



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

Estudio comparativo de los efectos de la administración neonatal de genisteína y estradiol sobre la morfometría testicular de rata Wistar.

T E S I S

Para obtener el grado de

Maestro en Biología de la Reproducción Animal

Presenta el:

Biol. Exp. Luis Ramón Hernández López

Comité:

Cotutores: Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Asesor: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura.

Comité Tutorial

CODIRECTORES:

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Unidad Iztapalapa
Universidad Autónoma Metropolitana
mrtc@xanum.uam.mx

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Departamento de Biología
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México.
camachoarroyo@gmail.com

ASESOR:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Unidad Iztapalapa
Universidad Autónoma Metropolitana
pgdm@xanum.uam.mx

Miembros del Jurado

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
Campo II, Facultad de Estudios Superiores, UNAM.
mecbloy@yahoo.com.mx

Dra. Edith Arenas Ríos
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.
editharenas2000@yahoo.com.mx

Dr. Miguel Ángel León Galván
Departamento de Biología de la Reproducción.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.
leon@xanum.uam.mx

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la Beca para Alumnos de Posgrado de Nueva Creación , con base en el Acuerdo del Rector General de la UAM 02/2011.

Al CONACYT por la beca con número de registro 509417.

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal pertenece al PNPC del CONACYT, con registro 003797.

El trabajo experimental se realizó, casi en su totalidad, en el Laboratorio de Neurobiología Tisular, del Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, Unidad Iztapalapa de la UAM

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Estudio comparativo de los efectos de la administración neonatal de genisteína y estradiol sobre la morfometría testicular de rata Wistar", con fecha 29 de julio del 2015.



Presidente

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM



Secretaria

Ma. Esther Cruz Beltrán
División de Estudios de Posgrado e Investigación, UNAM.



Vocal

Dra. Edith Arenas Ríos
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM



Vocal

Dr. Miguel Ángel León Galván.
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM

Dedicatorias y Agradecimientos.

Con todo cariño y amor a las personas que jamás se cansaron de brindarme su apoyo, consejos y amor, sin importar cuántas veces fallé ni lo rebelde que siempre fui. No tengo palabras para expresar lo agradecido que estoy de que jamás hayan dejado de creer en mí, de que me hayan brindado la vida tantas veces. ¡LES DEBO TODO! Gracias.

Mis padres

A tu paciencia, comprensión, apoyo y amor. No sólo me diste inspiración sino que me apoyaste en muchísimas cosas durante este proceso... Gracias por preferir pasar conmigo tantos fines de semana encerrados en el laboratorio en lugar de salir con tus amigos. Por tu apoyo, tus consejos y tu amor incondicional. ¡TE AMO!

Raquel

Gracias por tantos juegos y complicidades de infantiles, por estar conmigo los primeros años de mi vida y ser mi mejor amigo, por tu sonrisa de niño que siempre recordaré con ternura y alegría.

Mi hermano

Por su linda manera de ser, sus consejos, lecciones, el conocimiento que compartió conmigo, su apoyo y amistad, por dirigir mi tesis, por ser mi maestra pero sobre todo por ser mi amiga, siempre le estaré agradecido infinitamente.

Dra. Ma. Del Rosario Tarragó Castellanos

A todos mis profesores que con sus lecciones, consejos y comentarios ayudaron a construir este trabajo. Les agradezco de corazón a todos ustedes.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura.

Dra. Edith Arenas Ríos.

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Dr. Miguel Ángel León Galván

Maestra Ma. De los Ángeles Aguilar Santamaría.

Dra. Ana Elena Lemus Bravo.

Gracias por charlas, consejos, momentos divertidos, y a su amistad. Gracias por ser excelentes personas y ser mis amigos.

Alex, Iván y Marcos

ÍNDICE

1. ABSTRACT.....	14
2. RESUMEN.....	15
3. INTRODUCCIÓN.....	16
4. DESARROLLO DEL TESTÍCULO DE ROEDORES.....	18
4.1. Cordones seminíferos.....	20
4.2. Espacio intersticial.....	22
4.3. Cambios morfológicos del testículo durante el desarrollo.....	24
5. EL PAPEL DE LOS ESTRÓGENOS DURANTE EL DESARROLLO TESTICULAR.....	26
6. DISRUPTORES ENDOCRINOS ESTROGÉNICO.....	30
6.1. Isoflavonas.....	31
7. ANTECEDENTES.....	33
8. JUSTIFICACIÓN.....	34
9. HIPÓTESIS.....	35
10. OBJETIVO GENERAL.....	36
10.1. Objetivos particulares.....	36
11. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
11.1. Peso corporal, índice gonadosomático y volumen testicular.....	38
11.1.1. Índice gonadosomático (IGS).....	39
11.1.2. Volumen testicular.....	39
11.2. Porcentajes de área.....	40
11.3. Densidad y número total de células.....	41
11.3.1. Densidad celular en el espacio intersticial.....	41
11.3.2. Densidad celular en el cordón seminífero.....	42
11.3.3. Asociaciones de células de Sertoli – células germinales (CS- CG).....	43
11.3.4. Longitud y volumen total del cordón seminífero.....	43
11.4. Pruebas de fertilidad.....	44
11.4.1 Índice de gestación, número de crías por hembra preñada..	44

11.5. Análisis Estadístico.....	45
12. RESULTADOS.....	46
12.1. Efecto de la genisteína y el estradiol sobre peso corporal, índice gonadosomático y volumen testicular	46
12.2. Porcentaje de área ocupada por el cordón seminífero y el espacio intersticial.....	46
12.3. Efecto de la genisteína y el estradiol sobre la densidad celular.....	48
12.3.1 Densidad celular en el espacio intersticial.....	48
12.3.2 Diámetro, área y densidad celular en el cordón seminífero..	48
12.3.3 Asociaciones celulares en el cordón seminífero.....	50
12.4. Volumen y longitud del cordón seminífero.....	51
12.4.1. Volumen del cordón seminífero.....	51
12.4.2. Longitud del cordón seminífero.....	51
12.5 Efecto de la genisteína y el estradiol sobre la fertilidad masculina....	52
13. DISCUSIÓN.....	53
14. REFERENCIAS.....	65

1. ABSTRACT.

The administration of compounds with estrogenic activity during the neonatal period can modify the structure and function of testicular cell lines, regulating hormone production as well as spermatogenesis; these changes can have repercussions during adult life since they can modify testosterone and sperm production, thus reducing fertility.

Treatment with the phytoestrogen genistein (150µg) or with estradiol (1µg) during the first five days postpartum (dpp) in the rat had an effect on the amount of space occupied by the seminiferous cords, with an increase observed following the estradiol treatment, leading to a reduction of the interstitial space. Treatment with genistein increased cell density in the interstitial space as well as in the seminiferous cords.

The associations between the Sertoli cells and stem cells (SC/SCs) were modified when genistein was administered in comparison to the control group, since a higher percentage of clusters associated with tubules were observed, indicating that the stem cells are not surrounded by the Sertoli cells. In the animals treated with estradiol, values between the control group and the genistein group were observed, being significantly greater in the latter.

Treatment with estradiol significantly increased the volume and length of the seminiferous cords, which at least partly explains the increase in the space occupied by them, a much greater coiling of the cord was observed although the total volume of the testicle was unmodified.

Treatment with genistein and estradiol during the neonatal period produced alterations in the adult stage as fertility decreased. In animals treated with genistein, a decrease was observed in the gestation index as well as in the number of pups, while sexual behavior was completely blocked by treatment with estradiol.

In conclusion, the administration of estrogenic compounds in the neonatal period leads to changes in structure, cellular density and cellular associations in the testicle, which can lead to decreased fertility and even infertility in adult animals.

2. RESUMEN.

En la etapa neonatal, la administración de compuestos con actividad estrogénica puede modificar la estructura y función de las estirpes celulares presentes en el testículo, regulando tanto la producción de hormonas como la espermatogénesis; Estos cambios pueden tener repercusión en la vida adulta, ya que se puede reducir la producción de testosterona así como de espermatozoides y reducirse la fertilidad.

Los tratamientos a ratas durante los 5 primeros días post-nacimiento (dpn) con genisteína (150µg) o con estradiol (1µg) provocaron efectos sobre el área ocupada por cordones seminíferos en cortes transversales, incrementándose con el tratamiento con estradiol y, observándose la disminución en el área del espacio intersticial. El tratamiento con genisteína incrementó la densidad celular en el espacio intersticial como y los cordones seminíferos.

El cociente de las células de Sertoli y las células germinales (CS/CG) se modificó cuando se administró genisteína en comparación con el grupo testigo, ya que se observó mayor porcentaje de los túbulos con una asociación en racimo, lo cual indica que las células germinales no están rodeadas por las células de Sertoli. En los animales tratados con estradiol se observaron valores diferentes entre el grupo testigo y el grupo con genisteína siendo significativamente mayor en este último.

El tratamiento con estradiol incrementó significativamente el volumen y la longitud de los cordones seminíferos, lo cual explica, al menos parcialmente, el incremento del espacio ocupado por los cordones seminíferos, observándose mucho mayor enrollamiento del cordón, pero sin modificar el volumen total del testículo.

Los tratamientos con genisteína o estradiol en la etapa neonatal produjeron alteraciones en la etapa adulta al disminuir la fertilidad. En los animales tratados con genisteína disminuyó tanto en el índice de hembras a las cuales podían fertilizar (índice gestacional) como en el número de crías, mientras que el tratamiento con estradiol bloqueó totalmente la conducta sexual. En conclusión, la administración de compuestos con actividad estrogénica que están contenidos en alimentos que consumen los infantes en etapas neonatales pueden inducir cambios en la estructura, densidad celular y asociaciones celulares en el testículo, lo que en el animal adulto se puede traducir en disminución de la fertilidad e inclusive infertilidad. Si bien se requieren de más estudios para determinar el papel de la genisteína y el estradiol en la fertilidad masculina, es importante advertir sobre estos posibles efectos en las etapas críticas del desarrollo gonadal.

3. INTRODUCCIÓN.

El desarrollo neonatal es una etapa importante de la vida de los mamíferos, ya que durante ésta quedarán establecidas muchas de las características que determinarán la estructura y la actividad fisiología de diferentes órganos como los testículos, al llegar a la vida adulta (Habert, 2006). Durante esta etapa, el organismo es susceptible a la acción de diversas sustancias que pueden interferir con el desarrollo y funciones normales de los tejidos que responden a señales endocrinas. Estas sustancias son denominadas “disruptores endocrinos” y pueden interferir con la acción de las hormonas endógenas. Entre las sustancias que interfieren con la acción hormonal, están aquellas que pueden unirse a los receptores de estrógenos y que incluyen a los fitoestrógenos (Kuiper y col. 1998).

Los fitoestrógenos son compuestos de origen vegetal que tienen la capacidad de interferir con la acción normal de los estrógenos por su capacidad de interactuar con los Receptores de Estrógenos (RE), así como con diversas enzimas relacionadas con la esteroidogénesis (Ibrahim y Haz, 1990; Aldecreutz y col. 1993; Wang, 1993). Dentro de los fitoestrógenos se encuentra una isoflavona de la soya, la genisteína, cuyo estudio es de importancia para el ser humano debido a que existe un consumo importante de este compuesto al estar presente en diversos alimentos (Kozłowskay y Szostak-Węgierek, 2014; Hollman y Katan 1999). En infantes a los que se les sustituyó la leche de vaca por leche de soya presentan cantidades significativamente elevadas de genisteína en la sangre (Chen y Rogan, 2004). Un estudio realizado por

Lewis y col. (2003) indica que la administración de 40 mg/kg de genisteína (equivalente al consumo de niños a través de la leche de soya) por vía subcutánea a ratas durante los días 1 al 21 posnatal, no incrementó ni el peso corporal ni el peso de los testículos de las crías. Sin embargo, en el mismo estudio se mostró que la genisteína administrada en las mismas condiciones incrementa el peso uterino de ratas hembra a partir del día 21 de edad (Lewis y Col. 2003). Un estudio más reciente fue publicado en el 2014 en el que se examinó los efectos de la exposición a isoflavonas de las crías macho a partir de los días 2 al 21 después del nacimiento. Se observó que la dieta basada en granos de soya estimula la actividad proliferativa de las células de Leydig pero se suprime la capacidad esteroidogénica durante la vida adulta. Además la exposición a isoflavonas disminuyó la producción de la hormona anti Mülleriana en las células de Sertoli. En resumen, los datos anteriores muestran que el periodo neonatal es una ventana sensible a la exposición de isoflavonas y mantiene la visión de que tanto la genisteína como la daidzeína son responsables de efectos biológicos asociados a dietas con base en la soya (Napier y col., 2014).

Los estudios realizados acerca del efecto de disruptores endocrinos con actividad estrogénica sobre el desarrollo testicular están enfocados principalmente en el análisis de parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares, y muy pocos al estudio de parámetros morfométricos, los cuales son indicadores importantes del desarrollo testicular (Shibayanma y col. 2001).

Por tal motivo, el presente trabajo está enfocado en la determinación de los efectos de la administración neonatal de genisteína y estradiol a nivel morfométrico y las repercusiones sobre la fertilidad en la vida adulta.

4. DESARROLLO DEL TESTÍCULO EN ROEDORES.

Los testículos tienen dos funciones principales, la esteroidogénesis y la gametogénesis. En la región ocupada por el cordón seminífero se encuentran las CG que darán, en el animal púber y adulto, origen a los espermatozoides así como a nuevas espermatogonias que repoblarán el epitelio seminífero, éstas se encuentran íntimamente relacionadas con las CS que serán las encargadas de que la espermatogénesis se lleve a cabo correctamente y de aportar el fluido tubular en el que se transportarán los espermatozoides a los conductos seminíferos; por otro lado, en el espacio intersticial se encuentran las CL, la cuales llevan a cabo la biosíntesis de hormonas esteroides, principalmente testosterona necesaria para el desarrollo de la espermatogénesis y de la conducta sexual masculina (Fawcet, 1992).

Las etapas de desarrollo fetal y neonatal en machos se consideran críticas, ya que de éstas dependerá el correcto funcionamiento de los testículos al alcanzar la edad reproductiva. Por ejemplo, en el hombre adulto que presenta Síndrome de Disgenesia Testicular se observa una alta incidencia de oligospermia, criptorquidia, hipospadia y cáncer testicular (Skakkebaek y col. 2001). Este padecimiento se ha relacionado con anomalías en el desarrollo de los testículos y se sugiere que es causado por disruptores endocrinos provenientes del ambiente que inducen

alteraciones durante la embriogénesis y desarrollo gonadal durante la vida fetal (Skakkebaek y col. 2001).

El testículo de los ratones se forma aproximadamente a la mitad de la gestación, a partir de estructuras conocidas como crestas genitales, que se originan por la proliferación del epitelio celómico y la condensación del mesénquima. Las células germinales primordiales (CGP) se originan en el epiblasto, migran a través de la línea primitiva y se sitúan entre las células endodérmicas de la pared del saco vitelino cerca del alantoides. Posteriormente son transportadas por movimientos ameboides a través del mesenterio dorsal del intestino posterior hasta llegar a las crestas genitales (Sadler, 2010). Las CGP inducen el desarrollo de la gónada, ya sea en ovario o testículo, por lo tanto, se considera que éste es un primordio bipotencial, con capacidad de desarrollarse en una gónada masculina o femenina (Sinisi y col. 2003). En la gónada masculina se expresarán genes que se encuentran localizados en el cromosoma “Y”, cuyos productos provocan que las células del mesénquima y las CGP se diferencien en células de Sertoli (CS) y espermatogonias respectivamente (Piprek, 2010). Al mismo tiempo se lleva a cabo la formación del cordón seminífero y se forma la vasculatura específica de la gónada masculina (Combes y col. 2009).

La espermatogénesis se puede dividir en dos fases, la premeiótica y la posmeiótica. En la rata, la maduración testicular comienza antes del nacimiento y es alrededor del día 5 postnatal que los gonocitos se diferencian en espermatogonias, las cuales se convierten posteriormente en espermatoцитos primarios entre los días 10 y 19,

mientras que los primeros espermatozoides se encuentran cerca del día 45 de vida (Kula y col. 2001).

Los testículos están morfológicamente organizados en dos regiones: la región tubular, que para los testículos embrionarios y neonatales corresponde a los Cordones Seminíferos, y el espacio intersticial, que es la región que está por fuera del cordón seminífero (Fawcett, 1992).

4.1. Cordones seminíferos.

Los testículos de los ratones se comienzan a formar poco después de la mitad de la gestación a partir de un primordio bipotencial que expresa al gen SRY (por sus siglas en inglés “sex-determining región”, es el gen que codifica para la proteína SRY, responsable de la formación de los testículos). Este primordio también contiene células germinales que posteriormente se convertirán en espermatozoides. La expresión del gen SRY provoca una cascada de eventos que desencadenan en la formación del testículo, entre los cuales se encuentran la migración hacia la cresta genital, proliferación y posteriormente la diferenciación de células de Sertoli, lo cual permite que se incremente el tamaño de la gónada (Nel-Themaat y col., 2010). Poco después de que se han formado los cordones seminíferos y se incremente su longitud, las CS migran hacia la periferia de los cordones de forma individual, el núcleo se mantiene muy cercano a la lámina basal del cordón y las membranas se extienden hacia el centro del cordón donde posteriormente se formará el lumen. Posteriormente, se detiene la proliferación celular y comienza la migración hacia el

centro de la gónada lo cual provoca en ésta un acortamiento de su longitud y un ensanchamiento en la parte media. Finalmente, se reanuda la proliferación celular hasta el nacimiento del animal (Sadler, 2010). Se ha visto que el número de células germinales que presentan los Cordones Seminíferos en el día 13.5 de gestación determinará el número final de células que se desarrollarán en los túbulos seminíferos (Nel-Themaat y col.2011). Las CGP presentes en el cordón seminífero proliferan hasta el día 15.5 en ratón y 17.5 de gestación en la rata, posteriormente entran en un estado de quiescencia y se detiene la proliferación celular (Olaso y Habert, 2000). Los cambios morfológicos que se observan en el testículo son consecuencia del crecimiento del cordón seminífero debido a la proliferación celular y la reorganización de las CS (Schmahl y Capel, 2003).

Al nacimiento, las CS que se encuentran en la periferia del cordón seminífero presentan, en general, núcleos espaciados uniformemente y distribuidos hacia la periferia, con citoplasma y membranas asociadas con las células germinales (CG) en un patrón de roseta. En la rata, al tercer día posnatal se restablece la mitosis y las espermatogonias se diferencian en espermatogonias tipo A (Olaso y Habert, 2000). Éstas son las células que al llegar a la vida adulta se encargarán tanto de repoblar el epitelio seminífero como de dar origen a los espermatozoides. Durante el desarrollo, estas células se encuentran en estrecho contacto con las CS y forman una estructura no diferenciada que posteriormente se convertirá en el cordón seminífero. Las membranas de las CS se pliegan alrededor de las células germinales. Se ha observado que existen dos tipos de asociaciones celulares en el cordón seminífero,

en un tipo de asociación celular las CG se encuentran completamente rodeadas por el citoplasma de las CS, mientras que en el otro se puede observar que las CG se encuentran agrupadas, formando un racimo, de tal manera en las CS no pueden rodear en su totalidad este racimo (Nel-Themaat y col.2011). Aún no se ha determinado si existe algún tipo de relación entre uno u otro tipo de asociación celular en los cordones seminíferos con la capacidad reproductiva de estos machos en la vida adulta.

4.2. Espacio intersticial.

En el espacio intersticial del testículo de rata adulta, se desarrollan diferentes tipos celulares entre los que se encuentran las células peritubulares miodes de sostén, los vasos sanguíneos y las células de Leydig (CL) (Fawcett, 1992).

Las células peritubulares mioides son escamosas y se encuentran rodeando a las CS del cordón seminífero. No se conoce con certeza el origen de este tipo celular. Las células peritubulares mioides junto con las CS secretan fluidos que forman fibras de colágena, las cuales a su vez forman la membrana basal de los túbulos seminíferos, sin embargo, como se localizan en la parte externa de la membrana basal se considera que pertenecen al espacio intersticial (Fawcett, 1992).

El origen de las células de Leydig es incierto, actualmente se sabe que durante el desarrollo aparecen dos tipos diferentes de células de Leydig con orígenes distintos. Durante el desarrollo fetal, las células de Leydig fetales que tienen un papel muy importante en la virilización del feto, las cuales prevalecen hasta después del

nacimiento y las células de Leydig adultas que, son las que tendrán la función de secretar andrógenos a partir de la pubertad hasta la vida adulta (Griswold y Behringer 2014).

Probablemente las células progenitoras de las células de Leydig fetales migren a partir de las crestas neurales, mesonéfricas o de poblaciones de células epiteliales del mesonefros adyacente o posiblemente tengan un origen común con las células adrenocorticales que provienen del primordio adrenogonadal. Las primeras células de Leydig fetales que aparecen son muy similares a los fibroblastos presentes en el intersticio y sólo es posible distinguir un tipo celular de otro utilizando marcadores moleculares. Éstas se encuentran en el intersticio de los testículos y tienen muchas gotas lipídicas en el citoplasma. Estructuralmente tienen abundante retículo endoplasmático liso y forman cúmulos en el intersticio ya que están en estrecho contacto con otras células de Leydig fetales (Griswold y Behringer 2014).

Además, las células de Leydig adultas son muy similares morfológicamente a las células de Leydig fetales, sólo se pueden distinguir debido a que el tamaño de las gotas lipídicas de las adultas son más pequeñas que las fetales (Griswold y Behringer 2014). Hoy en día se sabe que el linaje de las CL adultas no tiene el mismo origen que el de las CL fetales y se sugiere que una población de células del intersticio, indiferenciadas al momento del nacimiento, son las que originaran a las CL adultas, por lo que es probable que las CL adultas comiencen a desarrollarse antes de que las CL fetales desaparezcan por completo durante la vida neonatal (O'Shaughnessy y col.2001; Barsoum y Yao, 2010; Chen y col. 2009). En el día 25

posnatal se observa un aumento de la producción de testosterona, razón por la cual se sospecha que es en este momento en que finaliza la diferenciación de las CL adultas (Chen y col.2009).

La vasculatura del testículo se forma a partir de células mesenquimales que migran hacia la región del cordón seminífero después de su desprendimiento del endotelio vascular de vasos formados anteriormente. Cada célula que migra va a originar pequeños vasos superficiales que ocuparán la longitud total la gónada justo debajo del epitelio celómico (Setchell, 1970).

4.3. Cambios morfológicos del testículo durante el desarrollo.

Se ha considerado que el periodo del nacimiento hasta la pubertad es una fase de reposo testicular, sin embargo está caracterizado por una intensa actividad. Comienza por el aumento del volumen testicular después del nacimiento debido al incremento de la longitud de los cordones seminíferos. Esto se debe a la proliferación de las células de Sertoli que muestran una gran variedad de cambios (secreción de estrógenos, aumento de receptores de FSH). Las células de Leydig también muestran una recrudescencia después del nacimiento debido a un incremento de la secreción de testosterona que aún permanece incierto. El crecimiento testicular se debe al aumento progresivo en el diámetro de los cordones seminíferos (Chemes HE, 2001).

La proliferación y la reorganización celular provocan cambios en la forma del testículo como disminución de la longitud total testicular, ensanchamiento en la parte

media del testículo o alargamiento del cordón seminífero. Sin embargo, existen otros parámetros importantes que pueden ser determinados mediante técnicas morfométricas y que evalúan el desarrollo normal de los órganos, incluyendo a los testículos. (Gaytan y col. 1986 a). En el caso específico del testículo encontramos que el diámetro tubular es un parámetro frecuentemente utilizado en estudios testiculares. Por ejemplo, una disminución del diámetro tubular se relaciona con alteraciones en la fertilidad (Lenox, 1981). Además del diámetro del cordón seminífero, otros parámetros como el volumen total testicular, la densidad volumétrica del cordón seminífero y la longitud total del cordón seminífero son indicadores del estado de desarrollo testicular en ratas (Gaytan y col. 1986 b).

En un estudio realizado por Gaytan y colaboradores (1986 b), cuyo objetivo era determinar los cambios morfológicos del testículo de rata de diferentes edades, observaron que la densidad volumétrica del cordón seminífero incrementaba 3% entre el día 5 de vida hasta el 360. Propusieron que un incremento del volumen de los túbulos seminíferos a partir del día 15 de edad se relaciona con eventos como la secreción de fluido tubular, aparición del lumen tubular e incremento del número de espermatoцитos primarios. Antes de los 15 días de edad encontraron un incremento en la longitud tubular.

Durante el periodo neonatal que abarca de los días 3 a 7 después del nacimiento, los túbulos seminíferos contienen gonocitos y células de Sertoli inmaduras pero activas mitóticamente. Existe una proliferación profunda de las espermatogonias y la proliferación continúa durante la infancia temprana que abarca de los 8 a los 14 días.

La máxima densidad de las espermatogonias se alcanza cuando forman rosetas de doble capa junto con las células de Sertoli en el periodo infantil tardío, en los días 15 a 20 después del nacimiento. Los espermatoцитos en el leptoteno y zigoteno aparecen en la parte central del lumen tubular en desarrollo. El periodo juvenil que abarca de los días 21 a 32 sucede un incremento dramático en el número y tamaño de los espermatoцитos en paquiteno con la formación de espermátidas redondas y la pérdida de la roseta infantil (Picut y col. 2014).

Se ha observado que la exposición durante la vida perinatal a algunas sustancias con actividad estrogénica como las isoflavonas induce actividad proliferativa en CL (Napier y col. 2014). Esta y otras evidencias indican que los estrógenos son de gran importancia en el desarrollo perinatal de los testículos.

Los testículos experimentan numerosos cambios desde el nacimiento hasta la pubertad y el potencial de desarrollo de la pubertad y la fertilidad en el adulto normal depende de que se lleven a cabo los cambios anteriormente mencionados (Chemes, 2001).

5. EL PAPEL DE LOS ESTRÓGENOS DURANTE EL DESARROLLO TESTICULAR.

Se ha observado que en varones con una mutación del gen que codifica para el receptor de estrógenos α (RE α) (Smith y col. 1994) o con deficiencia de la enzima aromatasa (Maffei y col, 2004) presentan alteraciones en la formación de los

testículos aún en presencia de altas concentraciones de testosterona y de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Estos sujetos tenían baja calidad espermática, debido a la disminución del número total de espermatozoides, baja motilidad espermática e incluso algunos podían presentar criptorquidia bilateral.

En estudios realizados en ratas transgénicas en las que se inactivaron los receptores de estrógenos ($RE\alpha$ y $RE\beta$) o la enzima aromatasa, los individuos mostraron alteraciones reproductivas. Los animales con el gen que codifica para el receptor de estrógenos α nulo ($RE\alpha KO$) resultaron estériles debido a fallas en la reabsorción de los fluidos epididimales. En los animales con el gen de la aromatasa inactivado ($ArKO$) presentaron alteraciones en la espermatogénesis (O'Donnell y col. 2001). La inactivación del gen de $RE\beta$ ($RE\beta KO$) indujo un incremento de gonocitos del 50% observado en los días 2 y 6 posnatales debido a un incremento de la proliferación y una disminución en la apoptosis de estas células, sin que esto afectara el número de CS o CL (Delbes y col. 2004 y 2005).

Estas evidencias experimentales sugieren que la falta de estrógenos o la ausencia de sus receptores afecta el desarrollo normal de los testículos; sin embargo, un ambiente estrogenizado también podría ser la causa de alteraciones en el desarrollo testicular. En varones a cuyas madres se les administró dietilestilbestrol (DES) durante la gestación presentaron una alta incidencia de criptorquidia y cáncer testicular, así como baja calidad espermática (Glaze, 1984; Strohsnitter y col. 2001); En cambio, Wilcox y colaboradores (1995) en un estudio similar no reportaron cambios; esta discrepancia en los resultados puede deberse a los diferentes

esquemas de administración utilizados. Los resultados anteriores sugieren que el DES administrado en altas dosis en el primer trimestre de gestación tiene efectos negativos en el desarrollo testicular, lo cual indicaría que éste es un periodo de sensibilidad testicular a los estrógenos. Se han reportado efectos similares cuando las madres son expuestas a ftalatos (sustancias con actividad de tipo estrogénica que se pueden encontrar en cosméticos, pinturas y PVC) los cuales tienen efectos negativos en el desarrollo del tracto reproductor masculino (Swan y col. 2005).

Estudios *in vitro* realizados con cultivos de órganos y tejidos primarios de rata han mostrado que compuestos con efectos estrogénicos, así como el 17- β -Estradiol, pueden alterar la formación del cordón seminífero durante las etapas tempranas del desarrollo testicular, al interferir en el desarrollo de las CGP, CS y CL (Cupp y Skinner, 2001).

Estos estudios demostraron que los estrógenos tienen un efecto negativo en el desarrollo testicular durante la gestación. Por tanto, en roedores, la etapa de sensibilidad de los testículos a los estrógenos comienza en etapas embrionarias y se extiende hasta después del nacimiento.

En la rata, la secreción de FSH en la hipófisis y andrógenos en el testículo, comienza antes de la aparición de las primeras células meióticas lo cual indica que tanto los andrógenos como la FSH son necesarios para el inicio de la espermatogénesis (Kula y col.1983). En estudios anteriores se había encontrado una relación entre la maduración sexual de la rata y el incremento gradual de la concentración de

prolactina (Negro-Vilar y col, 1973); estos datos nos sugieren que el mecanismo que activa la maduración del túbulo seminífero requiere de la acción de varias hormonas. Se ha detectado la presencia de 17β -estradiol (E_2) en la sangre de las ratas desde del día 1 de vida incrementándose hacia el día 10 post natal (Döhler y Wuttke, 1975). Por otro lado, se ha observado que las CL, CS y CG expresan los dos tipos de Receptores de Estrógenos desde el nacimiento hasta la vida adulta (Williams y col. 2001)

La administración continua de DES del día 2 al 12 posnatal provocó una disminución del 40% de CS al llegar a la pubertad, además afecta el crecimiento testicular al presentarse un decremento hasta del 60% de su peso y un incremento del número de células germinales apoptóticas (Sharpe y col. 1995).

En un estudio similar al anterior realizado por Atanassova y colaboradores (1999), se observó que la administración neonatal de diferentes dosis de DES (10, 1, o $0.1\mu\text{g}$) a partir del día 2 hasta el 12 de vida, provocó disminución del número de CS, CG y de la eficacia de la espermatogénesis en la vida adulta, lo que depende de la dosis de DES. Es probable que la disminución de la espermatogénesis se deba a alteraciones de la función de las CS además de generar cambios en el volumen testicular lo cual altera el recambio normal de los fluidos testiculares. Se ha observado que DES induce un decremento del número total de CS, así como un decremento en el número de células germinales que sufren apoptosis, esto genera un desequilibrio entre el número de CG, a las cuales deben dar soporte las CS afectando el mantenimiento de la espermatogénesis (Atanassova y col. 1999). Dhar y Setty

(1976) observaron que la administración de dipropionato de estradiol en el día 5 posnatal afecta el desarrollo testicular al inhibir la espermatogénesis en la fase de espermatozoides primarios e inducir atrofia de células de Leydig.

Gaytan y colaboradores (1986) observaron que la administración de 500 µg de Benzoato de E₂ en el primer día de vida provocó una disminución del volumen testicular total y de la densidad tubular volumétrica, la cual se observa desde el día 15 posnatal al 90, el diámetro tubular disminuyó a partir del día 22 hasta el 90, la longitud total tubular únicamente presentó una disminución en el día 15 de edad, ya que posteriormente no se observaron cambios, por lo que se sugiere que este efecto podría deberse a un hiperenrollamiento de los túbulos. Las CS se observan en estadios inmaduros, lo cual muy probablemente esté relacionado con una deficiencia de gonadotropinas y andrógenos durante el desarrollo posnatal.

6. DISRUPTORES ENDOCRINOS DE TIPO ESTROGÉNICO.

A pesar de que muchas sustancias presentan actividad estrogénica, cada una de ellas tiene particularidades que pueden provocar variaciones en cuanto a los efectos que causan en cada uno de los órganos blanco. Los disruptores endocrinos son compuestos químicos naturales o sintéticos que pueden interferir con la función del sistema endocrino (Henley y Korach, 2010). Entre los efectos que pueden tener los disruptores endocrinos están la alteración de la biosíntesis de hormonas, efecto sobre el metabolismo, la pérdida del control homeostático además de alterar el desarrollo normal y la reproducción (Diamanti-Kandarakis y col. 2009). Algunos

disruptores endocrinos influyen sobre la acción estrogénica por su capacidad de unirse a los REs *in vivo* e *in vitro* (Diamanti-Kandarakis y col. 2009).

Los estrógenos tienen un papel fundamental en el crecimiento, diferenciación y homeostasis de muchos tejidos y sistemas entre los que se encuentran los componentes del aparato reproductor tanto masculino como femenino, así como glándulas mamarias, huesos, cerebro e hígado (Katzenellenbogen, 1996).

Existen dos mecanismos principales de transcripción de genes mediada por los RE (Hall y McDonell, 2005). En el mecanismo clásico los RE se unen directamente con los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en la región promotora de los genes blanco. En el mecanismo no clásico los RE se unen a factores de transcripción como c-Jun y c-Fos los cuales se unen al ADN sin la interacción directa de los RE con sus ERE (Björnstrom y Sjöberg, 2005).

Los disruptores endocrinos pueden activar diferentes genes a través de los RE, sin embargo, el hecho de que cada disruptor endocrino pueda activar una u otra vía depende de su estructura molecular.

6.1. Isoflavonas.

Algunos productos de origen vegetal pueden tener actividad de tipo estrogénico por lo que se denominan fitoestrógenos. La daidzeína y genisteína son dos fitoestrógenos que se encuentran en el grano de soya y en las habas (1.3 mg/g cada una). Estos fitoestrógenos tienen la capacidad de activar los RE α y RE β , aunque se

ha reportado que tienen mayor afinidad que el E₂ por la unión al RE β (Hwang y col., 2006), la afinidad de las isoflavonas respecto al RE β es 30 veces mayor que al RE α (Tzagarkis-Foster y col. 2001). Dada esta diferente afinidad las acciones de las isoflavonas respecto a los diferentes RE, serán básicamente en aquellos tejidos y órganos donde los RE β se encuentren en concentraciones en las que tienen efectos.

Se han identificado más de 300 plantas que tienen compuestos con actividad estrogénica que son capaces de inducir estro en animales (Farnsworth y col. 1975). Estos compuestos tienen estructuras moleculares similares a las de los estrógenos de mamíferos y pueden inducir efectos tanto estrogénicos como antiestrogénicos.

La potencia estrogénica relativa de la genisteína depende del tipo de ensayo usado para medir la actividad hormonal, el modelo animal, la dosis, la vía de administración, así como la duración y el tiempo de exposición (Whitten y Patisaul, 2001).

La actividad biológica de la genisteína es relativamente baja comparada con los estrógenos naturales; sin embargo, la exposición a estos compuestos en la dieta puede provocar respuestas biológicas de tipo estrogénico en humanos y animales con consecuencias favorables o desfavorables (Adlercreutz, 1998; Setchell y Cassidy, 1999). La daidzeína y genisteína de la soya, administradas durante el desarrollo embrionario, pueden causar diferentes tipos de toxicidad de tipo estrogénico (Doerge y Scheehan, 2002).

Queda claro que durante el periodo posnatal, los testículos son sensibles a la acción de los estrógenos endógenos ya que la falta de éstos puede provocar diversas

alteraciones en el desarrollo testicular teniendo como consecuencia modificaciones reproductivas durante la vida adulta como esterilidad, aumento de proliferación celular entre otros. Ese periodo representa una ventana de sensibilidad a sustancias estrogénicas o disruptores endocrinos como la genisteína. Queda claro que la exposición a este fitoestrógeno podría modificar el desarrollo y la estructura de los testículos alterando la fertilidad en la vida adulta.

7. ANTECEDENTES.

Son pocos los estudios realizados para determinar el efecto de la genisteína sobre el desarrollo testicular y de estos sólo unos cuantos analizan parámetros morfométricos principalmente en ratas.

Se ha observado que la administración de 4 mg/kg diarios de genisteína del día 2 al 18 posnatal provocó disminución del peso corporal y del volumen testicular al hacer las mediciones a los días 18 y 25 posnatales (Atanassova y col. 2000). En concordancia con el estudio anterior, Nagao y colaboradores (2001) determinaron que la administración de 100 mg/kg de genisteína durante los días 1 al 5 posnatal provocó disminución del peso corporal de las ratas al llegar a la pubertad, aunque el tratamiento no modificó la edad de entrada a la pubertad ni el conteo espermático. Al comparar los efectos en ratas alimentadas con una dieta libre de fitoestrógenos respecto a las alimentadas con una dieta suplementada con 300 mg/kg de genisteína durante la gestación o la lactancia, no se encontraron cambios en el tiempo de separación del prepucio (indicador de la entrada a la pubertad de los machos),

tampoco se modificó el comportamiento reproductivo en el adulto, ni la cantidad de espermatozoides en el epidídimo o la concentración de testosterona en sangre al llegar a la pubertad (Wisniewski y col. 2005).

De manera contradictoria, existen estudios que aseguran que la genisteína administrada durante la vida perinatal puede tener efectos a largo plazo sobre la biosíntesis de hormonas esteroideas. En un estudio en el que se administró genisteína a través de la dieta de la madre en diferentes concentraciones (0, 5, 50, 500 o 1000 ppm) desde el día 12 de gestación hasta el día 21 posnatal se mostró que este fitoestrógeno puede modificar la actividad de las CL, y en una concentración de 1000 ppm provocó aumento de las concentraciones de testosterona en sangre a los 90 días de edad (Akingbemi y col. 2007).

Es posible que las discrepancias en los resultados de estos estudios se deban a que el tiempo y periodo de exposición de los animales, además de las concentraciones de genisteína a las que fueron expuestos fueron diferentes en cada uno.

8. JUSTIFICACIÓN.

A pesar de que existen diversos estudios que describen el efecto de compuestos con actividad de tipo estrogénica sobre diferentes parámetros moleculares, celulares, fisiológicos, conductuales y de fertilidad, actualmente no existen trabajos que determinen el efecto de la genisteína y el E₂ sobre la morfología testicular en etapas

tempranas de desarrollo y que correlacionen estos parámetros morfométricos con la fertilidad.

Si consideramos que un alto porcentaje de niños recién nacidos son alimentados con leche de soya cuando presentan intolerancia a la lactosa y que en estos niños se han detectado concentraciones séricas de isoflavonas de la soya similares a las encontradas en animales de experimentación en los cuales estas dosis inducen efectos estrogénicos (Setchell y col. 1997; Santell y col. 1997), se hace evidente la necesidad de llevar a cabo un estudio que determine el efecto de estos compuestos durante el periodo neonatal de desarrollo.

Los resultados del presente estudio permitirán tener una idea del efecto que tendría el consumo de productos que contengan genisteína, en concentraciones semejantes a las que ingeriría un recién nacido a través de la leche de soya durante etapas tempranas del desarrollo neonatal, sobre la morfología testicular y si estos cambios, a su vez, pueden alterar la reproducción durante la vida adulta.

9. HIPÓTESIS.

La genisteína administrada durante los cinco primeros días de edad modificará los parámetros morfométricos testiculares en etapa neonatal y la fertilidad en la etapa adulta, en comparación con el efecto ocasionado por el E₂.

10. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto de la administración neonatal de genisteína, en comparación con el E₂, sobre los parámetros morfométricos testiculares en etapa neonatal y la fertilidad durante la vida adulta.

10.1. Objetivos particulares.

1. Cuantificar el efecto de la administración neonatal de genisteína y E₂ sobre peso corporal, índice gonadosomático y volumen testicular en etapa neonatal.
2. Analizar el efecto de la administración neonatal de genisteína y E₂ en ratas neonatas sobre parámetros morfométricos del intersticio y del cordón seminífero.
3. Estudiar el efecto de la administración neonatal de genisteína y E₂ sobre la fertilidad al llegar a la vida adulta.

11. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se obtuvieron 15 hembras gestantes de la cepa Wistar del bioterio de la UAM-Iztapalapa de las cuales se obtuvieron los animales neonatos. Los animales se mantuvieron de acuerdo con los lineamientos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Bioterio de la UAM y el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud” de la Secretaria de Salud Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), dentro de un cuarto de bioterio con temperatura controlada entre los 18 y 26 °C, un fotoperiodo invertido de 12-h luz y 12-obscuridad (las luces se encendieron a las 8 am), se les dio agua y alimento libre de fitoestrógenos (HarlanTeklaD, Madison, Winsconsin, EUA) *ad libitum*.

El día en que parieron las ratas se consideró como día 0 y se contabilizó el número de crías, las camadas se formaron manteniendo igual número de animales por hembra y permanecieron con la madre hasta el destete. Los animales se dividieron en 3 grupos formados por 5 camadas distintas cada grupo. A todas las crías se les administró el tratamiento diariamente del día 1 al 5 posnatal dependiendo del grupo al que pertenecían. En esta etapa del desarrollo es imposible determinar el sexo de las crías a simple vista por lo que el sexado se hizo al día del sacrificio. Las dosis administradas fueron las siguientes:

- Grupo testigo (AO): 10 µl de aceite de oliva (AO).
- Genisteína: 150 µg de genisteína/10 µl del AO.
- E₂: 1 µg de E₂ / 10 µl de AO.

Todas las administraciones fueron por vía subcutánea. Las dosis de genisteína son proporcionales al consumo diario total de isoflavonas en niños de una semana de nacidos alimentados con leche de soya (Setchell y col. 1998).

11.1. Peso corporal, índice gonadosomático y volumen testicular

Al día 6 posnatal se realizó el sacrificio de las crías, utilizando una cámara de anestesia con éter, después se obtuvo el peso corporal y se disecaron ambos testículos, se pesaron y posteriormente se separó la gónada izquierda de la derecha. Todas las mediciones de peso fueron hechas con una balanza analítica. Es importante resaltar que para las mediciones se utilizó únicamente a la gónada derecha. Para calcular el volumen testicular se midieron los 3 diámetros testiculares utilizando un vernier: Cráneo-Caudal (D1), Dorso-Ventral (D2) y Medio-Lateral (D3) como se señala en la Figura 1.

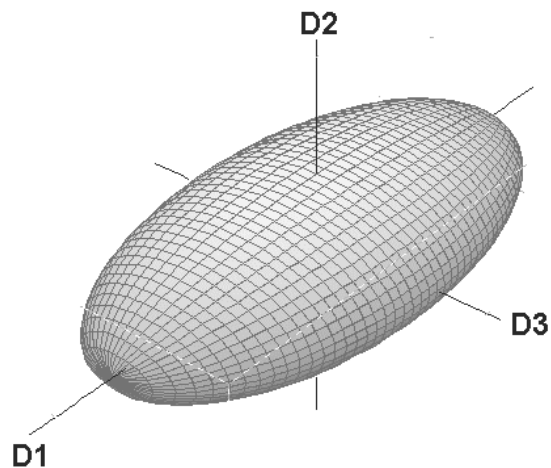


Figura 1. Esquema que representa los 3 ejes testiculares. Craneo-caudal (D1), Dorso-ventral (D2) y Medio-lateral (D3).

11.1.1. Volumen testicular.

Para obtener el volumen testicular primero se obtuvieron los semiejes testiculares (d1, d2 y d3) en donde d1, d2 y d3 es la mitad de D1, D2 y D3 respectivamente. Una vez obtenidos los semiejes testiculares se aplicó la siguiente fórmula que es la fórmula utilizada para obtener el volumen de un objeto ovoide (fórmula para el volumen de un elipsoide).

$$\text{Volumen Testicular} = \left(\frac{4}{3} \right) \times \pi \times d1 \times d2 \times d3$$

Las mediciones se hicieron en 9 animales por tratamiento, provenientes por lo menos de 3 camadas distintas por cada tratamiento. El Índice Gonadosomático

11.1.2. Índice gonadosomático (IGS).

(IGS) que representa la proporción de peso que representan las gónadas con respecto al peso total del cuerpo del animal (expresada en porcentaje), se calculó con base en la siguiente fórmula:

$$\text{IGS} = \left(\frac{\text{Peso Testicular}}{\text{Peso Corporal}} \right) \times 100$$

Las mediciones se hicieron en 9 animales por tratamiento, provenientes por lo menos de 3 camadas distintas por cada tratamiento.

11.2. Porcentajes de área.

Una vez medidos los testículos, se fijaron por inmersión en formalina neutra. A las 24 horas se realizaron lavados en alcohol para deshidratar a las gónadas (60°, 70°, 80°, 96° y 100°), posteriormente se realizó el procesamiento histológico de rutina y finalmente se incluyeron en paraplast. Una vez obtenidos los bloques se realizaron cortes transversales de 5 μm de espesor de la región media del testículo y posteriormente se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina (H-E).

Las mediciones se realizaron, en todos los casos utilizando el programa "ImageJ" (desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud de EUA, "National Institutes of Health"). Para medir el porcentaje de área ocupada por los Cordones Seminíferos (%ACS) así como el porcentaje de área ocupada por el espacio intersticial (%AEI), se utilizaron 5 cortes transversales por animal, los cuales fueron digitalizados a un aumento de 12.5X. Se determinó el área total del testículo y posteriormente el área ocupada por el cordón seminífero en cada corte, midiendo todos y cada uno de los cordones seminíferos presentes en una sección transversal. Una vez obtenidos ambos valores se le restó al área total el área ocupada por los Cordones Seminíferos, obteniéndose el área correspondiente al espacio intersticial (Figura 2). Con estos datos fue posible determinar el porcentaje que corresponde al área ocupada por el cordón seminífero y el porcentaje que corresponde al área ocupada por el espacio intersticial.

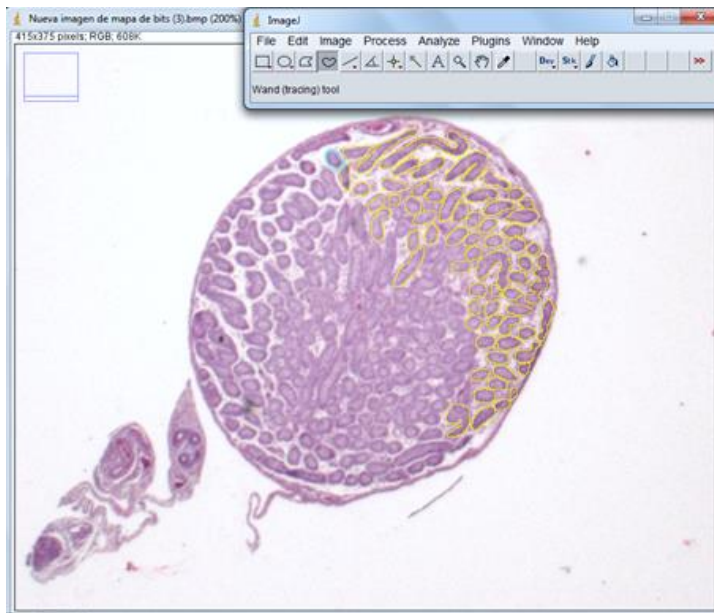


Figura 2. Imagen que representa el procedimiento de medición del área ocupada por los Cordones Seminíferos y el espacio intersticial (EI) con el programa "Image J". Se marca la región ocupada por los Cordones Seminíferos (cordón por cordón) y el programa indica el valor del área marcada (amarillo). Luego se marca el área ocupada por el corte de testículo completo. Con estos valores se obtiene el porcentaje de área ocupada por el EI y los Cordones Seminíferos.

11.3. Densidad y Número Total de Células.

11.3.1. Densidad celular en el espacio intersticial.

Se utilizaron 50 imágenes por testículo de cortes transversales teñidos con H-E digitalizados a un aumento de 400x. El análisis se llevó a cabo con el programa "ImageJ" para determinar el área ocupada por la imagen analizada en su totalidad y el área ocupada por el cordón seminífero. Con estas mediciones se obtuvo el área ocupada por el espacio intersticial al restar el total del área ocupada por el cordón seminífero del total del área ocupada por la imagen. Posteriormente se realizó el conteo de las células totales en el espacio intersticial, excluyendo a las células Peritubulares Mioides (Figura 3). Con estos datos se obtuvo el número de células encontradas por unidad de área.

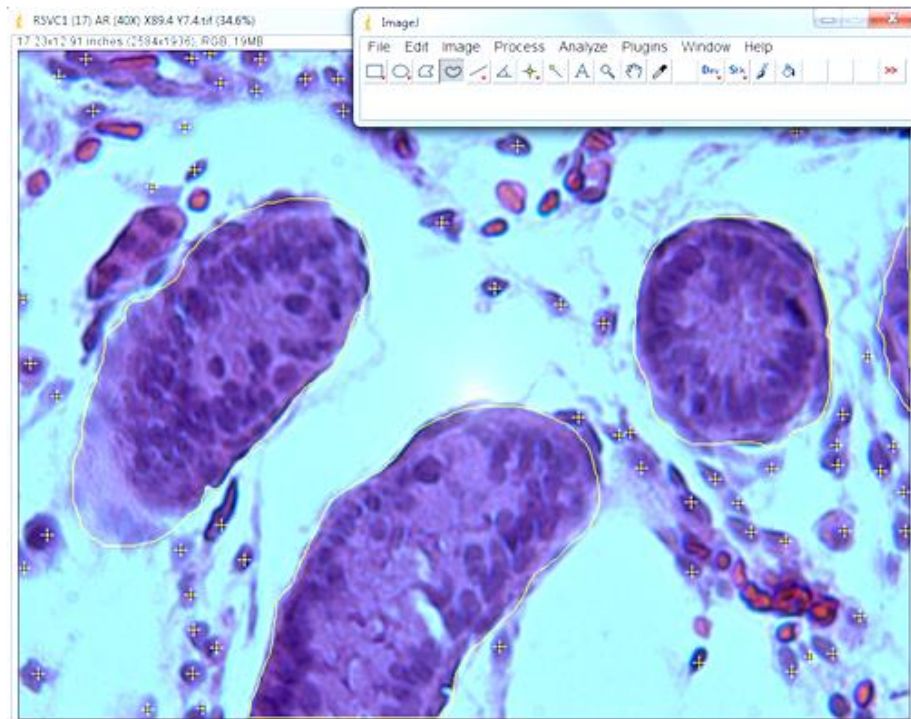


Figura 3. Imagen que representa el procedimiento seguido para determinar la densidad celular en el EI con el programa “ImageJ”. Se obtuvo el área que representa la imagen completa y luego se marcó la región ocupada por los cordones seminíferos, se restó el área ocupada por los Cordones Seminíferos y se obtuvo el área ocupada por el EI en la imagen. Se contó el número de células en el EI excluyendo a las células peritubulares mioides y a las células sanguíneas (cruces). Con estos datos se obtuvo la densidad celular en el EI.

11.3.2. Densidad celular en el cordón seminífero.

Se utilizaron 50 imágenes por testículo de cortes transversales teñidos con H-E con aumento de 1000x. El criterio de inclusión para considerar el cordón fue que presentara un factor de forma cercano a 1, lo cual indica que es muy cercano al círculo. Las imágenes del cordón seminífero con estas características fueron analizadas en el programa “ImageJ” y se determinó el diámetro, el área ocupada por el cordón seminífero y se contó el número total de células en cada cordón seminífero. La densidad de cada cordón seminífero se obtuvo dividiendo el número de células en el área ocupada entre el cordón seminífero.

11.3.3. Asociaciones de células de Sertoli – células germinales (CS-CG).

Se utilizaron 50 imágenes por testículo de cortes transversales teñidos con H-E con aumento de 1000x. Por cada imagen de cordón seminífero se contó el número de CS y el número de CG y se obtuvo el porcentaje que representaba cada tipo celular dentro de cada cordón seminífero.

Debido a que la distribución de las células dentro del cordón seminífero no es uniforme durante el desarrollo testicular, se pueden encontrar diferentes tipos de asociaciones celulares (Nel-Themaat y col. 2011), ya que en algunos cortes de cordón seminífero se pueden observar proporciones que van desde 100% de CS contra 0% de CG hasta 70% de CS y 30% de CG, los resultados se dividieron en rangos: el primero de 95 a 100% de CS, el segundo de 90 a 94.99% de CS, el tercero de 85 a 89.99% de CS y el cuarto <85%.

11.3.4. Longitud y volumen total del cordón seminífero.

Para obtener el volumen total y la longitud total del cordón seminífero se calcularon por medio de las siguientes fórmulas:

Volumen total del cordón seminífero (Gaytan F. y col, 1986a):

$$\text{Volumen Total Cordón Seminífero} = \left(\frac{\%ACSX \text{ Volumen Testicular}}{100} \right)$$

%ACS= Porcentaje del área ocupada por los cordones seminíferos

Longitud total del cordón seminífero (Gaytan y col, 1986a):

$$\text{Longitud Total Cordón Seminífero} = \left(\frac{\text{Volumen Total Cordón Seminífero}}{\pi \times r^2} \right)$$

El radio fue determinado a partir de la medición de el diámetro de los túbulos seminíferos. Se sabe que el radio es la mitad del diámetro.

11.4. Pruebas de fertilidad.

Para realizar las pruebas de fertilidad se utilizaron machos tratados neonatalmente, en la etapa adulta se colocó cada uno de ellos con tres hembras vírgenes (de 200 a 250 g) en una caja, para formar una unidad reproductora, formando un total de 5 unidades por tratamiento. Cada unidad reproductora permaneció durante 15 días permitiendo de este modo que las hembras presentaran en promedio 3 ciclos estrales.

11.4.1. Índice de gestación y número de crías por hembra preñada.

Al término de este tiempo se retiraron los machos y se verificó el estado de gravidez de cada una de las hembras. Con estos datos se calculó el número de hembras gestantes, a lo que se llamó índice de gestación (IG).

Al término de la gestación se contó el número de crías por hembra y el número total de crías por macho.

11.5. Análisis estadístico.

Para la comparación de los grupos de datos se realizó un análisis de varianza para cada uno de los parámetros medidos con α de 0.05 en caso de encontrar diferencias significativas entre los grupos se realizaron las siguientes pruebas: Prueba LSD (Least significant difference) de Fisher con α de 0.05 para los parámetros de %ACS y espacio intersticial; la prueba de comparaciones múltiples Newman-Keuls para los parámetros de densidad celular en el espacio intersticial, volumen total del cordón seminífero y número de crías.

12. RESULTADOS.

12.1. Efecto de la genisteína y el estradiol sobre el peso corporal total, índice gonadosomático y el volumen testicular.

Los animales tratados neonatalmente con AO presentaron peso corporal similar a los animales tratados con E₂, el tratamiento con genisteína provocó un aumento significativo ($p < 0.05$) del peso corporal en relación a los animales tratados con E₂ pero fue similar al peso corporal del grupo testigo. En el índice gonadosomático, así como en el volumen testicular, no se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos (Tabla 1).

Tratamiento	Peso corporal (g)	IGS (%)	Volumen testicular (mm³)
AO	11.93 +/- 1.12 ^{a, b}	0.298 +/- 0.026	12.20 +/- 2.52
Genisteína	13.02 +/- 1.19 ^a	0.312 +/- 0.059	14.64 +/- 3.36
E₂	11.11 +/- 1.73 ^b	0.433 +/- 0.191	10.68 +/- 2.08

Tabla 1. Efecto de la genisteína y el E₂ sobre el peso corporal, índice gonadosomático y volumen testicular. n=9. Promedio +/- Desviación estándar. Letras diferentes, diferencia significativa entre los tratamientos, ANOVA y prueba *post hoc* Newman-Keuls ($p < 0.05$).

12.2. Porcentaje de área ocupada por el cordón seminífero y el espacio intersticial.

En relación al área ocupada por el cordón seminífero se observó que el grupo testigo y el grupo tratado con genisteína presentaron valores similares, en el caso del grupo tratado con E₂ se observó un incremento significativo ($p < 0.01$) con relación al grupo tratado con genisteína y AO, siendo de 36.42% y 37.56% respectivamente. Como

consecuencia del incremento en el área del cordón seminífero se observó disminución en el porcentaje de espacio intersticial, el cual es significativamente menor ($p < 0.01$) en el grupo tratado con E_2 . (Tabla 2.). El grupo tratado con E_2 fue el que presentó mayor cambio en el área ocupada por el cordón seminífero y el espacio intersticial con relación a los otros dos tratamientos.

En los animales tratados con genisteína y AO los porcentajes del espacio ocupado por el cordón seminífero, así como por el espacio intersticial, son similares y aproximadamente del 50% (Tabla 2; Figura 4)

Tratamiento	% de área ocupada por los cordones seminíferos	% de área ocupada por el EI
AO	42.22 +/- 2.87	57.52 +/- 2.87
Genisteína	41.08 +/- 0.8	58.91 +/- 3.14
E_2	78.64 +/- 7.11*	21.35 +/- 7.11*

Tabla 2. Efecto de genisteína y E_2 sobre el porcentaje de área ocupada por los cordones seminíferos y de EI por corte. n=5 Promedio +/- Desviación estándar. * Diferencias significativas del E_2 en comparación con AO y genisteína, LSD de Fisher ($P < 0.01$).

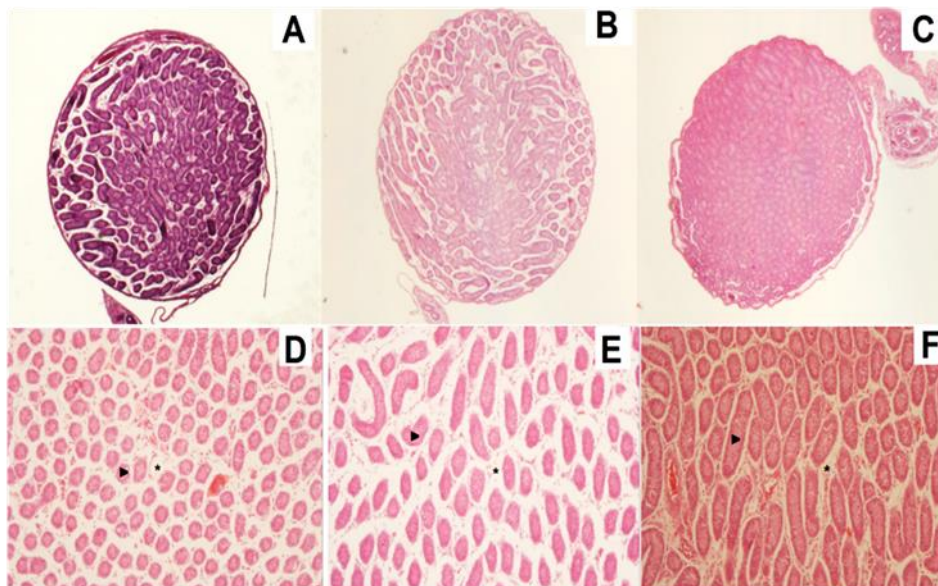


Figura 4. Cortes de testículo teñidos con H-E, animales tratados con AO (A y D), genisteína (B y E) y E_2 (Panel C y F), aumentos de 12.5X (A-C). Aumento de 100X, (D-F). El asterisco señala la región del EI y la cabeza de flecha señala un Cordón seminífero.

12.3. Efecto de genisteína y estradiol sobre la Densidad Celular.

12.3.1. Densidad celular en el espacio intersticial.

Los tratamientos con genisteína y E₂ incrementaron significativamente ($p < 0.01$) la densidad celular en relación con el grupo AO (Tabla 3; Figura 5).

Tratamiento	Células por mm ²
AO	5.00 +/- 1.36 ^a
Genisteína	7.81 +/- 1.96 ^b
E ₂	8.91 +/- 2.43 ^b

Tabla 3. Efecto de la genisteína y el E₂ sobre la densidad celular en el EI. n=250. Promedio +/- Desviación estándar. *, diferencia significativa comparada con los tratamientos, ANOVA y prueba *post hoc* Newman-Keuls ($p < 0.01$).

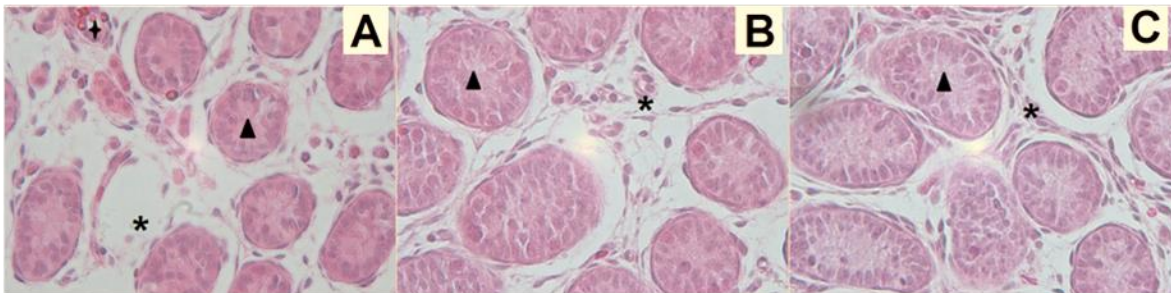


Figura 5. Cortes de testículo teñidos con H-E de animales tratados con AO (A), genisteína (B) y E₂ (C). Aumento 400x. Se observa un aumento de la densidad celular en el espacio intersticial de los animales que fueron tratados con genisteína y E₂ con respecto a los que fueron tratados con AO. La cabeza de flecha señala la región de los Cordones Seminíferos, el asterisco señala la región del espacio Intersticial y la cruz (A) señala un vaso sanguíneo.

12.3.2. Diámetro, área y densidad celular en el cordón seminífero.

Los tratamientos con genisteína y E₂ indujeron un incremento significativo ($p < 0.05$) tanto en el diámetro como en el área del cordón seminífero en relación al grupo testigo (AO); los valores observados en el grupo tratado con genisteína fueron similares a los observados en el grupo tratado con E₂ (Tabla 4).

Tratamiento	Diámetro de los Cordones Seminíferos (μm)	Área de los Cordones Seminíferos (mm^2)
AO	50.96 +/- 6.20 ^a	2.35 +/- 0.47 ^a
Genisteína	56.87 +/- 4.25 ^b	2.57 +/- 0.49 ^b
E ₂	58.21 +/- 8.51 ^b	2.71 +/- 0.72 ^b

Tabla 4. Efecto de la genisteína y el E₂ sobre el diámetro y área de los cordones seminíferos. n=250. Promedio +/- Desviación estándar. Letras diferentes, diferencia significativa entre los tratamientos, ANOVA y prueba *post hoc* Newman-Keuls ($p < 0.05$).

La densidad celular dentro del cordón seminífero fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo tratado con Genisteína con relación a los otros dos tratamientos (Tabla 5; Figura 6).

Tratamiento	No. De Células por milímetro cuadrado
AO	7.67 +/- 2.06
Genisteína	9.64 +/- 1.24*
E ₂	7.65 +/- 0.75

Tabla 5. Efecto de la genisteína y el E₂ sobre la densidad celular en el cordón seminífero. n=250. Promedio +/- Desviación estándar. *diferencia significativa entre los tratamientos, ANOVA y prueba *post hoc* Newman-Keuls ($p < 0.05$).

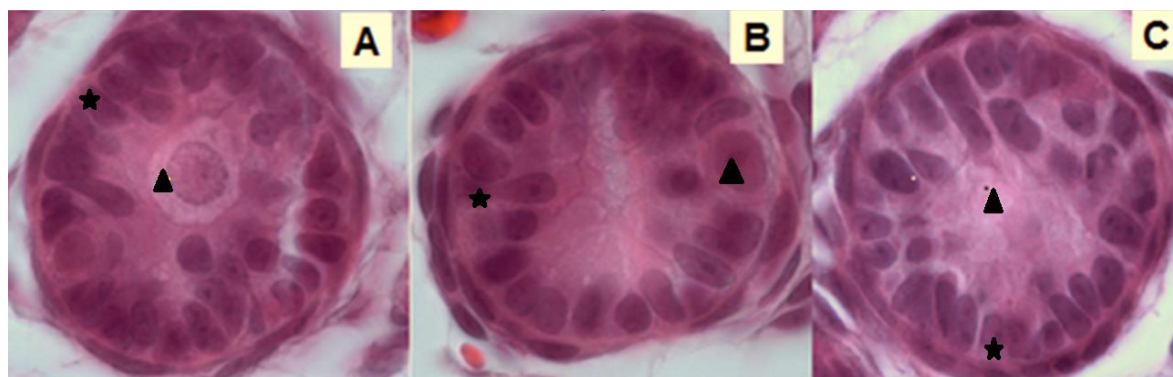


Figura 6. Paneles A, B y C en los que se muestran cortes de testículo de rata tratados con AO (Panel A), genisteína (Panel B) y E₂ (Panel C), teñidos con H-E. Amplificación 1000x. Se observa que la densidad celular, diámetro y área es igual en las 3 imágenes pero la proporción CS:CG es menor en los testículos de los animales tratados con genisteína. Cabeza de flecha (CS) Asterisco (CG).

12.3.3. Asociaciones celulares en el cordón seminífero.

Las asociaciones en el cordón seminífero pueden ser de dos tipos: 1) roseta, cuando una CG es rodeada de muchas CS o 2) de tipo racimo, cuando muchas CG están rodeadas por CS (Nel-Themaat, y col. 2011), por lo que al determinar la proporción entre estos dos tipos celulares se puede determinar el tipo de asociación analizando los porcentajes en los cuales se encuentran.

Con base en lo anterior se determinó que las asociaciones en roseta corresponderían a aquellos cordones que presentan un porcentaje mayor o igual al 90% de CS y las asociaciones en racimo aquellas que presentan un valor menor al 90% de CS por cordón analizado. Esto se hizo de esta manera debido a que las limitaciones metodológicas impiden determinar en tres dimensiones si las células de Sertoli están rodeando a las células germinales, por lo tanto se asume que al aumentar la proporción de CS por CG aumenta la probabilidad de encontrar asociaciones celulares de tipo roseta. Nuestros resultados muestran que el grupo tratado con Genisteína presenta un mayor porcentaje de cordones con una asociación de tipo racimo a diferencia del AO y E₂, siendo menor este porcentaje en el grupo testigo (Tabla 6, Figura 6).

Tratamiento	AO (%)	Genisteína (%)	E ₂ (%)
Racimo	54.8% ^a	83.6% ^b	68.8% ^{a, b}
Roseta	45.2% ^a	16.4% ^b	31.2% ^{a, b}

Tabla 6. Efecto de la genisteína y el E₂ sobre las asociaciones celulares. n=250. Letras diferentes significan diferencias entre los grupos. Porcentaje de Cordones seminíferos encontrados pertenecientes a cada uno de los rangos establecidos. Prueba de Chi cuadrada ($p < 0.01$).

12.4. Volumen y longitud del cordón seminífero.

12.4.1. Volumen del cordón seminífero.

Al analizar el volumen total del cordón seminífero se encontró un aumento significativo en los animales tratados con E₂ con respecto a los tratados con AO y genisteína (Figura 6).

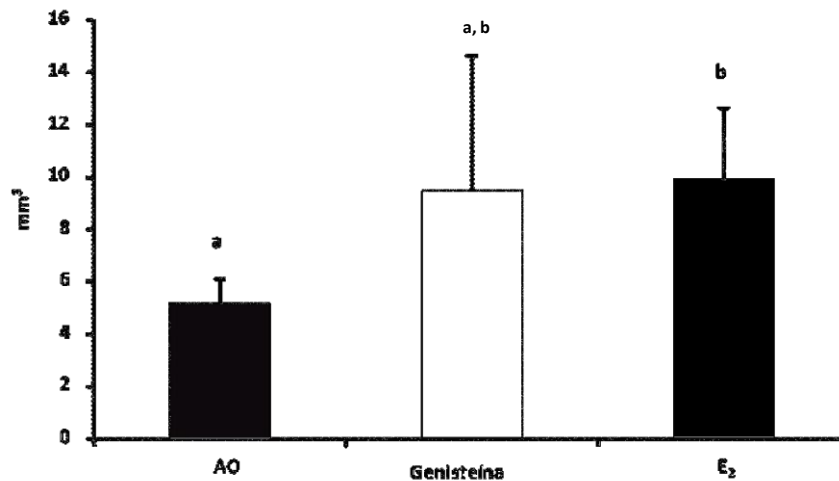


Figura 6. Volumen total del cordón seminífero. Se observa un incremento del volumen total del cordón en los animales tratados con estradiol en relación al grupo AO. n=9. Promedio +/- Desviación estándar. Letras diferentes, diferencias significativas con prueba de comparaciones múltiples Newman-Keuls (P<0.05).

12.4.2. Longitud del cordón seminífero.

La longitud total del cordón seminífero es un indicador de la cantidad de tejido precursor del tejido encargado de llevar a cabo la espermatogénesis al alcanzar la madurez, los tratamientos con Genisteína y E₂ causaron un incremento significativo ($p<0.05$) al compararlos con el grupo con AO (Tabla 8).

Tratamiento	Longitud Total del Cordón seminífero (milímetros)
AO	1063.68 +/- 159.23 ^a
Genisteína	2432.39 +/- 1381.95 ^{a,b}
E ₂	2637.03 +/- 846.45 ^b

Tabla 8. Efecto de la genisteína y el E₂ sobre la Longitud Total del cordón seminífero. Letras diferentes, diferencia significativa entre los tratamientos, n=9. ANOVA y prueba post hoc Newman-Keuls (p<0.05).

12.5. Efecto de la genisteína y el estradiol sobre la fertilidad masculina.

Los machos tratados con AO dejaron preñadas a todas las hembras con las que copularon, por lo tanto su índice de gestación es del 100%, mientras que en los machos tratados neonatalmente con genisteína, el índice gestacional fue de 81% y en el caso de los machos tratados con E₂ fue de cero (Tabla 9). Al comparar el número de crías por hembra gestante en cada tratamiento se observó que los animales del grupo testigo tuvieron, en promedio, 10.14 crías por hembra preñada mientras que los animales tratados con genisteína presentaron 4.66 crías, en promedio.

Tratamiento	IG	No. De Crías
AO	100.00 % (15/15) ^a	10.14 +/- 1.95 ^a
Genisteína	81.25 % (12/15) ^b	4.66 +/- 3.72 ^b
E ₂	0% (0/15) ^c	0 ^c

Tabla 9. Efecto de la genisteína y el E₂ sobre el Índice de Gestación y Número de Crías por Hembra Preñada. n=5 Promedio +/- Desviación estándar. ANOVA y post hoc Newman-Keuls (p<0.05). Letras diferentes significan diferencias entre los tratamientos. En el caso del E₂ ningún macho pudo dejar gestante a ninguna hembra por lo que tanto el IG como el No. de crías es de cero.

13. DISCUSIÓN.

La edad neonatal es una etapa crítica en la que compuestos ajenos al organismo pueden ejercer su acción sobre la gónada en proceso de diferenciación, alterando su estructura y función en el individuo adulto. El presente estudio se realizó administrando genisteína o E₂ en etapa neonatal y efectuando las observaciones en esta misma etapa, con la finalidad de analizar los cambios perceptibles en los primeros días de vida y su efecto en la respuesta reproductiva en el adulto, lo cual se analizó en la segunda etapa del trabajo.

Existen diversos estudios que plantean un efecto directo de los estrógenos en el desarrollo de la esteroidogénesis y la gametogénesis en ventanas de sensibilidad cronológica, como los periodos fetal y neonatal, en los que el testículo es muy sensible a la acción de estrógenos ya que la estimulación o inactivación del RE α genera cambios en la producción de testosterona y los cambios en el RE β modifican la línea germinal testicular (Habert y col. 2006).

La exposición durante la vida fetal y neonatal a altas concentraciones de E₂ o moléculas con actividad estrogénica induce diversas alteraciones en el tracto reproductor masculino, incluyendo el testículo (Sharpe y col. 2003), como por ejemplo: disminución del peso testicular (Sharpe y col. 1998; Goyal y col. 2003); el incremento de la apoptosis de células germinales (Atanassova y col. 1999) y, en consecuencia, disminución en la capacidad para fertilizar (Fielden y col. 2002).

En el presente estudio observamos que la genisteína indujo un incremento del peso corporal en comparación con los machos tratados con E₂ o con el vehículo. En estudios anteriores, se ha reportado incremento o disminución del peso corporal inducido por la administración de genisteína, estos cambios se relacionan con las dosis, debido a que la administración de 4 mg/kg (Atanasova y col. 2000) o 100 mg/kg (Nagao y col. 2001) en la etapa neonatal tuvieron efectos contrarios en la ganancia de peso corporal, ya que la concentración mayor indujo un incremento, mientras que la menor provocó decremento. Un estudio más reciente demostró que la administración de genisteína a ratas neonatas en concentraciones similares a las que los bebés consumen en su dieta diaria a través de la ingesta de leche de soya, puede provocar obesidad debido a un incremento en el tejido adiposo, lo cual se observó únicamente en ratas hembra y no en los machos (Rita y col., 2014). Nuestros resultados son congruentes con los resultados de los experimentos llevados a cabo con dosis a bajas concentraciones que asemejan el consumo de genisteína en infantes alimentados con leche de soya. Es muy probable que dosis bajas de genisteína provoquen un aumento de peso corporal, presentándose el efecto contrario con la exposición a dosis altas. Además existen diversos estudios que demuestran que los estrógenos tienen la capacidad de activar rutas catabólicas teniendo como consecuencia una disminución del peso corporal (Yanase y col. 2015), lo cual concuerda con nuestros resultados ya que observamos que la administración de E₂ provoca una disminución del peso corporal en los neonatos. Estos resultados nos permiten sugerir que la genisteína en estas concentraciones tiene efectos antiestrogénicos para el parámetro de peso corporal.

Observamos aumento del peso corporal con el tratamiento de genisteína, sin que esto causara cambios significativos en el IGS, lo cual indica que el peso testicular aumenta en proporción al aumento del peso corporal. Por otro lado, el volumen testicular se mantuvo sin cambios significativos, lo cual indica que existe un aumento del peso testicular lo cual implica que las gónadas sean más densas.

Atanassova y colaboradores (2000) también evaluaron el efecto de la genisteína (4mg/kg, 1-18dpn) sobre el volumen testicular que se alcanza al llegar a la pubertad, sus resultados muestran disminución del volumen testicular relacionado con la administración de genisteína; a pesar de que nuestros resultados en relación al incremento del peso corporal son semejantes, en nuestro caso hubo un incremento en el volumen testicular aunque no fue estadísticamente significativo. Con el esquema de administración utilizado en el presente trabajo no se observaron cambios en el volumen testicular o en el índice gonadosomático, con relación al grupo testigo, es muy probable que se requieran esquemas de administración más prolongados para que se observe un cambio en estos parámetros.

El análisis de las regiones correspondientes a los cordones seminíferos o espacio intersticial son de gran relevancia fisiológica, ya que en estos se encuentran las células responsables del mantenimiento de la espermatogénesis o de la producción de andrógenos respectivamente. Dada la relevancia que ambos compartimientos testiculares tienen es importante analizar los cambios inducidos por los tratamientos administrados.

En los cortes de los testículos de animales tratados con E_2 observamos un incremento en el porcentaje del área ocupada por los cordones seminíferos y, como consecuencia, disminución en espacio intersticial. Los valores tanto en el porcentaje de espacio ocupado por el cordón seminífero como en el intersticial fue similar en el tratamiento de Genisteína con relación al testigo.

Como se comentó anteriormente, el volumen testicular no presentó cambios con el tratamiento con E_2 , aunque sí en la cantidad de espacio ocupado por los Cordones Seminíferos y el espacio intersticial, los cuales al incrementarse el primero y disminuir el segundo se compensan, por lo que no se modifica el volumen total del testículo.

La densidad celular en el espacio intersticial fue mayor en los tratamientos con genisteína y E_2 . Al analizar estos resultados debemos ser cuidadosos y tomar en cuenta los cambios observados en cuanto al espacio intersticial. Consideremos que el tratamiento con genisteína no provocó que hubiera cambios en el porcentaje que ocupa el espacio intersticial, en este caso podemos decir que el aumento de la densidad celular en esta región se debe a un aumento del número de células intersticiales. Sin embargo en el caso del grupo de animales tratados con E_2 sí se observó una disminución del espacio intersticial por lo que el incremento en la densidad celular no necesariamente significaría un incremento en el número de células del intersticio sino que más bien podría deberse a la aglomeración de células en esta región dando la impresión de una mayor densidad.

Dado que en el espacio intersticial se encuentran las CL es probable que el tratamiento con genisteína genere un incremento en esta población celular, lo cual a su vez incrementaría los niveles circulantes de testosterona que en esta etapa actuarían en los procesos de diferenciación cerebral, la maduración testicular y por lo tanto en la fertilidad en el adulto; en el caso del grupo tratado con estradiol si el incremento observado en la densidad de células en el EI es real, ocurriría lo mismo que con el tratamiento con genisteína. Por otro lado, si sólo se debiera a que en menor espacio hay igual o menor número células que en el grupo AO, entonces los procesos de diferenciación que requieren de testosterona se verían modificados.

En el caso particular del efecto de los esteroides sobre los procesos de diferenciación cerebral debemos tomar en cuenta que la testosterona es metabolizada en estrógenos debido a la acción de la enzima aromatasa que se expresa en el cerebro. Desde el día del nacimiento los testículos de los machos producen testosterona la cual se aromatiza en el cerebro y se convierte en E₂ (Naftolin y col., 1975) que es fundamental para la masculinización cerebral (Bakker y col., 2006). Se ha visto que en ausencia de estas hormonas existe un déficit de los comportamientos de apareamiento y lucha, conductas que son consecuencia de la diferenciación cerebral durante el desarrollo neonatal (Ogawa y col., 2000). Un incremento en el número de células de Leydig podría significar aumento en la secreción de esteroides como la testosterona y por lo tanto en la aromatización de dicha hormona para su transformación en estradiol. Sin embargo, es necesario que la maquinaria enzimática encargada de la biosíntesis de testosterona no se vea

afectada por los tratamientos. Para corroborar lo anterior sería necesario realizar un estudio que determine si existe un aumento de la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en el suero de la sangre ya que algunos estudios han demostrado que la genisteína en particular tiene la capacidad de inhibir la biosíntesis de progesterona (precursora del resto de hormonas esteroides) debido a una reducción de la expresión de la P450scc y 3 β -HSD (Piasecka-Srader y col. 2014).

En relación a los Cordones Seminíferos observamos un efecto de tipo estrogénico de la genisteína ya que presenta una respuesta similar al tratamiento con E₂ al incrementarse el diámetro y área de estos en comparación con el grupo testigo. Sin embargo, la densidad celular sólo fue modificada con el tratamiento con genisteína, la cual fue mayor a la encontrada en los otros tratamientos. El diámetro de los cordones seminíferos es un parámetro que sirve de indicador de la madurez testicular (Avelar y col. 2010), con lo cual puede suponerse que el tratamiento con E₂ induce un adelanto de la maduración de los cordones mayor que el inducido por la genisteína y ésta a su vez induce una mayor madurez que el tratamiento con AO.

Habert y colaboradores (2006) demostraron que los estrógenos endógenos regulan fisiológicamente el desarrollo del testículo durante la vida fetal y neonatal, controlando la gametogénesis y la esteroidogénesis. Por otro lado, Lassarguere y colaboradores (2003) demostraron un efecto negativo de la administración de estrógenos en el desarrollo de tipos celulares del testículo al inhibir el desarrollo de gonocitos, CS y CL. En otro estudio se demostró que el E₂ (12.5 μ g) y la testosterona (2.5 mg) administrados durante los primeros 5 días de vida provocaron una reducción

en el número de células de Sertoli y germinales debido a un aumento en la apoptosis, además de la inhibición de la formación del lumen y del crecimiento testicular (Walczak-Jedrzejska y col. 2013). En el presente estudio encontramos que el tratamiento con genisteína induce un marcado incremento en la densidad celular tanto en el EI como en los Cordones Seminíferos, por lo que se concluye que en la dosis administrada no se indujo un efecto de tipo estrogénico.

Sabemos que la genisteína no inhibe la actividad de la aromatasa (Piasecka-Srader y col. 2014), sin embargo afecta la biosíntesis de testosterona gracias a la inhibición de la producción de pregnenolona y progesterona (Tiemann y col. 2007) debido a la inhibición de la expresión de las enzimas P450scc y 3 β -HSD (Piasecka-Srader y col. 2014). Debido a lo anterior es posible suponer que la genisteína afecta la producción de las hormonas esteroideas encargadas de la regulación de la apoptosis y proliferación celular en el testículo debido a que inhibe la biosíntesis de sus precursores precursor (progesterona) y por lo tanto la densidad celular en el testículo aumenta con estas concentraciones de genisteína; es probable que por sí misma no sea capaz de estimular la apoptosis e inhibir la proliferación celular. Sería interesante determinar si con el tratamiento de genisteína se inhibe la apoptosis celular en el testículo en desarrollo mediante métodos de detección de apoptosis como la activación de caspasas o daño al DNA (Alfaro y col, 2000). De la mano con el ensayo anterior sería interesante conocer si se ve afectada la proliferación celular mediante una inmunohistoquímica específica contra alguna DNA polimerasa implicada en el proceso de replicación celular expresada durante la proliferación celular (Carbajo-

Pérez y col. 1994). Además, para probar que lo anterior se debe a la inhibición de la expresión de la enzima P450scc en este tejido debido a la acción de la genisteína sería necesario realizar una inmunohistoquímica para cuantificar a dicha enzima.

El aumento en el espacio ocupado por los Cordones Seminíferos se puede explicar por el incremento en la longitud total del cordón inducido en los tratamientos con E₂ y genisteína, lo cual pudo generar un hiper curvamiento de éste ya que el volumen total del testículo no se vio modificado. Por otro lado, el volumen total del cordón también se modificó por el tratamiento con E₂; en el caso de la genisteína no fue significativa la diferencia en el volumen total del cordón en relación al grupo testigo, debido a que se tiene una dispersión de datos muy alta, sin embargo, si se observa en la mayoría de los animales un efecto de tipo estrogénico.

Es importante analizar no sólo los cambios morfológicos en el cordón y la densidad celular en éste, sino también qué tipo de células se modifican por el tratamiento. Recientemente se ha propuesto que existen dos tipos de asociaciones celulares en los cordones seminíferos, las cuales describen de qué manera las células de Sertoli pueden envolver a las células germinales. Nel-Themaat y colaboradores (2011) han propuesto que existen dos tipos de asociaciones durante el desarrollo neonatal del cordón seminífero, de las cuales aún no se conoce su importancia sobre la fertilidad en la vida adulta. La asociación de tipo roseta está conformada por células de Sertoli cuyos núcleos se encuentran uniformemente espaciados cerca de la superficie externa de los túbulos, rodeando a las células germinales de manera individual; por otra parte, el patrón de racimo está formado por células de Sertoli que se pliegan

alrededor de un conjunto de células germinales las cuales están formando un racimo. Podría suponerse que para que en la vida adulta se pueda llevar a cabo el proceso de la espermatogénesis de manera correcta es necesario que se mantenga una adecuada proporción entre los tipos de asociaciones existentes durante el desarrollo del cordón. Al analizar el tipo de asociaciones celulares observamos que en el grupo de animales tratados con genisteína, existe una mayor proporción (85%) de cordones con asociaciones en racimo, en comparación con el grupo control, esto implica que las espermatogonias que se están dividiendo por mitosis no se encuentran rodeadas en su totalidad por CS, lo cual en el animal adulto podría causar una disminución de la fertilidad al no tener las células germinales las condiciones adecuadas.

En la rata, los gonocitos proliferan en el día 17.5 fetal y entran posteriormente en un estado de quiescencia en el cual prácticamente no hay cambios en esta estirpe celular, en el día 3 post natal se renueva el proceso de proliferación y los gonocitos se diferenciarán en espermatogonias (Olaso y Habert 2000). Si bien el “stock” de gonocitos se determina durante la vida fetal (Moreno y col., 2001), la producción final de espermatozoides va a depender tanto de las etapas de gametogénesis que se llevan a cabo en la vida fetal como por la capacidad de los gonocitos en diferenciarse en espermatogonias, por lo que la cuenta espermática puede verse afectada por múltiples razones que involucran los procesos endocrinos, intratesticulares, así como procesos intracelulares (Delbés y col. 2006).

Una forma de evaluar si los cambios que se presentan tanto en la estructura como en el tipo de asociaciones celulares junto con los cambios observados en el EI tienen

una repercusión en la reproducción del animal adulto, es evaluando su fertilidad. Para este análisis se procedió a formar unidades reproductoras y determinar tanto el índice gestacional como el porcentaje de crías producidos por las hembras sometidas a diferente tratamiento. Como era de esperarse, los animales que presentaron mayor índice de gestación (100%) así como mayor número de crías fueron los pertenecientes al grupo testigo, en el caso de los animales tratados neonatalmente con genisteína se observó una disminución de 19% en el índice gestacional y una disminución significativa en el número de crías con relación al grupo testigo.

Como se mencionó anteriormente, hubo aumento del número de asociaciones celulares en racimo que eran las que predominaban en los cordones de los animales tratados con Gensiteína, esto podría significar disminución de la producción de espermatozoides al no estar los gonocitos completamente rodeados por las células de Sertoli, como ocurre en las asociaciones en roseta que predominaban en los cordones de los animales del grupo testigo. Si el número de CS disminuye en el cordón seminífero, es probable que al llegar a la etapa adulta, el epitelio seminífero no esté formado correctamente y las funciones de nutrición, protección (formación de la barrera hemato-testicular) y regulación de la espermatogénesis (produciendo inhibina para disminuir la producción de FSH) no se lleve a cabo adecuadamente. Estos resultados coinciden con estudios anteriores en los que se ha reportado que machos expuestos, ya sea *in utero* o neonatalmente a estrógenos exógenos, como por ejemplo DES, etinil estradiol, o Bifenol A, presentan diversas alteraciones entre

las que se encuentra una disminución importante de la producción de espermatozoides (Sharpe y col. 2003; 2004; Skakkebaek y col. 2001).

Los resultados obtenidos en relación al índice gestacional y al número de crías en el grupo tratado con E₂ debe ser analizado con cuidado, ya que en un principio se podría pensar que estos animales son infértiles por problemas causados en la espermatogénesis, por los cambios observados en los parámetros analizados; sin embargo, esto no lo podemos concluir con este estudio ya que el tratamiento neonatal con E₂ provocó cambios a nivel de la conducta sexual masculina de estos animales los cuales no desplegaron conducta sexual.

Dado que la diferenciación sexual hipotálmica se lleva a cabo en etapas neonatales es muy probable que la administración de E₂ modificó la diferenciación cerebral, lo cual se manifestó con cambios en la conducta sexual. Se ha observado que los núcleos sexualmente dimórficos del área preóptica (SDN) son más grandes en machos que en hembras, estas diferencias son producidas por la aromatización en cerebro de la testosterona proveniente del testículo generando cambios permanentes (Arnold, 2009). Por otro lado, también se ha reportado que la administración de estrógenos exógenos en etapa neonatal modifican tanto la conducta como la atracción sexual (Sullivan y col. 2011). Esto abre la pauta para una realizar un nuevo estudio que determine el efecto del E₂ sobre el desarrollo cerebral de los machos en etapa neonatal para lo que tendrían que realizarse estudios que corroboren si realmente se modifican las regiones dimórfico-sexuales del hipotálamo y si esto es consecuencia directa del efecto del E₂ sobre el tejido nervioso o si es consecuencia

de la disminución de la producción de testosterona debido a una retroalimentación negativa.

En la actualidad la leche de soya suele ser una opción aceptable en la alimentación de bebés alérgicos a la proteína de vaca y cuyas madres no pueden amamantarlos. Sin embargo no se ha tomado en cuenta que estos suplementos contienen fitoestrógenos que afectan el desarrollo de las glándulas sexuales, el sistema nervioso entre otros órganos y tejidos. Lo anterior se debe en parte a la falta de investigaciones dedicadas a evaluar el efecto de estas sustancias durante el desarrollo neonatal y los escasos trabajos que existen toman en cuenta pocos parámetros morfométricos. El presente estudio es de gran importancia ya que muestra la influencia de la genisteína, sobre el desarrollo de las gónadas masculinas midiendo parámetros morfométricos importantes y su influencia sobre la fertilidad en la vida adulta.

Este estudio debe ser tomado en cuenta por la comunidad científica y médica además de la industria farmacéutica ya que demuestra que la genisteína puede provocar cambios en la estructura interna del testículo que a largo plazo tendrá consecuencias sobre la fertilidad.

Del presente trabajo podemos concluir que la genisteína, así como el E₂, administrados neonatalmente inducen cambios en las poblaciones celulares testiculares en la rata, así como en el tipo de asociaciones celulares y la densidad celular lo cual se traduce una baja fertilidad en el animal adulto.

14. REFERENCIAS.

Adlercreutz H. (1998). Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12(4):605-23.

Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T, Arosenema PJ, Kellis JTJ, Vickory LE. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavanoid phytoestrogens. *Journal of steroid biochemistry molecular biology*, 44(2):147–153.

Akingbemi BT, Braden TD, Kempainen BW, Hancock KD, Sherrill JD, Cook SJ, He X, Supko JG. (2007). Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular Leydig cells in the adult rat. *Endocrinology*, 148(9):4475-88.

Alfaro Moreno E, García Cuéllar C, Dueñas González A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, Octubre-Diciembre 46(4):275-280.

Arnold AP. (2009). The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Hormones and Behavior*, 55(5):570-578.

Atanassova N, McKinnell C, Turner KJ, Walker M, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM. (2000). Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*, 141(10):3898-907.

Atanassova N, McKinnell C, Williams K, Turner KJ, Fisher JS, Saunders PT, Millar MR, Sharpe RM. (2001). Age-, cell- and region-specific immunoexpression of estrogen receptor alpha (but not estrogen receptor beta) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Endocrinology*. Feb;142(2):874-86

Avelar GF, Oliveira CF, Soares JM, Silva IJ, Dobrinski I, Hess RA, Franca LR. (2010). Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: a non-random event. *Jul 1;74(1):11-23.*

Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazar J, Gabant P, Szpirer C, (2006). Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat. Neurosci.* 9:220-226.

Barsoum IB, Yao HH. (2010). Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl*, 31(1):11-5.

Björnström L, Sjöberg M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol*, 19(4):833-42.

Carvajo-Pérez E, Carvajo Pérez S, Triviño A, Hernández González LC. López Muñiz A. (1994) Análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunohistoquímicas para microscopía óptica. *Servicio de Publicaciones de la Universidad de Coruña. II Reunión científica en biología celular y molecular: 135-156.*

Chemes HE. (2001). Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J, Androl*, Feb;24(1):2-7.

Chen H, Ge RS, Zirkin BR. (2009).Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol*, 10;306(1-2):9-16.

Chen A, Rogan WJ. (2004). Isoflavones in soy infant formula: A review of evidence for endocrine and other activity in Infants. *Annual Review of Nutrition* 24:33-54.

Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A, Koopman P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol*, 326(1):112-20.

Cupp AS, Skinner MK. (2001).Actions of the endocrine disruptor methoxychlor and its estrogenic metabolite on in vitro embryonic rat seminiferous cord formation and perinatal testis growth .*Reprod Toxicol*, 15(3):317-26.

Delbès G, Levacher C, Pairault C, Racine C, Duquenne C, Krust A, Habert R. (2004).Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology*, 145(7):3395-403.

Delbès G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P, Habert R. (2005). Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, 146(5):2454-61.

Delbés G, Levacher CH, Habert R. (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 132(4):527–538.

Dhar JD, Setty BS. (1976). Epididymal response to exogenous testosterone in rats sterilized neonatally by estrogen.*Endokrinologie*, 68(1):14-21.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*, 30(4):293-342. doi: 10.1210/er.2009-2002.

Doerge DR, Sheehan DM. (2002). Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environ Health Perspect*, 110 Suppl 3:349-53.

Döhler KD, Wuttke W. (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*, 97(4):898-907.

Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA, Fong HH. (1975). Potential value of plants as sources of new antifertility agents I. *J Pharm Sci*, 64(4):535-98.

Fawcett D. (1992). *Tratado de Histología*, 11 Ed. México DF:Interamericana Mc Graw-Hill.

Fielden MR, Halgren RG, Fong CJ, Staub C, Johnson L, Chou K, Zacharewski TR. (2002). Gestational and lactational exposure of male mice to diethylstilbestrol causes long-term effects on the testis, sperm fertilizing ability in vitro, and testicular gene expression. *Endocrinology* 143(8):3044–3059.

Gaytan F, Lucena MC, Munoz E, Paniagua R. (1986a). Morphometric aspects of rat testis development.*JAnat*, 145:155-9.

Gaytan F, Pinilla L, Aguilar R, Lucena MC, Paniagua R. (1986b). Effects of neonatal estrogen administration on rat testis development with particular reference to Sertoli cells. *J Androl*, 7(2):112-21.

- Glaze GM. (1984). Diethylstilbestrol exposure in utero: review of literature. *J Am Osteopath Assoc*, 83(6):435-8.
- Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. (2003). Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod*, 68(6):2081–2091.
- Griswold SL, Behringer RR. (2014). Fetal Leydig Cell Origin and Development. *Sex. Dev.* 3(1):1-15
- Habert R, Delbes G, Duquenne C, Livera G, Levacher C. (2006). Effets des estrogènes sur le développement du testicule pendant la vie foetale et neonatale. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34(10):970–977.
- Hall JM, McDonnell DP. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*, 5(6):343-57.
- Henley DV, Korach KS. (2010). Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling. *Hormones*, 9(3):191-205.
- Hollman PC, Katan MB. (1999). Dietary Flavonoids: Intake, Health: Effects and Bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37(9-10):937-942.
- Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, Lee SH, Kang YS, Choe TB, Hur HG, Han KO. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 101(4-5):246-53.
- Ibrahim A-R, Abdul-Haj YJ. (1990). Aromatase inhibition by flavanoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 37(2): 257–260.
- Katzenellenbogen BS. (1996). Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol Reprod*, 54(2):287-93.
- Kozłowska A, Szostak-Węgierek D. (2014). Flavonoids and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig* 65(2):79-85.
- Kupier GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag P, van der Berg B, Gustaffsson J-A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139(10): 4252–4263.
- Kula K, Walczak-Jedrejowska R, Słowikowska-Hilczer J, Oszukowska E. (2001). Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 178(1-2):89-97.
- Kula K, Rodríguez-Rigau LJ, Steinberger E. (1983). Synthesis of testosterone and 5 alpha-reduced androgens during initiation of spermatogenesis in the rat. *Andrologia*, 15(6):627-34.
- Lassarguere J, Livera G, Habert R, Jegou B. (2003). Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *ToxicolSci* 73(1):160–169.
- Lennox B. (1981). The infertile testis. En: Anthony PP, Macsween RNM (Eds.): *Recent Advances in Histopathology*. Churchill Livingstone: Edinburgh-London. 11:125-148
- Lewis W, Brooks N, Milburn M, Soames A, Stone S, Hall M, Ashby J (2003). The Effects of the Phytoestrogen Genistein on the Postnatal Development of the Rat. *Toxicological Sciences*, 71: 74-83.

Maffei L, Murata Y, Rochira V, Tubert G, Aranda C, Vazquez M, Clyne CD, Davis S, Simpson ER, Carani C. (2004). Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(1):61-70.

Moreno SG, Dutrillaux B, Coffigny H (2001). Status of p53, p21, mdm2, pRb proteins, and DNA methylation in gonocytes of control and gamma-irradiated rats during testicular development. *Biology of Reproduction* 64(5):1422–1431.

Naftolin F, Ryan KJ, (1975). The metabolism of androgens in central neuroendocrine tissues. *J Steroid Biochem* 6:993-997.

Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usumi K, Ono H. (2001). Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod Toxicol*, 15(4):399-411.

Napier ID, Simon L, Perry D, Cooke PS, Stocco DM, Sepehr E, Doerge DR, Kemppainen BW, Morrison EE, Akingbemi BT. (2014). *Biol. Reprod. Testicular Development in Male Rats is Sensitive to a Soy-Based Diet in the Neonatal Period.* 90(2): 1-12.

Negro-Vilar A, Krulich L, McCann SM. (1973). Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. *Endocrinology*, 93(3):660-4.

Nel-Themaat L, Gonzalez G, Akiyama H, Behringer RR.(2010). Illuminating testis morphogenesis in the mouse. *J Androl*, 31(1):5-10.

Nel-Themaat L, Jang CW, Stewart MD, Akiyama H, Viger RS, Behringer RR.(2011). Sertoli cell behaviors in developing testis cords and postnatal seminiferous tubules of the mouse. *BiolReprod*, 84(2):342-50.

Nel-Themaat L, Vadakkan TJ, Wang Y, Dickinson ME, Akiyama H, Behringer RR. (2009). Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9-EGFP mice. *Dev Dyn*, 238(5):1100-10.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*, 22(3):289-318.

O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. (2006). The foetal Leydig cell - differentiation, function and regulation. *Int J Androl*, 29(1):90-5.

Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O, Korach KS, Pfaff DW., (2000). Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 97:14737-14741.

Olaso R, Habert R. (2000). Genetic and cellular analysis of male germ cell development. *J Androl*, 21(4):497-511.

O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. (2006). The foetal Leydig cell - differentiation, function and regulation. *Int J Androl*, 29(1):90-5.

Piasecka-Srader J., Kolomycka A., Nynca A., Ciereszcko RE. (2014) Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and phytoestrogen genistein on the activity and the presence of steroidogenic enzyme proteins in cultured granulosa cells of pigs.

Picut CA, Reick AK, Rijk EP, Simons ML, Stump DG, Parker GA. (2014) Postnatal Development of the Testis in the Rat: I. Morphologic Study and II. Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Yoxico, Pathol*, 11

Piprek RP. (2010). Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol*, 54(5):779-86.

Rita S. Strakovsky, Stéphane Lezmi, Jodi A. Flaws, Susan L. Schantz, Yuan-Xian pan, William G. Helferich. (2014). Genistein Exposure during the early postnatal period favors the development of obesity in female, but not male rats. *Toxicol Sci. Mar*;138(1):161-174.

Sadler T. (2010). *Embriología Médica*, 11 Ed. Barcelona: Wolters Kluwer Health.

Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG. (1997). Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr*, 127(2):263-9.

Schmahl J, Capel B. (2003). Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev Biol*, 258(2):264-76.

Setchell B.P. (1970). Testicular Blood Supply, Lymphatic Drainage and Secretion of Fluid. In: *The Testis. Development, Anatomy and Physiology*. Edited by Johnson A.D., Gomes W.R., Vandemark N. L. Academic Press New York pp.101-217.

Setchell KD, Cassidy A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, 129(3):758S-767S.

Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, 350(9070):23-7.

Setchell K, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi J. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* 68(6 suppl):14538-14561.

Sharpe RM. (2003). The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? *Int J Androl* 26(1):2-15.

Sharpe R, Atanassova N, McKinnell C, Parte P, Turner K, Fisher J, Kerr J, Groome N, Macpherson S, Millar M, Saunders P. (1998). Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. *Biol Reprod* 59(5):1084-1094.

Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpster JP. (1995). Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect*, 103(12):1136-43.

Sharpe RM, Irvine DS. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 28(7437):447-451.

Shibayama T, Fukata H, Sakrai K, Adachi T, Komiyama M, Iguchi T, Mori CH. (2001). Neonatal Exposure to Genistein Reduces Expression of Estrogen Receptor Alpha and Androgen Receptor in Testes of Adult Mice. *Endocrine Journal* 48(6):655-663.

Sinisi AA, Pasquali D, Notaro A, Bellastella A. (2003). Sexual differentiation. *J Endocrinol Invest*, 26(3 Suppl):23-8.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*, 16(5):972-8.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*, 331(16):1056-61.

Strohsnitter WC, Noller KL, Hoover RN, Robboy SJ, Palmer JR, Titus-Ernstoff L, Kaufman RH, Adam E, Herbst AL, Hatch EE. (2001). Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst*, 93(7):545-51.

Sullivan AW, Hamilton P, Patisaul HB. (2011). Neonatal agonism of ER β impairs male reproductive behavior and attractiveness. *Horm Behav* (2):185-94.

Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL; Study for Future Families Research Team. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect*, 113(8):1056-61.

Tiemann U., Schneider F., Vanselow J., Tomek W. (2007). In vitro exposure of porcine granulosa cells to the phytoestrogens genistein and daizein: effects on the biosynthesis of reproductive steroids hormones. *Reprod Toxicol*. Nov-Dec;24(3-4):317-25.

Tzagarkis-Foster AJ, Schar Schmidt TC, Lomri N, Leitman DC. (2001). Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem* 276(21):17808-17814.

Walczak-Jedrzejska R, Marchlewska k, Oszukowska E, Filipiak E, Slowikowska-Hilczer J, Kula I. (2013). Estradiol and testosterone inhibit rat seminiferous tubule development in a hormone-specific way. *Reprod Biol*. Sep;13(3):243-250.

Wang C, Makela T, Hase T, Adlercreutz H, Kurzer MS. (1993). Lignans and flavanoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *Journal of Steroid Biochem Mol Biol* 50(3-4):205–212.

Whitten PL, Patisaul HB. (2001). Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 1:5-20.

Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR, Hornsby PP, Herbst AL. (1995). Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N Engl J Med*, 332(21):1411-6.

Wisniewski AB, Cernetich A, Gearhart JP, Klein SL. (2005). Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behavior in male mice. *PhysiolBehav*, 84(2):327-34.

Williams K, McKinnell C, Saunders PT, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe M. (2001). Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update*, 7(3):236-47.

Yanase T., Tanabe M., Nomiyama T., (2015) Sex hormones and metabolic function. *Nihon Rihns*. Apr.73(4):571-5