



Cambios en la actividad neuronal inducidos por el cadmio y el 17β -estradiol en la zona compacta de la substantia nigra de ratas

AR Noriega-León ¹.

AR Torres-Hernández ².

JA González Vegas ³.

¹Laboratorio de Neurofisiología. Cátedra de Fisiología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

²Laboratorio de Neurofisiología. Cátedra de Fisiología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. arelis.torres@ucv.ve

³Laboratorio de Neurofisiología. Cátedra de Fisiología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 12 de Julio del 2009 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

CHANGES IN NEURONAL ACTIVITY INDUCED BY CADMIUM AND 17β -ESTRADIOL IN SUBSTANTIA NIGRA ZONA COMPACTA IN RATS

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD NEURONAL INDUCIDOS POR EL CADMIO Y EL 17β -ESTRADIOL EN LA ZONA COMPACTA DE LA SUBSTANTIA NIGRA DE

RATAS

Ha sido reportado que el cadmio (Cd^{2+}) tiene efectos similares a los producidos por el estradiol (E2) sobre el útero y las glándulas mamarias. En vista de la importancia del Cd^{2+} como contaminante ambiental, y dado que han sido demostrados efectos del E2 en varias zonas del sistema nervioso central, se decidió estudiar si a este nivel el Cd^{2+} aplicado iontoforéticamente, tenía efectos similares a los producidos por el 17β -estradiol. Se registraron 12 neuronas en la zona compacta de la Substantia nigra, en las cuales se pudo aplicar tanto el Cd^{2+} como el E2 a la misma neurona (ambos con una corriente de 40 nA). En éstas el Cd^{2+} y/o el E2 produjeron cambios significativos y predominantemente excitatorios sobre su actividad. Estos cambios comienzan a observarse hacia el final de la aplicación y su duración es variable, siendo frecuente que se prolongue varios minutos. Ante la aplicación del metal, diez neuronas respondieron incrementando su frecuencia, mientras que una se inhibió y la otra no respondió. La frecuencia control se recuperó en un período que no sobrepasó los 35 minutos. Al aplicar E2, ocho neuronas se excitaron y 4 se inhibieron. Estas respuestas se inician más rápidamente que las que produce el Cd^{2+} . Se evidenció una alta coincidencia en los efectos del Cd^{2+} y del E2 (75%) pero con cursos temporales diferentes. Además, en dos células se pudo comprobar que el Cd^{2+} potenciaba el efecto excitatorio del E2. Estos resultados sugieren que el Cd^{2+} tiene efectos similares a los del estradiol en la Substantia nigra del sistema nervioso central.

Palabras clave: cadmio, 17β -estradiol, estrógeno, sistema nervioso central, Substantia Nigra, iontoforesis.

Changes in neuronal activity induced by cadmium and 17β -estradiol in substantia nigra zona compacta in rats.

It has been reported that cadmium (Cd^{2+}) has similar effects to those produced by estradiol (E2) on the uterus and mammary glands. Given the importance of Cd^{2+} as an environmental pollutant, and its effects on the central nervous system, we decided to explore whether cadmium applied iontophoretically has similar effects to those produced by 17β -estradiol in the brain. Twelve neurons in zona compacta of the Substantia Nigra were recorded, in these neurons both Cd^{2+} and E2 were tested on the same neuron (both applied with 40 nA). In these Cd^{2+} and/or E2 produced significant changes on their firing rate these being predominantly excitatory. These changes becoming apparent towards the end of the application, and usually lasting for several minutes. When the metal was applied ten neurons responded by increasing its firing rate, while one was inhibited and the other one did not respond. In general, the effect was over within 30 minutes. When E2, was applied eight neurons were excited and 4 were inhibited. These responses were initiated faster than those caused by cadmium. In summary in 75% of the neurons tested both cadmium and estradiol produced the same effect, but with different time courses. In addition, in two cells it was found that Cd^{2+} enhanced the excitatory effect of E2. These results suggest that Cd^{2+} has effects, on the firing frequency, similar to those of estradiol on the Substantia Nigra

Keywords: cadmium, 17β -estradiol, estrogen, central nervous system, Substantia Nigra, iontophoresis.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por metales pesados (mercurio, plomo, cadmio, etc) es un problema realmente grave, al cual no se le ha prestado suficiente atención y del que apenas estamos comenzando a ver las consecuencias. La utilización de estos y otros elementos contaminantes en la fabricación de productos variados tales como cigarrillos, baterías recargables, recipientes de PVC, aleaciones metálicas, o pigmentos especiales, así como en la producción de compuestos de libre comercio como fertilizantes, pesticidas, herbicidas, fungicidas, etc., generalmente no son acompañados de programas de procesamiento de desechos tóxicos adecuados, o de una política de concientización de la población, sobre todo en los países del tercer mundo. Normalmente estos productos terminan arrojados al ambiente, junto con los desechos comunes, exponiendo a plantas y animales por igual a sus acciones ^(12, 20, 32, 35). Numerosas investigaciones han alertado acerca de las consecuencias que este tipo de elementos tienen en los organismos, siendo especialmente alarmantes los efectos en la capacidad reproductiva, tanto en humanos ^(24, 36, 44) como en animales ^(11, 30). En cuanto al tejido nervioso, estudios demuestran que la acumulación de Cd^{2+} depende de la permeabilidad vascular ^(4, 5, 6, 29). También puede ingresar a través de las neuronas olfativas primarias (por ejemplo en el humo del cigarrillo), y de ellas hacia neuronas secundarias y terciarias ⁽⁴⁰⁾. El Cd^{2+} también puede atravesar la placenta ^(19, 28) y ser expulsado con la leche materna ⁽³⁴⁾. Se han descrito los efectos neurotóxicos del Cd^{2+} ⁽⁴⁵⁾, y los cambios en los sistemas de neurotransmisores ^(10, 29). Ha sido propuesto que los efectos del cadmio (Cd^{2+}) parecen deberse a que este metal forma complejos que pueden interactuar con los receptores para estrógeno en órganos como el útero y las glándulas mamarias, lo cual explicaría los efectos estrogenizantes observados ^(2, 9, 27, 39). Son también conocidos los efectos que produce el Cd^{2+} sobre ciertos canales, incluyendo el bloqueo inespecífico de los canales de calcio voltaje-dependientes ^(18, 25, 43). Por otra parte, el sistema nervioso ha mostrado ser un tejido altamente sensible a las hormonas sexuales, no sólo durante las etapas tempranas del desarrollo ^(26, 31), sino también en el tejido ya maduro, en el cual modifica la actividad neuronal ^(1, 3, 13, 14, 17, 37, 41, 42). Se sabe además, que las áreas que responden a ellas no son sólo las implicadas en el control neuroendocrino (eje hipotalámico-hipofisiario), sino que abarcan extensas zonas del sistema nervioso central y periférico ⁽⁸⁾. Por ello decidimos evaluar si el Cd^{2+} tiene efectos similares a los producidos por el estradiol (E2) en el SNC. Se escogió la zona compacta de la Substantia Nigra (zcSN) porque trabajos anteriores demuestran que esta estructura, involucrada en el control motor, responde a la aplicación iontoforética de E2 ^(13, 14, 42). En el presente trabajo se evalúan y comparan los cambios en la actividad eléctrica de las neuronas nigrales luego de aplicar Cd^{2+} y E2 a la misma neurona, mediante la técnica de microiontoforesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas machos de la variedad Sprague-Dawley, con un peso comprendido entre 250-300 gr. Las ratas fueron mantenidas en grupos de 4-5 animales, en jaulas metálicas, en ambiente con períodos de luz-oscuridad controlados de 12 horas c/u (6:00 am a 5:59 pm luz; 6:00 pm a 5:59 am oscuridad) a temperatura y humedad ambientales. Se les suministró agua y alimento *ad*

libitum. Se utilizó solución de Uretano al 20% como anestésico general (1g/Kg; i.p.) y solución de Lidocaína al 2% como anestésico local. La zcSN fue abordada estereotáxicamente utilizando las coordenadas siguientes, obtenidas del atlas de Paxinos y Watson, 1982 ⁽³³⁾: AP= 5-5,5 mm; L = 1,5-2 mm; V = 6-7 mm. Se empleó un microelectrodo múltiple de vidrio (3-5 μm $\varnothing$) para el registro de la actividad eléctrica de las neuronas y para la aplicación microiontoforética del Cd^{2+} (CdCl_2 , 0,25 mM; pH 7.4) y del estradiol (hemisuccinato de 17 β -estradiol, 0,25 mM; pH 7.4) directamente en la zcSN. La actividad eléctrica de las neuronas de la zcSN se registró mediante técnicas electrofisiológicas convencionales, utilizando la barra central del microelectrodo de vidrio, la cual contenía una solución de azul de pontamina al 2% en acetato de sodio 0,5M y con una resistencia de 1-10 M Ω . En primera instancia, las espigas fueron identificadas como pertenecientes a la zcSN sobre la base de criterios electrofisiológicos previamente establecidos como: (1) forma y duración de la onda de cada potencial de acción, (2) frecuencia de descarga, y (3) patrón de descarga característicos de esta zona ^(21, 22, 23). La actividad espontánea inicial de cada célula fue registrada de manera continua, por un período no menor de 20 minutos para comprobar su estabilidad, antes de proceder a aplicar pulsos de Cd^{2+} o de E2 (40 nA x 5 min, c/u). Posterior a la aplicación, se registró la actividad hasta la recuperación. Los pulsos se aplicaron en orden aleatorio (primero el Cd^{2+} seguido de E2 o viceversa). En dos células a las que previamente se les había probado el efecto del Cd^{2+} y del E2 por separado, se procedió a aplicar de manera consecutiva los dos pulsos, con apenas 5 minutos de separación, comenzando con el de Cd^{2+} y posteriormente con el de E2. En el presente estudio se consideraron como cambios significativos aquellas variaciones de la frecuencia de disparo de al menos un 50% de aumento (excitaciones) o de disminución (inhibiciones) en relación con la frecuencia promedio registrada durante el periodo inicial. Al finalizar cada registro, se procedió a marcar la zona haciendo pasar una corriente de 20 μA durante 20 minutos a través de la barra de registro llena con la solución de azul de Pontamina. El cerebro fue fijado profundiendo al animal aún anestesiado con una solución de formol al 10 % por vía intracardiaca. Posteriormente, la ubicación exacta del sitio de registro de cada neurona fue corroborada histológicamente. Equivalente a la realización de una curva dosis-respuesta, en el presente trabajo se procedió a realizar una curva corriente-respuesta. Para ello, se aplicó el Cd^{2+} a las neuronas nigrales con pulsos de corriente de intensidad creciente, partiendo de 10 nA, hasta 200 nA, con incrementos progresivos de 10 nA. Los efectos significativos se observaron claramente a partir de 40 nA. Se decidió utilizar este valor de corriente para realizar el estudio sobre el efecto del Cd^{2+} en la actividad neuronal, por dos razones: (1) es el mismo valor de corriente al cual se han venido observado y estudiando los efectos del E2 sobre las mismas neuronas, en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio y (2) se prefiere utilizar la mínima intensidad necesaria para observar los efectos, a los fines de minimizar los cambios producidos por la corriente propiamente dicha, sobre la excitabilidad neuronal.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 12 neuronas de la zcSN, a las cuales se les probó tanto el efecto de la aplicación microiontoforética de Cd^{2+} como de E2, según el protocolo propuesto. Como ha sido descrito en las ratas adultas, las neuronas de la zcSn son afectadas por la aplicación microiontoforética de E2, en las cuales puede producir tanto efectos excitatorios como inhibitorios ⁽⁴²⁾. En este estudio, la mayoría de las neuronas respondieron excitándose ante la

aplicación del E2 (8 de 12). Estas excitaciones se caracterizaron por ser de rápida aparición después de comenzada la aplicación del pulso de E2 (2 ± 1 min). La máxima excitación se observó también muy rápidamente (4 ± 1 min). En cambio, la duración de estos efectos fue muy variable, pudiendo observarse en algunos casos una recuperación casi inmediata, mientras que en algunas neuronas este efecto se prolongó hasta por 20 minutos después de terminado el pulso de la hormona. Aunque el criterio inicial para considerar significativo un cambio en la frecuencia de descarga fue de 50%, todos los cambios superaron en mucho este criterio, observándose incrementos de hasta 300%. Así mismo, se pudo comprobar que la aplicación de Cd^{2+} también tuvo efecto sobre estas neuronas, siendo nuevamente predominante el efecto excitatorio (10 de 12). Similar a lo que ocurrió con E2, estas excitaciones fueron en su mayoría del orden de 300%. Sin embargo, el curso temporal de estos efectos fue diferente al observado con el E2. En el caso del Cd^{2+} , todas las neuronas comienzan a mostrar un incremento significativo en su frecuencia solo hacia el final del pulso de Cd^{2+} , o incluso después de terminado éste (9 ± 5 min). También hubo diferencias en el tiempo de recuperación, ya que con el Cd^{2+} , la actividad aumentada se mantuvo en algunos casos hasta por 30-35 minutos. A pesar de estas diferencias en el curso temporal de las excitaciones provocadas por el E2 y el Cd^{2+} , se evidenció una alta coincidencia en los efectos excitatorios del Cd^{2+} y del E2 en cada célula. En la Tabla 1, se muestra este resultado, observándose que todas las células que se excitaron con el E2 también se excitaron con el Cd^{2+} , independientemente del orden en que fueron aplicados.

		ESTRADIOL			Total
		EXCITACIÓN	INHIBICIÓN	SIN CAMBIOS	
CADMIO	EXCITACIÓN	8	2	0	10
	INHIBICIÓN	0	1	0	1
	SIN CAMBIOS	0	1	0	1
Total		8	4	0	12

TABLA 1. Número de neuronas agrupadas según los cambios mostrados al aplicarles estradiol y cadmio. Nótese que de las 12 neuronas estudiadas, 8 se excitaron tanto con cadmio como con estradiol.

Como se mencionó anteriormente, también se observaron efectos inhibitorios sobre las neuronas nigrales, ante la aplicación de E2 y de Cd^{2+} , pero en un menor número de neuronas. Con E2 se inhibieron 4 neuronas y con Cd^{2+} una sola. En tres de estas cinco inhibiciones se observó un 100% de inhibición en algún momento del período posterior al de la aplicación del pulso, pero este tiempo de máxima respuesta inhibitoria fue muy variable entre célula y célula. También se observó coincidencia entre los efectos inhibitorios de E2 y Cd^{2+} . Como se ve en la tabla 1, la única neurona que se inhibió con el metal fue una de las cuatro neuronas que también se inhibió con la hormona. Sólo dos células de las 12 estudiadas, mostraron efectos opuestos, ya que aumentaron su frecuencia de disparo ante el pulso de Cd^{2+} , pero se inhibieron con el de E2. Finalmente, una neurona que no respondió a la aplicación del Cd^{2+} , si lo hizo ante el E2, mostrando una inhibición. En la Figura 1 se pueden observar los registros de dos células de la

zcSN, en la cual se muestran: (A) una respuesta excitatoria al Cd^{2+} , (B) una respuesta inhibitoria al Cd^{2+} .

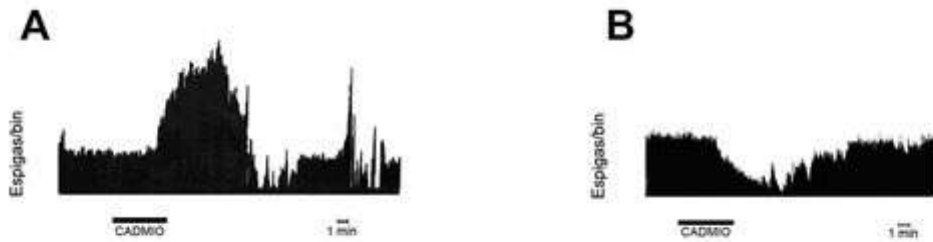


FIGURA 1. Registros continuos de la actividad neuronal de dos células de la zcSN. En A se puede apreciar una respuesta excitatoria al Cd^{2+} , mientras que en B, se muestra un ejemplo de una respuesta inhibitoria.

En la Figura 2 se muestra un registro continuo de la actividad de una célula en el que se observa tanto el efecto excitatorio del Cd^{2+} como el efecto también excitatorio de E2. En el mismo registro se puede observar que la magnitud de los cambios producidos por el metal y la hormona sobre la frecuencia de disparo son de magnitudes comparables.

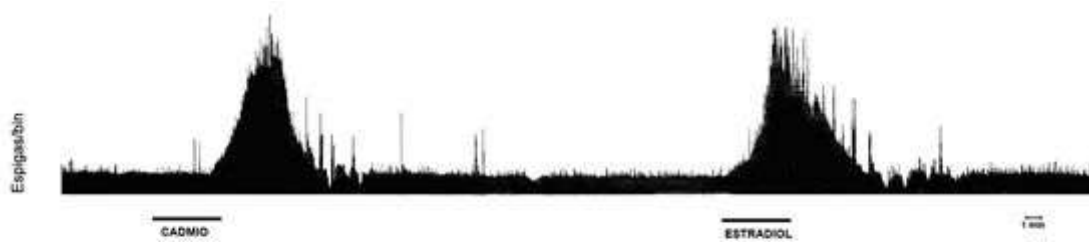


FIGURA 2. Registro continuo de la actividad de una neurona de la zcSN a la cual se le aplicó primero un pulso de Cd^{2+} , mostrando un incremento significativo en la frecuencia de descarga. Luego de un periodo de recuperación de aproximadamente 25 minutos, se le aplicó un pulso de E_2 , el cual también produjo una respuesta excitatoria.

En dos de las células estudiadas se pudo realizar la aplicación de Cd^{2+} y de E_2 dos veces, siendo la separación entre los dos pulsos de unos pocos minutos en la segunda aplicación. En la Figura 3 se muestra uno de estos registros, en donde se observa el efecto excitatorio que tienen cada uno por separado sobre la actividad neuronal (ya descritos), y seguidamente se observa que durante la segunda aplicación del E_2 , la magnitud del efecto excitatorio se incrementa de manera importante al ser precedido por el pulso de Cd^{2+} , alcanzando una respuesta máxima de aproximadamente 15 veces la actividad basal, mucho mayor que la que alcanzó por sí solo en la misma célula 20 minutos antes. Además en esa célula se observa que una vez terminado el pulso de E_2 , la actividad tiende a recuperar su nivel inicial, pero muestra brotes de actividad aumentada, aunque de menor magnitud y duración que el producido durante la aplicación de la hormona.

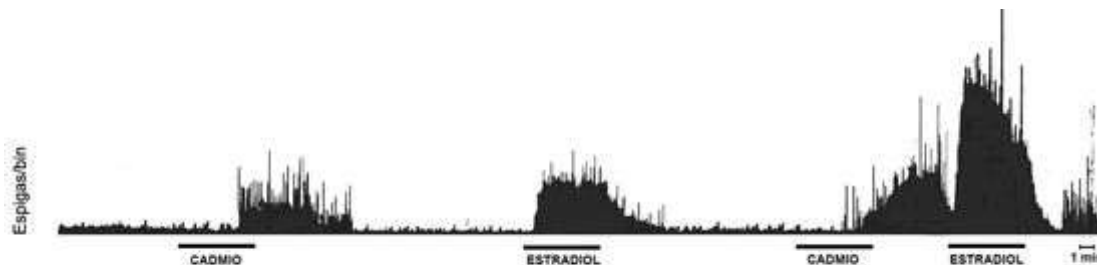


FIGURA 3. Registro continuo de la actividad de una neurona de la zcSN, en el cual se muestran las respuestas excitatorias al pulso de Cd^{2+} y de E_2 , por separado. Además se muestra el efecto potenciador que tiene una aplicación de Cd^{2+} minutos antes de una segunda aplicación de E_2 .

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación iontoforética de Cd^{2+} produce cambios en la frecuencia de descarga de las neuronas de la zona compacta de la Substantia Nigra, y, además, que estos cambios son similares a los producidos por la administración de 17 β -estradiol. Sin embargo, los cursos temporales mostrados por la hormona y el metal para producir tales efectos sí difieren. Estos efectos son de corta latencia, indicando un mecanismo de acción rápido y muy efectivo, aunque reversible, pero los del Cd^{2+} requieren de un tiempo un poco mayor que el de E2. Anteriormente Rozear y col., 1970 ⁽³⁸⁾ habían reportado efectos del Cd^{2+} aplicado iontoforéticamente en las neuronas de la corteza cerebral y tallo encefálico de gatos. Sin embargo, estos autores encuentran que el metal produce inhibiciones en todas, a diferencia del presente estudio en el que la mayoría de las respuestas encontradas (83%) fueron excitatorias, y solo produce inhibiciones en unas pocas neuronas. Estas discrepancias en los resultados pueden deberse a diferencias intrínsecas de las neuronas de cada zona estudiada, o también de la especie empleada en cada estudio. De cualquier forma, en ambos estudios se pone en evidencia el profundo efecto que este metal tiene en la actividad neuronal. Se sabe que el Cd^{2+} es capaz de bloquear canales de calcio voltaje-dependientes ^(7, 15, 16, 25). Mediante este mecanismo, éste y otros metales pesados han mostrado ser potentes inhibidores de la transmisión sináptica, aún a muy bajas concentraciones en el medio. Sin embargo no parece ser este el mecanismo por el cual se puedan explicar las excitaciones producidas por el Cd^{2+} , salvo que se invoquen mecanismos de bloqueo de la inhibición ⁽⁴³⁾. En vista de la coincidencia de los efectos del Cd^{2+} y del estradiol, luce más probable que el mecanismo de acción sea a través de la interacción con los receptores estrogénicos, mimetizando así los efectos del E2 ^(2, 9, 27, 39). La diferencia en el curso temporal de los efectos producidos por la hormona y por el Cd^{2+} , puede deberse a que las cantidades liberadas de Cd^{2+} y de E2 con cada pulso de corriente no son necesariamente idénticas en su actividad biológica, a pesar de utilizarse los mismos parámetros de aplicación. Los efectos producidos por el E2 fueron más potentes cuando la aplicación de esta hormona fue precedida pocos minutos antes por un pulso de Cd^{2+} , lo cual sugiere un efecto potenciador del metal sobre la respuesta al E2. Esto pudiera deberse a que el mecanismo de acción sea a través de la estimulación de receptores estrogénicos. Los presentes resultados muestran que el Cd^{2+} es capaz de modificar la excitabilidad neuronal y produce cambios similares a los producidos por la estimulación estrogénica, y potenciar los efectos estrogénicos en algunas neuronas. En vista de la importancia creciente del Cd^{2+} como contaminante ambiental, es importante entonces tomar en cuenta que los efectos estrogenizantes del Cd^{2+} también pueden estar presentes en el sistema nervioso central.

CONCLUSIONES

- La aplicación iontoforética de Cadmio en la zona compacta de la Substantia Nigra, modifica la frecuencia de descarga de estas neuronas.
- La mayoría de las neuronas respondieron al Cadmio con incrementos en la frecuencia de disparo.
- De manera similar, la mayoría de las neuronas estudiadas también respondieron al Estradiol con incrementos de la frecuencia.

- Los cursos temporales mostrados por los efectos del Cadmio y el Estradiol fueron, sin embargo, diferentes. Los períodos de latencia, respuesta máxima y recuperación fueron más cortos para la hormona que para el Cadmio.
- Existe una alta coincidencia en los efectos ejercidos por el Cadmio y el Estradiol sobre las células de la zona compacta de la Substantia Nigra. Las 8 neuronas que se excitaron con Estradiol también lo hicieron con Cadmio. La única neurona que se inhibió con Cadmio, también se inhibió con estradiol. Solo 3 neuronas, de las 12 estudiadas mostraron cambios diferentes al serles aplicados los pulsos de Estradiol y de Cadmio.
- Los efectos producidos por el Estradiol mostraron ser más intensos si la aplicación de esta hormona es precedida pocos minutos antes por un pulso de Cadmio, lo que sugiere un efecto potenciador del Cadmio sobre los efectos del Estradiol.

REFERENCIAS

1. Aguilar C, Gottberg E, González-Vegas JA. Efectos del benzoato de estradiol sobre la respuesta al glutamato en células del núcleo caudado en ratas. *Acta Científica Venezolana* 1990. 41(Supl.1): 166.
2. Alonso-González C, González A, Mazarrasa O, Güezmes A, Sánchez-Mateos S, Martínez-Campa C, Cos S, Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD. Melatonin prevents the estrogenic effects of sub-chronic administration of cadmium on mice mammary glands and uterus. *J Pineal Res.* 2007. 42(4): 403-10.
3. Amaro SJ, Gottberg E, Aguilar C, Torres AR, González-Vegas JA. Efectos del 17b-estradiol en la transmisión corticostriada. *Rev. Farmacol. Clin. Exp.* 1992. Número especial, 343.
4. Arvidson B, Tjälve H. Distribution of ¹⁰⁹Cd in the nervous system of rats after intravenous injection. *Acta Neuropathol.* 1986. 69(1-2): 111-6.
5. Arvidson B. Autoradiographic localization of cadmium in the rat brain. *Neurotoxicology.* 1986. 7(3): 89-96.
6. Arvidson B. Retrograde axonal transport of cadmium in the rat hypoglossal nerve. *Neurosci Lett.* 1985. 62(1): 45-9.
7. Atchison WD. Effects of neurotoxicants on synaptic transmission: lessons learned from electrophysiological studies. *Neurotoxicol Teratol.* 1988. 10(5):393-416.
8. Boulware MI, Mermelstein PG. The influence of estradiol on nervous system function. *Drug News Perspect.* 2005. 18(10): 631-637.
9. Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Martin MB. Cadmium--a metallohormone? *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009. 238(3):266-271.
10. Caride A, Fernández-Pérez B, Cabaleiroa T, Esquifino AI, Lafuente A. Cadmium exposure disrupts GABA and taurine regulation of prolactin secretion in adult male rats. *Toxicol Lett.* 2009. 185(3): 175-9.

11. Castellini C, Mourvaki E, Sartini B, Cardinali R, Moretti E, Collodel G, Fortaner S, Sabbioni E, Renieri T. *In vitro* toxic effects of metal compounds on kinetic traits and ultrastructure of rabbit spermatozoa. *Reprod. Tox.* 2009. 27(1): 46-54.
12. Cheung KC, Leung HM, Wong MH. Metal concentrations of common freshwater and marine fish from the Pearl River Delta, south China. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2008. 54(4): 705-715.
13. Chiodo LA, Chaggiula AR. Alterations in basal firing rate and autoreceptor sensitivity of dopamine neurons in the substantia nigra following acute and extended exposure to estrogen. *Eur. J Pharmacol.* 1980. 67: 165-166.
14. Chiodo LA, Chaggiula AR. Substantia nigra dopamine neurons: alterations in basal discharge rates and autoreceptor sensitivity induced by estrogen. *Neuropharmacol.* 1983. 22: 593-599.
15. Cooper GP, Manalis RS. Influence of heavy metals on synaptic transmission: a review. *Neurotoxicology.* 1983. 4(4):69-83.
16. Cooper GP, Suszkiw JB, Manalis RS. Heavy metals: effects on synaptic transmission. *Neurotoxicology.* 1984. 5(3):247-66.
17. Cunningham RL, Claiborne BJ, McGinnis MY. Pubertal exposure to anabolic androgenic steroids increases spine densities on neurons in the limbic system of male rats. *Neuroscience.* 2007. 150(3): 609-15.
18. Elinder F, Arhem P. Metal ion effects on ion channel gating. *Q Rev Biophys.* 2003. 36(4):373-427.
19. Falcón M, Viñas P, Osuna E, Luna A. Environmental exposures to lead and cadmium measured in human placenta. *Arch Environ Health.* 2002. 57(6): 598-602.
20. Ferré-Huguet N, Martí-Cid R, Schuhmacher M, Domingo JL. Risk assessment of metals from consuming vegetables, fruits and rice grown on soils irrigated with waters of the Ebro River in Catalonia, Spain. *Biol Trace Elem Res.* 2008. 123(1-3): 66-79.
21. Grace AA, Bunney BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci.* 1984. 4(11):2866-76.
22. Grace AA, Bunney BS. The control of firing pattern in nigral dopamine Neurons: burst firing. *J Neurosci.* 1984. 4(11):2877-90.
23. Grace AA, Onn SP. Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci.* 1989. 9(10):3463-81.
24. Gray LE Jr, Ostby J. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicol Ind Health.* 1998. 14(1-2):159-84.
25. Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J Biol Chem.* 1987. 262:16333-7.

26. Johansen JA, Jordan CL, Breedlove SM. Steroid hormone masculinization of neural structure in rats: a tale of two nuclei. *Physiol Behav.* 2004. 83(2): 271-7.
27. Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland.. *Nat Med.* 2003. 9(8):1081-1084.
28. Kutlu T, Karagozler AA, Gozukara EM. Relationship among placental cadmium, lead, zinc, and copper levels in smoking pregnant women. *Biol Trace Elem Res.* 2006. 114(1-3): 7-17.
29. Lafuente A, González-Carracedo A, Romero A, Cano P, Esquifino AI. Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels. *Toxicol Lett.* 2004. 146(2): 175-82.
30. Nampoothiri LP, Gupta SJ. Biochemical effects of gestational coexposure to lead and cadmium on reproductive performance, placenta, and ovary. *Biochem Mol Toxicol.* 2008. 22(5):337-44.
31. Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Motta M. Sexual differentiation of the brain: role of testosterone and its active metabolites. *J Endocrinol Invest.* 2004. 27(6 Suppl): 120-7.
32. Oporto C, Vandecasteele C, Smolders E. Elevated cadmium concentrations in potato tubers due to irrigation with river water contaminated by mining in Potosí, Bolivia. *J Environ Qual.* 2007. 36(4): 1181-6.
33. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York, 1982.
34. Petersson Grawé K, Oskarsson A. Cadmium in milk and mammary gland in rats and mice. *Arch Toxicol.* 2000. 73(10-11): 519-27.
35. Petroczi A, Naughton DP. Mercury, cadmium and lead contamination in seafood: a comparative study to evaluate the usefulness of Target Hazard Quotients. *Food Chem Toxicol.* 2009. 47(2): 298-302.
36. Queiroz EKR, Waissmann W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2006. 22(3):485-493.
37. Romeo RD. Puberty: a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development.. *J Neuroendocrinol.* 2003. 15(12): 1185-92.
38. Rozear M, DeGroof R, Somjen G. Effects of micro-iontophoretic administration of divalent metal ions on neurons of the central nervous system of cats. *J. Pharmacol. Ex. Ther.* 1970. 176 (1): 109-118.
39. Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. Activation of Estrogen Receptor- α by the Heavy Metal Cadmium. *Mol Endocrinol.* 2000. 14(4):545-553.
40. Tjälve H, Henriksson J, Tallkvist J, Larsson BS, Lindquist NG. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacol Toxicol.* 1996. 79(6): 347-356.

41. Torres AR, González-Vegas JA. Efectos de la 17 α -hidroxi-progesterona sobre la transmisión cortico-caudado en ratas. *Acta Científica Venezolana*. 1999. 50: 227-232.
42. Torres-Hernández AR, González-Vegas JA. Effects of 17beta-estradiol on the spontaneous activity of substantia nigra neurons: evidence for a non-genomic mechanism. *Brain Res*. 2005. 1049(1):1-7.
43. Wang S, Gu Y, Wang HL, Li XM, Wang M, Sun LG, Ruan DY. Inhibitory effect of Cd²⁺ on glycine-induced chloride current in rat hippocampal neurons. *Brain Research Bulletin* 69 (2006) 680–686.
44. Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2000. 6(2):122-31.
45. Zheng W. Toxicology of choroid plexus: special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microsc Res Tech*. 2001. 52(1):89-103.