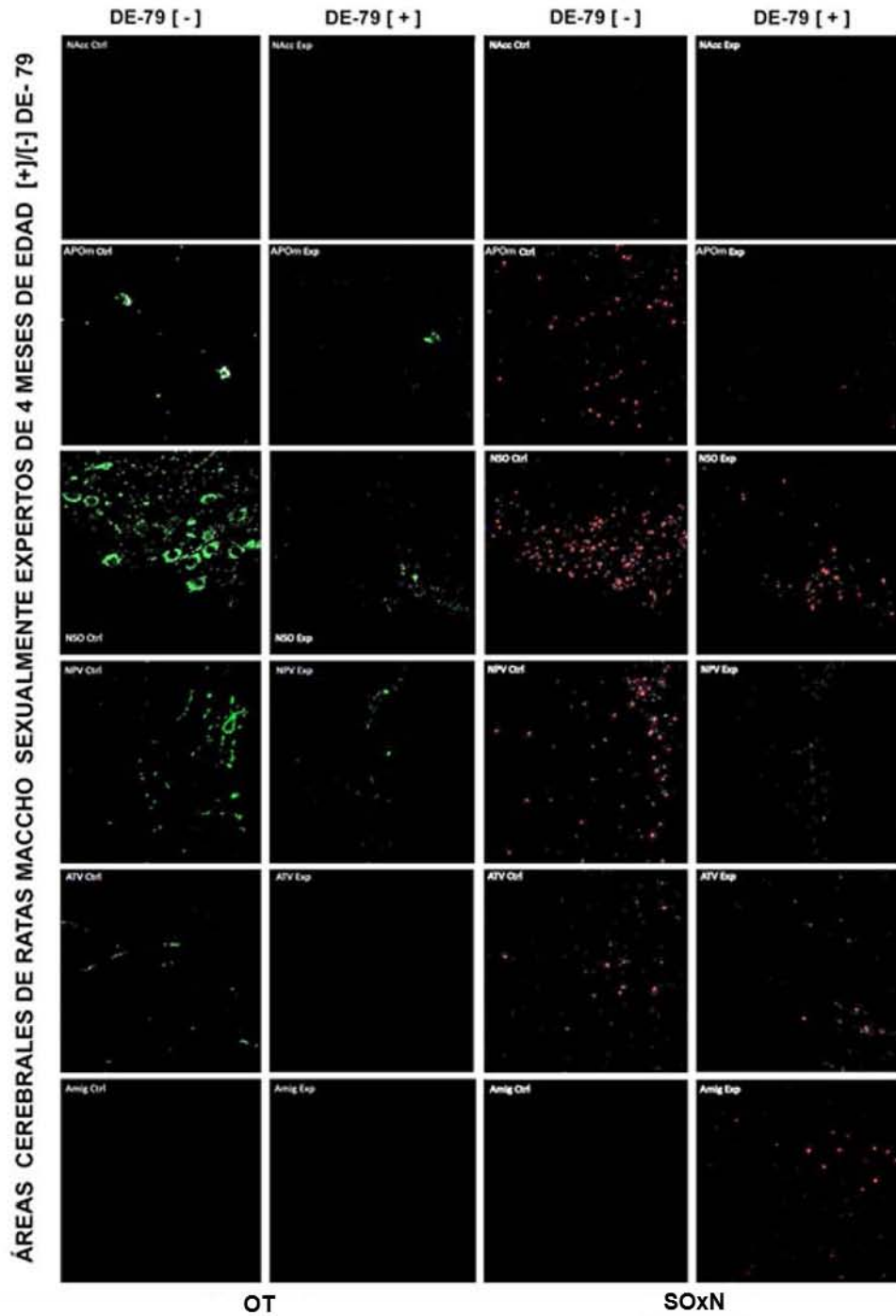


Figura 8: Panel de áreas cerebrales involucradas en la conducta sexual donde se muestra la expresión de OT y SOxN afectada por el tratamiento con el neurotóxico DE-79 en comparación con su respectivo grupo control.

Para el caso de la inmunoreactividad a SOxN (IR-SOxN), la figura 9 muestra una tendencia a la disminución de esta enzima en las áreas evaluadas repitiendo la poca IR en el caso del NAcc tanto para los animales tratados como los no tratados con el DE-79. En la Amig, la IR-SOxN fue mayor en los animales que recibieron tóxico que en aquellos que no lo recibieron. La señal de IR-SOxN, en las diferentes áreas que lo expresan, se presenta muy marcada en el cuerpo neuronal y casi no hay señal en las fibras neuronales.

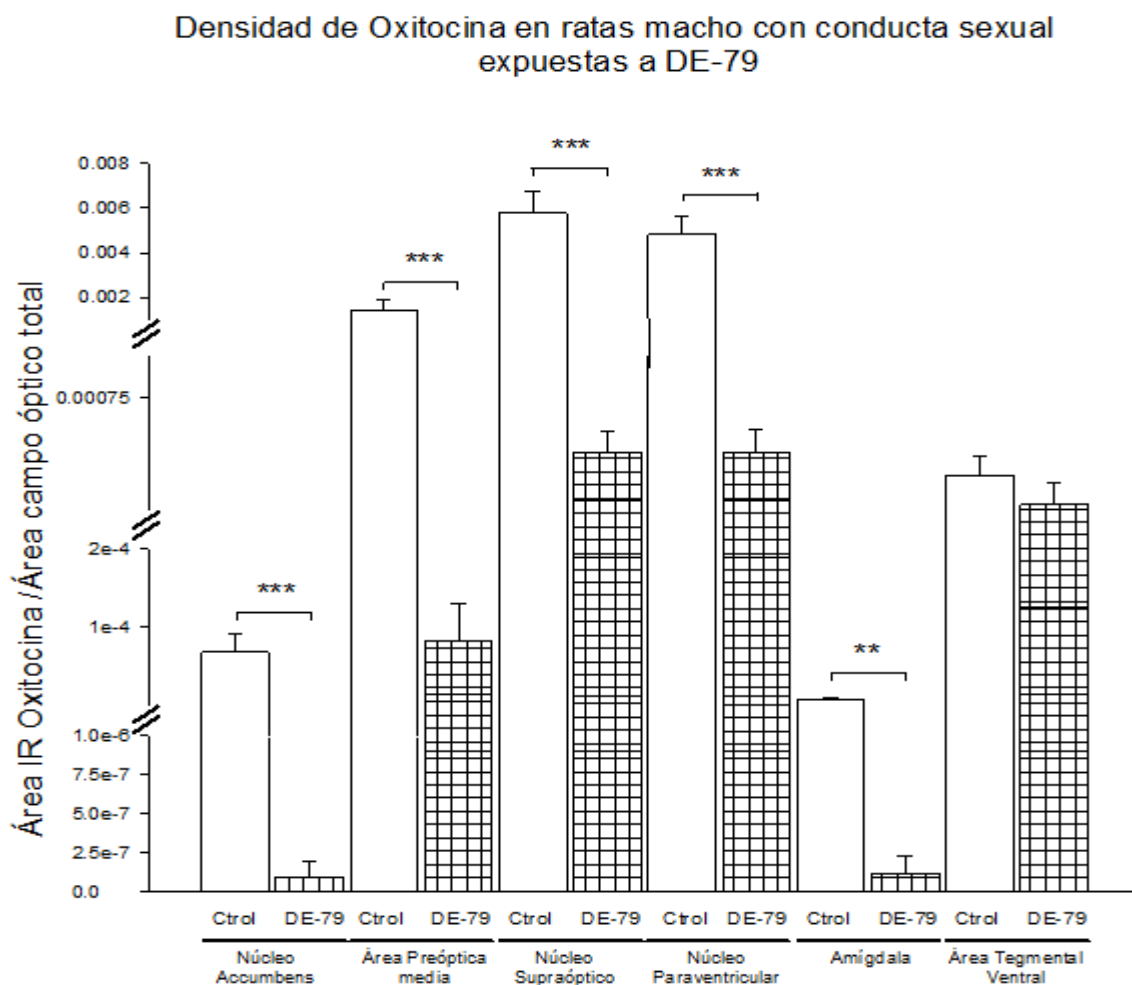


Figura 9: Cuantificación de OT por microscopía confocal en áreas cerebrales de ratas tratadas (barras cuadrículadas) con el neurotóxico DE-79 y en ratas control, (barras blancas). Prueba estadística U de Mann-Whitney, **: P=0.01, ***: P=0.001.

En todas las áreas evaluadas de los animales tratados con el DE-79, se encontró una disminución significativa en la concentración de IR-OT, (NAcc, APOm, NSO, NPV, Amig) a excepción del ATV, cuando se compararon con su grupo control ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ y $P < 0.001$, respectivamente).

Densidad de Oxido Nítrico en ratas macho con conducta sexual expuestas a DE-79

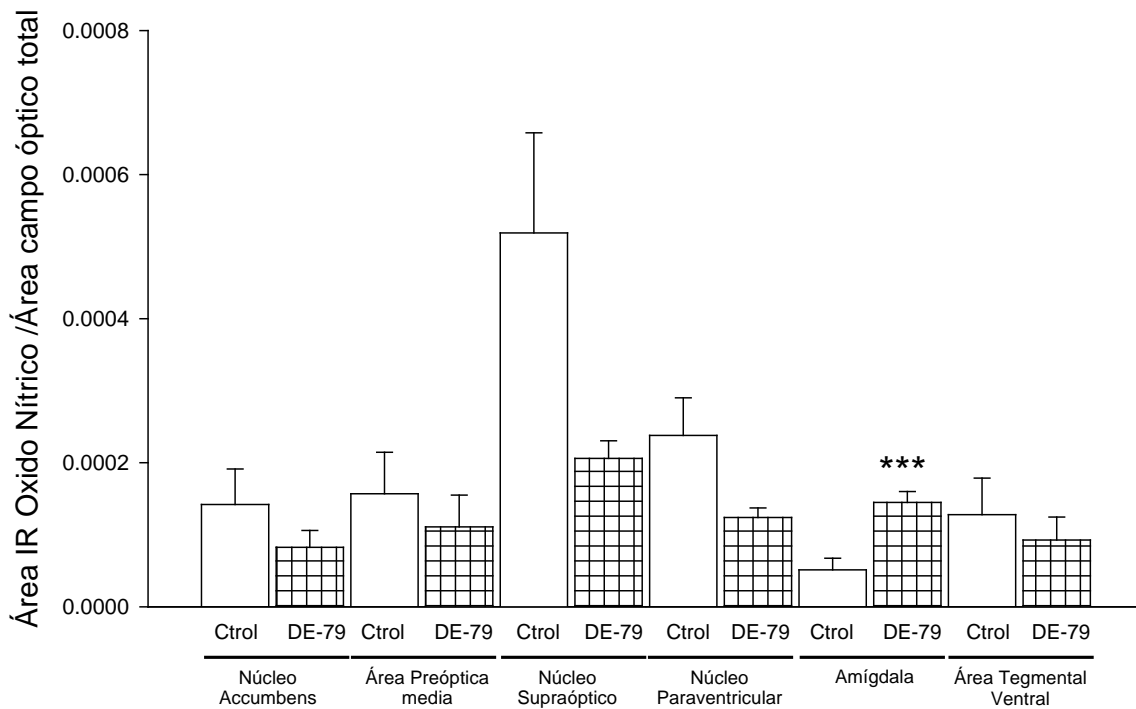


Figura 10: Cantidad de Óxido Nítrico que fue captada en las áreas cerebrales trabajadas mediante la técnica de inmunofluorescencia en ratas tratadas con el neurotóxico DE-79 y en ratas sin tratamiento (***: $P < 0.001$).

En la figura 10 se observó una disminución de SOxN, en todas las áreas, aunque no hubo significancia entre éstas. Sin embargo, en Amig hubo un incremento significativo cuando se comparó con su grupo control ($P < 0.001$).

6.3 Influencia del DE-79 sobre la expresión del receptor a Oxitocina (OTr) en la conducta sexual masculina

Para evitar posibles “bias” (sesgos) en los resultados obtenidos de las expresiones del OTr, por medio del western-blot; se corrigió la densidad óptica (DO) de cada muestra, dividiendo el valor de la DO obtenida (por medio del programa ImageJ, v 1.46r, (<http://imagej.nih.gov/ij>) de la banda obtenida del OTr entre la DO de la banda correspondiente a la actina de la misma muestra cargada.

Los resultados obtenidos por medio del western-blot (figura 11) muestran una banda en el mismo peso molecular (PM) en todas las áreas, de aproximadamente 44 KDa (el PM reportado para el OTr es de 43 KDa) dicha banda es el reflejo visual de la densidad del OTr. Las distintas bandas muestran una clara afección de la expresión de la densidad del OTr en las áreas estudiadas provenientes de los cerebros de animales expuestos al DE-79 que presentaron conducta sexual. En la misma imagen también se puede apreciar otra banda sobrepuesta correspondiente a la actina (utilizada como control de cantidad de carga de cada muestra), cuyo PM es también alrededor de 44 KDa (el PM documentado para esta proteína es de 43 KDa).

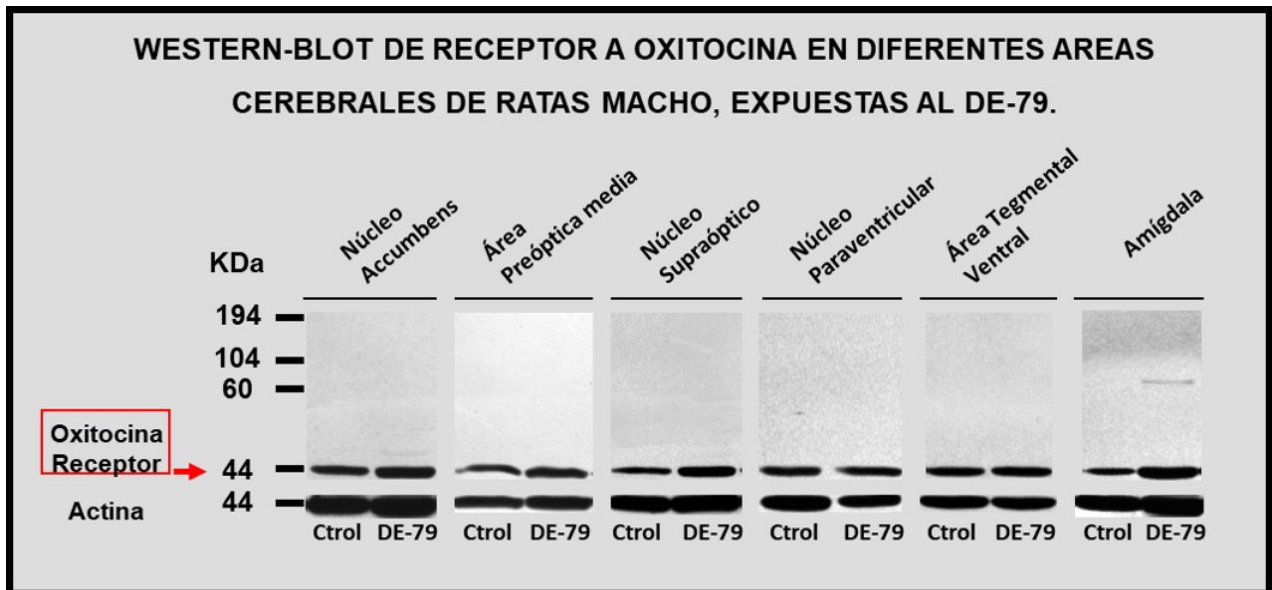


Figura 11: Western-Blot de OTr en diferentes áreas cerebrales de las ratas macho de 4 meses que fueron o no expuestas al DE-79.

Una vez corregidos los resultados obtenidos por medio del western-blot del OTr, se graficaron como se muestra en la figura 12, donde en el eje de las “Y” se muestra la densidad de OTr corregida en unidad arbitrarias y en el eje de las “X” las diferentes muestras de “pools” de las distintas áreas cerebrales estudiadas del grupo de animales expuestos al DE-79, comparándose con los “pools” de las áreas cerebrales del grupo de animales que no fueron expuestos al DE-79 (grupo control, con solo vehículo, solución salina). La gráfica muestra que, si bien es cierto que no se puede realizar una prueba estadística debido a que, al hacer un “pool” de cada muestra la “n” de dichas muestras se convierte en una sola, si se puede determinar el grado de expresión del OTr del grupo experimental [(+) DE-79] en comparación con el grupo control [(-) DE-79,] en términos de porcentaje (%), de las distintas áreas estudiadas. En el APOm no hubo diferencias en la densidad del OTr entre el grupo control y el grupo experimental; mientras que, en el ATV, NAcc, NSO, Amig y NPV del grupo experimental hubo un incremento en la densidad del

OTr en comparación con las densidades del OTr obtenidas del grupo control, siendo los incrementos de porcentajes más evidentes en Amig y NPV.

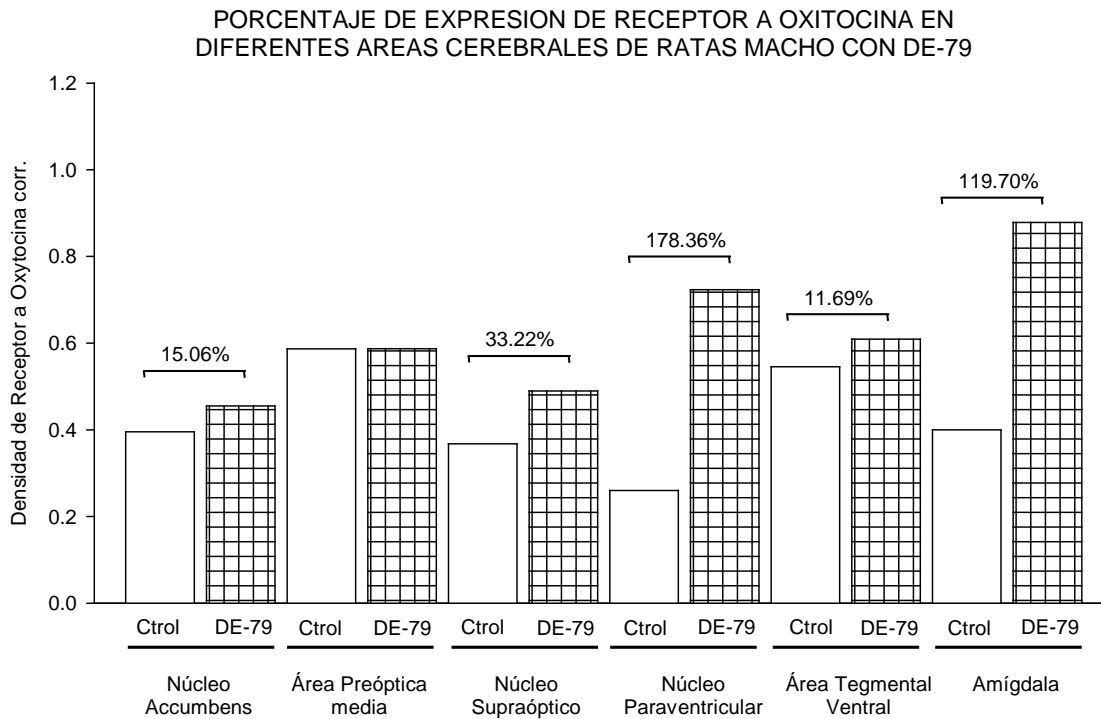


Figura 12: Expresión del OTr en las áreas cerebrales tratadas con el neurotóxico DE-79.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la administración del neurotóxico DE-79 afectó la conducta sexual en las ratas macho, observándose una evidente disminución significativa tanto en el número de intromisiones como en el tiempo necesario para que estos animales alcanzaran a eyacular en la segunda y tercera serie copulatoria, y de igual manera se observó una tendencia a la disminución en el número de montas en las mismas series copulatorias. Esto pudiera sugerir que el DE-79 afectó de alguna manera ciertas

áreas involucradas con la erección como pudiera ser el APOm, fuertemente relacionada con la motivación (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*), o quizás la Amig medial, el NAcc, el ATV, o el NPV, ya que se ha reportado que el incremento de niveles de ON en las áreas mencionadas induce erecciones, así como eyaculaciones, favoreciendo la cópula (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2009*), sustentando la posibilidad de que sean estas las áreas relacionadas con tales conductas motoras. Por otra parte, se ha reportado que la administración de OT intracerebroventricular en el APOm facilita la copula reduciendo las M, I, la LE y el IPE (*Rodríguez-Manzo y Hull, 2017*). Infusiones de OT en el NPV, ATV y Amig inducen erecciones. Los datos anteriores sustentan la primicia que además de estar involucradas las áreas ya mencionadas, dichos efectos sobre la conducta sexual masculina pudieran ser mediados por las acciones del ON y/o la OT en las mismas (*Rodríguez-Manzo y Hull; 2017*).

Tomando en consideración lo anterior y abordando los resultados obtenidos de la inmunofluorescencia de doble marcaje para la OT y el ON, solo en la Amig de los animales que recibieron el DE-79, se observa un incremento significativo de ON en relación al grupo de animales que no recibió el tóxico, mientras que las demás áreas no muestran incrementos importantes en dicho neurotransmisor. Sin embargo, en todas las áreas analizadas disminuyó significativamente la cuantificación de OT. Ambos datos no apoyan las conjeturas obtenidas de la sección relacionada a la conducta sexual. Sin embargo, a pesar de no poder tener una prueba estadística contundente del análisis obtenido del WB de los OTr se observó claramente que en todas las áreas de los animales que recibieron el DE-

79, hubo un incremento de dicho receptor incluso por arriba del 100% de expresión (PVN y Amig), con relación a los animales que no lo recibieron y que en ambos casos presentaron conducta sexual. Dicho incremento pudo deberse quizás a que al no haber suficiente OT el SNC indujo una sobre síntesis de receptores con la finalidad de capturar lo poco que se liberaba en el espacio sináptico, y que probablemente al haber poca OT, dichos receptores se hipersensibilizaran para desatar una respuesta más grande que en condiciones normales, dando como resultado una cópula favorecida. Cabe mencionar que dichos comentarios son meras especulaciones, pero existe una vasta bibliografía que menciona mecanismos de acción de sobre regulación (up-regulation) y síntesis de novo de receptores metabotrópicos como el caso de los OTr cuando sus sustratos se ven disminuidos (*von Zastrov, 2002; von Zastrov y Col., 2003*). Por otra parte, se piensa que quizás los PBDE pudieran competir con la OT por su sitio de acción (los OTr), provocando las afectaciones observadas anteriormente en la conducta sexual.

Se ha mencionado anteriormente que los PBDE son muy similares en estructura química a los PCB (*Kodavanti y Col., 2015*), y a su vez existe literatura que menciona que estos últimos pueden afectar niveles de DA, hormonas esteroides, mecanismos de transducción secundaria como pueden ser PKC, PKA, iones como Ca^{2+} intracelular (*Kodavanti, 2006*). Queda claro que aún no se conoce algún mecanismo específico por el cual los PBDE afectan al organismo o interactúan con los diferentes componentes neuronales que demuestre que es lo que está sucediendo a este nivel.

8. CONCLUSIONES

Con la información obtenida en esta tesis podemos determinar que la administración del neurotóxico DE-79 en ratas macho de 4 meses de edad, induce cambios en la expresión de la conducta sexual masculina, y que en dichos cambios está involucrado el sistema oxitocinérgico (neurotransmisor y receptores al mismo), a su vez, estas modificaciones son a nivel de NAcc, APOm, NSO, NPV, ATV y Amig por lo menos. El mecanismo de acción por el cuál este tóxico se encuentra afectando al SNC no está bien esclarecido, ya que como se ha descrito repetidamente los PBDE compiten por muchos sitios activos (receptores) y pueden actuar ya sea como agonistas o antagonistas dependiendo de la similitud estructural con el neurotransmisor en cuestión, afectando de esta manera a los diferentes mecanismos de transducción secundaria, como pueden ser PKC, PKA o iones como Ca^{2+} intracelular (*Kodavanti, 2006*). Dejando con lo anterior una gran incógnita de la manera en cómo interactúan con los diferentes componentes neuronales y redes de neurotransmisión este tipo de compuestos. Es importante mencionar que en este trabajo se abordó solo al sistema oxitocinérgico, pero no se puede excluir a otros sistemas como el GABAérgico, glutamatergico, opioidérgico, dopaminérgico y endocanabinoide (*Rodríguez-Manzo y Hull; 2017*), los cuales también se sabe están íntimamente ligados a la expresión de la conducta sexual masculina de la rata. Lo anterior saca a relucir la gran importancia que tiene el estudio de los efectos de este tipo de contaminantes, no solo sobre la expresión de una conducta motivada como es la conducta sexual, sino todas las afecciones

que pueden provocar (osmorregulación, teratogénesis, incluso productos incompatibles con la vida) sobre la especie humana.

9. PERSPECTIVAS

Este trabajo abre la posibilidad de evaluar otros sistemas de neurotransmisión, como son: GABAérgico, glutamatérgico, opioidérgico, dopaminérgico y endocanabinoide en el mismo marco de la conducta sexual masculina. A su vez, este trabajo solo explora las afecciones dadas en un individuo cuya fisiología alcanza la madurez sexual, pero no abarca lo que puede suceder en individuos cuya edad sea mayor o cuya exposición a este tipo de neurotóxico sea constante hasta llegar a una edad adulta; por lo que pudiera abrir nuevas líneas de investigación en un futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdallah M. A., Harrad S., Covaci A. (2009). "Isotope Dilution Method for Determination of Polybrominated Diphenyl Ethers using Liquid Chromatography coupled to Negative Ionization Atmospheric Pressure Photoionization Tandem Mass Spectrometry: Validation and Application to house dust." *Anal Chem*; 81: 7460–7467.
2. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2015). "Toxicological Profile for Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)." Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service.
3. Alae M., Arias P., Sjodin A., Bergman A. (2003). "An Overview of Commercially used Brominated Flame Retardants, their Applications, their Use Patterns in different Countries/Regions and Possible Modes of Release." *Environ. Int.* 29, 683–689.
4. Alcaro A., Huber R., Panksepp J. (2007). "Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: An Affective Neuroethological Perspective." *Brain Res. Rev.* 56, 283–321.
5. Alm H. y Scholz, B. (2010). "Developmental Neurotoxicity of PBDEs: Mechanisms and Implications." In: Merlani, P.B. (Ed.), *Flame Retardants: Functions, Properties and Safety*. Nova Science Publishers, New York, 1–40.
6. Andersson K. E. (2001). "Pharmacology of Penile Erection." *Pharmacol. Rev.* 53, 417–450.
7. Argiolas A. y Melis M. R. (2005). "Central Control of Penile Erection: Role of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus." *Progress in Neurobiology*; 76: 1–21.
8. Arletti R., Benelli A., Bertolini A. (1990). "Sexual Behavior of Aging Male Rats is stimulated by Oxytocin." *European Journal of Pharmacology*; 179: 377–381.
9. Balfour M. y Coolen L. M. (2004). "Sexual Behavior and Sex-Associated Environmental Cues Activate the Mesolimbic System in Male Rats." *Neuropsychopharmacology*; 29: 718–730.
10. Balfour M. E., Brown J. L., Yu L., Coolen L. M. (2006). "Potential Contributions of Efferents from Medial Prefrontal Cortex to Neural Activation following Sexual Behavior in the Male Rat." *Neuroscience* 137, 1259–1276.
11. Bancroft J. (2005). "The Endocrinology of Sexual Arousal." *J. Endocrinol*; 186: 411–427.

12. Beach F. A. y Holz-Tucker A. M. (1949). "Effects of Different Concentrations of Androgen upon Sexual Behavior in Castrated Male Rats." *J Comp Physiol Psychol.*, 42: 433–453.
13. Berridge K. C. y Robinson T. E. (1998). "What is the Role of Dopamine in Reward: Hedonic Impact, Reward Learning, or Incentive Saliency?" *Brain Res. Rev.* 28, 309–369.
14. Bialy M., Beck J., Abramczyk P., Trzebski A., Przybylski J. (1996). "Sexual Behavior in Male Rats after Nitric Oxide Synthesis Inhibition." *Physiol. Behav.* 60, 139–143.
15. Birnbaum L. S. y Cohen-Hubal E. A. (2006). "Polybrominated Diphenyl Ethers: A case Study for using Biomonitoring Data to Address Risk Assessment Questions." *Environ Health Perspect*; 114: 1770–1775.
16. Brackett N. L., Luvone P. M., Edwards, D. A. (1986). "Midbrain Lesions, Dopamine and Male Sexual Behavior." *Behav. Brain Res.* 20, 231–240.
17. Bredt D. S. y Snyder S. H. (1990). "Isolation of Nitric Oxide Synthetase. A Calmodulin requiring Enzyme." *Proc Natl Acad Sci USA*; 87 (2): 682–685.
18. Buijs R. M. (1978). "Intra and Extrahypothalamic Vasopressin and Oxytocin pathways in the Rat. Pathways to the Limbic System, Medulla Oblongata and Spinal Cord." *Cell Tissue Res.* 192, 423–435.
19. Caffé A. R. y van Leeuwen F. W. (1983). "Vasopressin-immunoreactive Cells in the Dorsomedial Hypothalamic Region, Medial Amygdaloid Nucleus and Locus Coeruleus of the Rat." *Cell Tissue Res.* 233, 23–33.
20. Chan S. y Rovet J. (2003). "Thyroid Hormones in Fetal Central Nervous System Development. Fetal Matern." *Med. Rev.* 14, 177–208.
21. Coburn C.G., Curras-Collazo, M. C., Kodavanti, P. R. S. (2008). "In vitro Effects of Environmentally Relevant Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Congeners on Calcium Buffering Mechanisms in Rat Brain." *Neurochem. Res.* 33, 355–364.
22. Costa L. G., de Laat R., Tagliaferri S., Pellacani C. (2014). "A Mechanistic view of Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Developmental Neurotoxicity." *Toxicology Letters*; 230: 282–294.
23. Costa L. G. y Giordano G. (2007). "Developmental Neurotoxicity of Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants." *Neurotoxicology* 28, 1047–1067.
24. Curtis H. y Barnes N. (1993). "Biología" 5a Ed. Argentina. Ed. Médica Panamericana.

25. Da Silva M. P., Cedraz-Merchez P. L., Varanda W. A. (2014). "Effects of Nitric Oxide on Magnocellular Neurons of the Supraoptic Nucleus involve Multiple Mechanisms." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 47(2): 90–100.
26. De La Torre-Haro A. (2010). "Contaminantes Orgánicos Halogenados: PBDE, DBDPE, Decloranos, OH-PBDE y MeO-PBDE. Desarrollo de Metodologías Analíticas y Aplicación a Muestras Medioambientales" Universidad Autónoma de Madrid, 5–7.
27. Dominguez J. M., Brann J. H., Gil M., Hull E. M. (2006). "Sexual Experience Increases Nitric Oxide Synthase in the Medial Preoptic Area of Male Rats." *Behavioral Neuroscience* 120: 1389–1394.
28. Domjan M. (1992). "Adult Learning and Mate Choice: Possibilities and Experimental Evidence." *American Zoology*; 32: 48–61.
29. Edwards D. A., Griffis K. T., Tardival C. (1990). "Olfactory Bulb Removal: Effects on Sexual Behavior and Partner-Preference in Male Rats." *Physiology and Behavior* 48: 447–450.
30. Edwards D. A., Walter B., Liang P. (1996). "Hypothalamic and Olfactory Control of Sexual Behavior and Partner Preference in Male Rats." *Physiology and Behavior* 60: 1347–1354.
31. Engelmann M., Wotjak C.T., Ebner K., Landgraf R. (2000). "Behavioral Impact of Intraseptally released Vasopressin and Oxytocin in Rats." *Exp. Physiol* 855, 125S–130S.
32. Everitt B. J. y Bancroft J. (1991) "Of Rats and Men: The Comparative Approach to Male Sexuality." *Annual Review of Sex Research*; 2, 77–118.
33. Fabrellas B., Larrazábal D., Ángeles-Martínez M., Eljarrat E., Barceló D. (2004). "Optimization of Quadrupole Ion Storage Mass Spectrometric Conditions for the Analysis of selected Polybrominated Diphenyl Ethers. Comparative Approach with Negative Chemical Ionization and Electron Impact Mass Spectrometry." *J Mass Spectrom Oct*; 39 (10): 1168–1175.
34. Farina-Lipari, E., and Valentino, B. (1993). "Immunohistochemical Research on Vasopressin in the Accessory Hypothalamic Nuclei." *Ital. J. Anat. Embryol.* 98, 207–214.
35. Farina-Lipari, E., Valentino, B., Lipari, D. (1995). "Immunohistochemical Research on Oxytocin in the Hypothalamic Accessory Nuclei." *Ital. J. Anat. Embryol.* 100, 189–193.
36. Feelisch M., Stamler J. S. (1996). "Methods in Nitric Oxide Research." J Wiley y Sons, New York; 712 pp.

37. Geyer L. A. y Barfield R. J. (1978). "Influence of Gonadal Hormones and Sexual Behavior on Ultrasonic Vocalization in Rats: I. Treatment of Females." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 92: 438–446.
38. Gil M., Bhatt R., Picotte K. B., Hull E. M. (2011). "Oxytocin in the Medial Preoptic Area facilitates Male Sexual Behavior in the Rat." *Horm Behav*; 59: 435–443.
39. Gil M., Bhatt R., Picotte K. B., Hull E. M. (2013). "Sexual Experience increases Oxytocin Receptor Gene Expression and Protein in the Medial Preoptic Area of the Male Rat." *Psychoneuroendocrinology*; 38: 1688–1697.
40. Green J. (1996). "Mechanism of Flame Retardancy and Smoke Suppression- A Review." *Journal of Fire Science*. 14, 426–442.
41. Guevara M. A., Martinez-Pelayo M., Arteaga-Silva M., Bonilla-Jaime H., Hernandez-Gonzalez M. (2008). "Electrophysiological Correlates of the Mesoaccumbens System during Male Rat Sexual Behaviour." *Physiol. Behav.* 95, 545–552.
42. Hale R. C., LaGuardia M. J., Harvey E., Gaylor M. O. (2006). "Brominated Flame Retardant Concentrations and Trends in Abiotic Media." *Chemosphere*; 64: 181–186.
43. Harrad S., Ibarra C., Diamond M., Melymuk L. (2008). "Polybrominated Diphenyl Ethers in Domestic Indoor Dust from Canada, New Zealand, United Kingdom and United States." *Environ Int*; 34: 232–238.
44. Hindersinn R. R. y Wagner G.M. (1967). "Fire Retardancy." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* 7, 1–64.
45. Hites R. A., Foran J. A., Schwager S. J., Knuth B. A., Hamilton M. C., Carpenter D. O. (2004). "Global Assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers in Farmed and Wild Salmon." *Environ Sci Technol*; 38(19): 4945–4949.
46. Hull E. M., Lumley L. A., Matuszewich J., Dominguez J., Moses J., Lorrain D. S. (1994). "The roles of Nitric Oxide in Sexual Function of Male Rats." *Neuropharmacology* 33, 1499–1504.
47. Hull E. M., Meisel R., Benelli A., Bertolini A., Poggioli R., Cavazutti E., Calza L., Giardino L., Arletti R. (1995). "Nitric Oxide is involved in Male Sexual Behavior of Rats." *Eur. J. Pharmacol.* 294, 505–510.
48. Hull E. M., Wood R. I., McKenna K. (2006) "The Neurobiology of Male Sexual Behavior." In: Neill J. D. (Ed.) *Knobil & Neill's Physiology of Reproduction*, 3ra ed., vol. 2, San Diego, CA: Academic Press., 1729–1842.

49. Kippin T. E., Sotiropoulos V., Badih J., Pfaus J. G. (2004). "Opposing Roles of the Nucleus Accumbens and Anterior Lateral Hypothalamic Area in the Control of Sexual Behavior in the Male Rat." *Eur. J. Neurosci.* 19, 698–704.
50. Kita I., Yoshida Y., Nishino S. (2006). "An Activation of Parvocellular Oxytocinergic Neurons in the Paraventricular Nucleus in Oxytocin-induced Yawning and Penile Erection" *Neuroscience Research*; 54, 269–275.
51. Kodavanti P. R. S. y Ward T. R. (2005). "Differential Effects of Comercial Polybrominated Diphenyl Ether and Polychlorinated Biphenyl Mixtures on Intracellular Signaling in Rat Brain in vitro." *Toxicol. Sci.* 85, 952–962.
52. Kodavanti P. R. S. (2006). "Neurotoxicity of persistent Organic Pollutants: Possible Mode(s) of Action and Further Considerations." *Dose Response* (3):273–305.
53. Kodavanti P. R. S., Royland J. E., Osorio C., Winnik W. M., Ortiz P., Lei-Lei. (2015). "Developmental Exposure to a Commercial PBDE Mixture: Effects on Protein Networks in the Cerebellum and Hippocampus of Rats." *Environ Health Perspect*; 123(5): 428–436.
54. LaFranchi S. H., Haddow J. E., Hollowell J. G. (2005). "Is Thyroid Inadequacy during Gestation a Risk Factor for Adverse Pregnancy and Developmental Outcomes?" *Thyroid* 15, 60–71.
55. Lagalante A. F., Oswald T. D., Calvosa F. C. (2009). "Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Levels in Dust from previously owned Automobile at United States dealerships". *Environ Int*; 35: 539–544.
56. Lipari E. F., Lipari D., Gerbino A., Di Liberto D., Bellafiore M., Catalano M., Valentino B. (2001). "The Hypothalamic Magnocellular Neurosecretory System in developing Rats." *Eur. J. Histochem.* 45, 163–168.
57. Liu Y. C., Salamone J. D., Sachs B. D. (1997). "Impaired Sexual Response after Lesions of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in Male Rats." *Behav Neurosci*; 111: 1361–1367.
58. Matsumoto J., Urakawa S., Hori E., De Araujo M. F., Sakuma Y., Ono T., Nishijo H. (2012). "Neuronal Responses in the Nucleus Accumbens Shell during Sexual Behavior in Male Rats." *J. Neurosci.* 32, 1672–1686.
59. Meisel R. L., Sachs B. D. (1994). "The Physiology of Male Sexual Behavior." In: Knobil, E.; Neill, JD., editors. *Physiology of Reproduction*. 2. Raven Press; New York, 3–106.
60. Melis M. R. y Argiolas A. (2011). "Central Control of Penile Erection: A re-visitation of the Role of Oxytocin and its Interaction with Dopamine and Glutamic Acid in Male Rats." *Neuroscience and biobehavioral reviews*; 35: 939-955.

61. Melis M. R., Succu S., Mauri A., Argiolas A. (1998). "Nitric Oxide Production is Increased in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus of Male Rats during Non-contact Penile Erections and Copulation." *European Journal of Neuroscience*; 10: 1968–1974.
62. Moncada S. y Higgs A. (1993). "The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway." *N Engl J Med*; 329 (27): 2002–2012.
63. Morrison R. T. y Boyd R. N. (1998). "Química Orgánica", quinta edición. New York University. Pearson Educación.
64. Paxinos G. y Watson C. (1998). "The Brain Rat in Stereotaxic Coordinates." Academic Press. 6ª Ed.
65. Petreas M., She J., Brown F. R., Winkler J., Windham G., Rogers E., Zhao G., Bhatia R., Charles M. J. (2003). "High Body Burdens of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl Ether (BDE-47) in California Women." *Environ Health Perspect*; 111(9): 1175–1179.
66. Pfaff D. (2005). "Hormone-driven Mechanisms in the Central Nervous System Facilitate the Analysis of Mammalian Behaviours." *J. Endocrinol*, 184, 447–453.
67. Pfaus J. G., Kippin T. E., Centeno S. (2001). "Conditioning and Sexual Behavior: A review." *Horm Behav*; 40(2): 291–321.
68. Pfaus J. G., Kippin T. E., Coria-Avila G. (2003). "What can Animal Models tell us about Human Sexual Response? A Review." *Horm. Behav*; 14: 1–63.
69. Pfaus J. G. y Scepkowski L. A. (2005). "The Biologic Basis for Libido." *Current Sexual Health Reports*; 2: 95–100.
70. Pfaus J. G. y Wilkins M. F. (1995). "A novel Environment disrupts Copulation in Sexually Naive but not Experienced Male Rats: Reversal with Naloxone." *Physiology and Behavior*; 57: 1045–1049.
71. Pfeiffer C. A. y Johnston R. E. (1994). "Hormonal and Behavioral Responses of Male Hamsters to Females and Female Odors: Roles of Olfaction, the Vomeronasal System, and Sexual Experience." *Physiology and Behavior*; 55: 129–138.
72. Pollock J. S., Förstermann U., Mitchell J. A., Warner T. D., Schmidt H. H., Nakane M. (1991). "Purification and Characterization of Particulate Endothelium-derived Relaxing Factor Synthase from Cultured and Native Bovine Aortic Endothelial Cells." *Proc Natl Acad Sci USA*; 88 (23): 10480–10484.
73. Pomerantz S. M. y Clemens L. G. (1981). "Ultrasonic Vocalizations in Male Deer Mice (*Peromyscus maniculatus bairdi*), their Role in Male Sexual Behavior." *Physiology and Behavior* 27: 869–872.

74. Rahman F., Langford K. H., Scrimshaw M. D., Lester J. N. (2001). "Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants." *Sci. Total Environ.* 275, 1–17.
75. Rodríguez-Manzo G. y Fernández-Guasti A. (1995). "Opioid Antagonist and the Sexual Satiation Phenomenon." *Psychopharmacol*; 122: 131–136.
76. Rodríguez-Manzo G. y Hull E. M. (2009). "Male Sexual Behavior." *Hormones, Brain and Behavior*, 2nd Ed. San Diego: Academic Press; 1: 5–65.
77. Rodríguez-Manzo G. y Hull E. M. (2017). "Male Sexual Behavior." *Hormones, Brain and Behavior*, 2nd Ed. San Diego: Academic Press; 1: 6–65.
78. Rodríguez-Manzo G. y Pellicer F. (2007). "Electrical Stimulation of Dorsal and Ventral Striatum differentially alters the Copulatory Behavior of Male Rats." *Behav. Neurosci.* 124, 686–694.
79. Safe S. H. (1994). "Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Impact, Biochemical and Toxic Responses and implications for Risk Assessment." *Crit Rev Toxicol*; 24(2): 87–149.
80. Sato Y., Christ G. J., Horita H., Adachi H., Suzuki N., Tsukamoto T. (1999). "The Effects of Alterations in Nitric Oxide Levels in the Paraventricular Nucleus on Copulatory Behavior and Reflexive Erections in Male Rats." *Journal of Urology*; 162: 2182–2185.
81. Scepkowski L. A., Georgescu M., Pfaus J. G. (2005). "Neuroendocrine Factors in Sexual Desire and Motivation." In Goldstein, I., Meston, C., Davis, K., Traish, A. (Eds.), *Female Sexual Dysfunction*, 159–167.
82. Strakova S, Copland J. A., Lolait S. J., Soloff M. S. (1998). "ERK2 mediates oxytocin-stimulated PGE2 synthesis." 99. *Am J Physiol. Apr*; 274(4 Pt 1): E634–641.
83. Tobin V. A., Hashimoto H., Wacker D. W., Takayanagi Y., Langaese K., Caquineau C., Noack J., Landgraf R., Onaka T., Leng G. (2010). "An Intrinsic Vasopressin System in the Olfactory Bulb is Involved in Social Recognition." *Nature* 464, 413–417.
84. Troitzsch J. H. (1983). "Methods for the Fire Protection of Plastics and Coatings by Flame Retardant and Intumescent Materials." *Progress in Organic Coatings.* 11, 41–69.
85. Ulsamer A. G., Osterberg R. E., McLaughlin J. R. (1980). "Flame Retardant Chemicals in Textiles." *Clin Toxicol.* 17, 101–131.

86. van Kesteren R. E., Tensen C. P., Smith A. B., van Minnen J., van Soest P. F., Kits K. S., Meyerhof W., Richter D., van Heerikhuizen H., Vreugdenhil E. (1995). "A Novel G Protein-coupled Receptor mediating both Vasopressin and Oxytocin-like functions of Lys-Conopressin in *Lymnaea stagnalis*." *Neuron* 15, 897–908.
87. van Leeuwen F. y Caffé R. (1983). "Vasopressin-immunoreactive Cell Bodies in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis of the Rat." *Cell Tissue Res.* 228, 525–534.
88. von Zastrow M. (2002). "Regulation of G Protein-coupled Receptors by Phosphorylation and Endocytosis *Neuropsychopharmacology: 60 the Fifth Generation of Progress*, capítulo 5: Regulation of G protein-coupled Receptors.", American college of Neuropsychopharmacology, 59–70.
89. von Zastrow M., Svingos A., Haberstock-Debic H., Evans C. (2003). "Regulated Endocytosis of Opioid Receptors: Cellular Mechanisms and Proposed Roles in Physiological Adaptation to Opiate Drugs." *Curr. Opin Neurobiol.* 13, 348–353.
90. WHO. World Health Organization. (1997). "Flame Retardants: A General Introduction." *Environmental Health Criteria*, pp. 192.
91. Wiegand V., y Gimpl G. (2012). "Specification of the Cholesterol Interaction with the Oxytocin Receptor using a Chimeric Receptor Approach." *Eur. J. Pharmacol.* 676, 12–19.
92. Wise R. A. y Rompre P. P. (1989). "Brain Dopamine and Reward." *Annu. Rev. Psychol.* 40, 191–225.
93. Woodson J. C. (2009). "Including 'Learned Sexuality' in the Organization of Sexual Behavior." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 261: 69–80.
94. Xie Q. W., Cho H. J., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D. (1992). "Cloning and Characterization of Inducible Nitric Oxide Synthase from Mouse Macrophages. *Science*; 256 (5054): 225–228.
95. Yogui G. T. y Sericano J. L. (2009). "Polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants in the U.S. Marine Environment: A review." *Environ Int*; 35(3): 655–666.
96. Zhou T., Ross D. G., DeVito M. J., Crofton K. M. (2001). "Effects of Short-term in vivo Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers on Thyroid Hormones and Hepatic Enzyme Activities in Weanling Rats." *Toxicol. Sci.* 61, 76.