

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**“EFECTO DEL EXTRACTO DE MEZQUITE (*Prosopis juliflora*) EN LA  
FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA RATA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA

**Biol: EUNICE HERNÁNDEZ SOÑANES**

DIRECTORA

**Dra. MARÍA DEL SOCORRO RETANA MÁRQUEZ**

ASESORAS

**Dra. ADRIANA LIZBETH JUARÉZ ROJAS**

**M. en C. SUSANA ROJAS MAYA**

CDMX, MÉXICO. A 9 DE FEBRERO DE 2018

## **COMITÉ TUTORAL**

### **Directora**

**Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez**

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

### **Asesora**

**M. en C. Susana Rojas Maya**

Facultad de Veterinaria

Universidad Nacional Autónoma de México

### **Asesora**

**Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas**

Universidad Insurgentes

## JURADO

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada

**“Efecto del extracto de mezquite (*Prosopis juliflora*) en la fisiología reproductiva de la rata”** que presentó **Eunice Hernández Soñanes** el día 9 de febrero del 2018.

**M. en. Biol. Exp. Gabriela López (Presidenta)**

---

Departamento de Biología de la Reproducción  
División CBS UAM-I

**Dr. Gerardo Perera Marín (Secretario)**

---

Facultad de Veterinaria  
UNAM

**Dra. Leticia González Núñez (Vocal)**

---

Departamento de Biología de la Reproducción  
División CBS UAM-I

**Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas (Vocal)**

---

Universidad Insurgentes

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al programa de la Maestría de Biología de la Reproducción Animal, que pertenece al programa nacional de posgrados de calidad de CONACyT. N° de CVU: 718965 y Becario: 593033, por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Es importante para mí también agradecer a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, escuela que me permitió concluir con mis estudios de licenciatura y de maestría.

A la Dra. María de Socorro Retana Márquez por darme la oportunidad de realizar este trabajo, dándome el apoyo económico y de su conocimiento para culminar este proyecto. También le agradezco su infinito apoyo por la revisión de la presente tesis.

A si mismo quiero agradecer a cada uno de los miembros del jurado, Dra. Adriana Lizbeth, Dra. Leticia Núñez, Dr. Gerardo Perera y M. Gabriela López por la revisión y comentarios realizados para la presente tesis.

A mi compañera de laboratorio Flor Solano y Sergio Romero quienes estuvieron conmigo apoyándome y aprendiendo durante la maestría para lograr nuestros objetivos.

Esta tesis la dedico con todo cariño y amor a mi familia y amigos quienes han sido mis pilares para seguir adelante.

Es para mí una gran satisfacción dedicarles a ellos este trabajo que con esfuerzo y paciencia fue logrado.

***¡Gracias por ser parte de mi vida!***

## RESUMEN

El mezquite (*Prosopis juliflora*) es una leguminosa que se distribuye en las zonas áridas y semiáridas de México, es ampliamente utilizada en la alimentación de diversas especies de ganado y también en el consumo humano debido a su alto contenido de proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales. Esta planta contiene, además, fitoestrógenos, los cuales son compuestos químicos de origen vegetal que tienen una estructura similar al estradiol. Esto les permite unirse a los receptores para estrógenos (ERs) y generar efectos estrogénicos que pueden generar efectos negativos en la reproducción de diversas especies de mamíferos. Por ello, en el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración del extracto de vaina de mezquite en la reproducción de las ratas hembras y machos, así como sus repercusiones sobre la fertilidad. En este estudio se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar que se dividieron al azar en cuatro grupos experimentales: control (CON), extracto de vaina de mezquite (MEZ), daidzeína (DAI) y estradiol (E<sub>2</sub>). La administración de los diferentes tratamientos se realizó por vía subcutánea durante treinta días consecutivos. Las hembras que recibieron MEZ mostraron un alargamiento en su ciclo estral, que se reflejó en un aumento en el número de días en metaestro y estro. En contraste, el cociente lordótico y la intensidad de lordosis disminuyeron por el efecto del MEZ, mientras que el peso de la vagina de las ratas tratadas con MEZ en la etapa de proestro y diestro fue mayor. La altura del epitelio del útero y de la vagina en la etapa de proestro y diestro fue mayor debido al tratamiento con MEZ. Asimismo, los niveles séricos de progesterona (P<sub>4</sub>) disminuyeron durante el proestro por el tratamiento con

MEZ. En el caso de los machos, el tratamiento con MEZ causó disminución en el número de eyaculaciones y un incremento en la latencia de monta. El peso de las glándulas sexuales masculinas fue menor en los machos tratados con MEZ. Además, el peso testicular, la calidad espermática y la concentración de testosterona (T) disminuyeron en el grupo de MEZ. El número de células germinales positivas a TUNEL, así como el porcentaje de túbulos seminíferos que contenían células germinales positivas a TUNEL incrementó con el tratamiento de MEZ. Los efectos causados por el MEZ resultaron similares a los que causa la DAI, pero de menor intensidad que los efectos generados por el E<sub>2</sub>. Los resultados en este trabajo muestran que el MEZ es capaz de inducir alteraciones en diversos parámetros reproductivos, tanto en la hembra como en el macho, causando disminución en la fertilidad.

## ABSTRACT

Mesquite (*Prosopis juliflora*) is a legume which is distributed in the arid and semi-arid zones of Mexico and is widely used for feeding various species of livestock and even in human diet due to its high content of proteins, carbohydrates, fiber, vitamins and minerals. Mesquite also contains different types of phytoestrogens, which are plant chemical compounds structurally similar to estradiol. This allows their binding with Estrogen receptors (ERs), thus promoting estrogenic effects, which can cause negative effects in the reproduction of several species of mammals. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of the administration of mesquite pod extract on the reproduction of female and male rats, as well as their repercussions on fertility. Female and male Wistar rats were randomly assigned to one of the following experimental groups: control (CON), mesquite pod extract (MEZ), daidzein (DAI) and estradiol (E<sub>2</sub>). The treatments were administered subcutaneously for thirty consecutive days. The females receiving MEZ showed an elongation in their estrous cycle, with increase in the number of days in metaestrus and estrus. In contrast, the lordotic quotient and intensity of lordosis decreased due to the effect of MEZ, while the weight of the vagina of females in proestrus and diestrus was greater than control. The height of the uterine and vaginal epithelium during proestrus and diestrus was greater in females treated with MEZ. Conversely, serum progesterone (P<sub>4</sub>) levels decreased. In the case of the males treated with MEZ, the numbers of ejaculations decreased, and mount latency increased. Male sex glands weight was lower in rats treated with MEZ, and testicular weight, sperm quality and testosterone concentration decreased in this group.

Conversely, the number of TUNEL-positive germ cells and the percentage of seminiferous tubules containing TUNEL-positive germ cells increased with the treatment of MEZ. The effects observed in males treated with MEZ were similar to those caused by DAI treatment, although less intense than the effects generated by E<sub>2</sub>. The results in this work show that the mesquite pod extract is capable of induce alterations in reproductive parameters, both in males and females, causing a decrease in fertility.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 ESTRÓGENOS.....	3
1.2 RECEPTORES PARA ESTRÓGENOS (ERs) .....	3
1.3 ESTRÓGENOS EN EL MACHO .....	6
1.3.1 ESPERMATOGÉNESIS .....	7
1.3.2 CONDUCTA SEXUAL MASCULINA.....	9
1.4 ESTRÓGENOS EN LA HEMBRA .....	11
1.4.1 OVOGÉNESIS .....	11
1.4.2 ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA.....	13
1.5 CICLO ESTRAL DE LA RATA .....	15
1.6 CONDUCTA SEXUAL EN LA HEMBRA .....	17
1.7 FITOESTRÓGENOS.....	19
1.7.1 CLASIFICACIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS .....	19
1.8 LA DAIDZEÍNA.....	20
1.8.1 EFECTOS DE LOS FITOESTRÓGENOS EN EL ORGANISMO.....	21
1.9 EL MEZQUITE .....	22
1.9.1 COMPUESTOS QUÍMICOS EN EL MEZQUITE.....	23
1.9.2 USOS DEL MEZQUITE .....	24
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	26
2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	26
2.2 FITOESTRÓGENOS EN LAS HEMBRAS .....	26
2.3 FITOESTRÓGENOS EN LOS MACHOS.....	29
2.4 EFECTO DEL EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN LA REPRODUCCIÓN DE LAS HEMBRAS. ....	31
2.5 EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN LA REPRODUCCIÓN DE LOS MACHOS .....	31
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	33
<b>5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	34
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	34

7.1 OBJETIVO GENERAL .....	34
7.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
8.1 OBTENCIÓN Y MANEJO DE ANIMALES .....	35
8.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE VAINA DE MEZQUITE .....	35
8.3 SELECCIÓN DE MACHOS SEXUALMENTE EXPERTOS.....	36
8.4 FORMACIÓN DE GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS .....	36
8.5 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS EN LAS HEMBRAS .	38
8.5.1 EVALUACION DEL CICLO ESTRAL .....	38
8.5.2 CONDUCTA SEXUAL FEMENINA .....	39
8.5.3 CRUZAMIENTOS DE HEMBRAS.....	40
8.5.4 OBTENCIÓN DE ÓRGANOS SEXUALES .....	41
8.6 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE LOS MACHOS .....	41
8.6.1 CONDUCTA SEXUAL MASCULINA.....	41
8.6.2 OBTENCIÓN DE LOS ÓRGANOS SEXUALES MASCULINOS.....	42
8.6.3 ANÁLISIS ESPERMÁTICO.....	43
8.7 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS REPRODUCTIVOS .	45
8.8 CORTES HISTOLÓGICOS .....	46
8.9 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTORES FEMENINOS.....	46
8.10 MEDICIÓN DE LA ALTURA DEL EPITELIO VAGINAL Y UTERINO.....	47
8.11 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TESTÍCULOS .....	48
8.12 EVALUACIÓN HORMONAL .....	49
8.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
9.1 EFECTO DEL EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN HEMBRAS .....	51
9.1.1 CICLO ESTRAL.....	51
9.1.2 CONDUCTA SEXUAL FEMENINA .....	52
9.1.3 PESOS CORPORALES Y GLANDULARES EN HEMBRAS .....	53
9.1.4 NIVELES HORMONALES DE P <sub>4</sub> Y E <sub>2</sub> .....	54
9.1.5 ALTURA DE LOS EPITELIOS .....	56

9.2 EFECTOS DEL EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN LA RATA MACHO ADULTA.....	59
9.2.1 CONDUCTA SEXUAL MASCULINA.....	59
9.2.2 PESOS CORPORALES Y GLANDULARES EN MACHOS .....	60
9.2.3 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA .....	61
9.2.4 NIVELES HORMONALES DE T .....	63
9.2.5 EVALUACION DE LA MUERTE EN CÉLULAS TESTICULARES .....	63
9.3 PORCENTAJE DE FERTILIDAD EN HEMBRAS Y MACHOS .....	65
9.4 TAMAÑO DE LAS CAMADAS .....	66
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>79</b>

## ABREVIATURAS

<b>AVPV</b>	: Área ventral periventricular
<b>DHT</b>	: Dihidrotestosterona
<b>DE</b>	: Disruptor endocrino
<b>ERs</b>	: Receptores a estrógenos
<b>ER<math>\alpha</math></b>	: Receptor a estrógenos alfa
<b>ER<math>\beta</math></b>	: Receptor a estrógenos beta
<b>E<sub>2</sub></b>	: Estradiol
<b>EREs</b>	: Elementos de respuesta a estrógenos
<b>FSH</b>	: Hormona folículo estimulante
<b>HHG</b>	: Eje Hipotálamo Hipófisis Gónada
<b>LH</b>	: Hormona leutinizante
<b>LQ</b>	: Cociente lordótico
<b>mPOA</b>	: Área preóptica media
<b>OR</b>	: Receptor a oxitocina
<b>NVM</b>	: Núcleo ventromedial
<b>P<sub>4</sub></b>	: Progesterona

**PR** : Receptor a P<sub>4</sub>

**T** : Testosterona

**3β-HSD** : 3 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

## 1. INTRODUCCIÓN

La alimentación forma parte fundamental durante el desarrollo de los organismos y juega un papel importante en la función reproductiva. A menudo cuando no existe una adecuada alimentación se observan problemas en la fertilidad (Van der Spuy, 1985). Sin embargo, a pesar de consumir una dieta adecuada y no presentar problemas de desnutrición, en la dieta de origen vegetal existen compuestos químicos que pueden interferir con la fisiología reproductiva animal. Algunos de estos compuestos vegetales son los fitoestrógenos. Este tipo de compuestos pueden alterar el sistema hormonal; por ello, a todos estos compuestos se les ha dado el nombre de disruptores endocrinos (DE). Otro tipo de compuestos que también pueden alterar el sistema hormonal, pero que no serán explicados aquí, son productos químicos derivados de: pesticidas, fungicidas y agentes farmacéuticos (Cederroth *et al.* 2012).

En lo que respecta a los fitoestrógenos, éstos son un grupo diverso de compuestos sintetizados por las plantas con una estructura y funcionalidad similar a los estrógenos endógenos presentes en los mamíferos (Ososki y Kennelly, 2003). Una de las primeras evidencias del efecto provocado por algunos de los compuestos de las plantas sobre la reproducción fueron las alteraciones sobre la fertilidad observadas en un grupo de ovejas del oeste de Australia que consumieron trébol (Bennett *et al.*, 1946). Otra evidencia se describió en ovejas que consumieron una dieta rica en trébol y que presentaron disminución en las tasas de ovulación, en el número de crías y, al mismo tiempo, defectos estructurales en el tracto reproductivo (Cederroth *et al.*, 2012), a lo que se denominó “enfermedad de trébol”.

Fue hasta el año 1951 cuando Bradbury y White lograron aislar del trébol dos componentes con características estructurales químicas parecidas a los compuestos estrogénicos, estas moléculas encontradas fueron: la genisteína y la formononetina, compuestos que pertenecen al grupo de las isoflavonas. Posteriormente se identificaron otros compuestos con características similares como: la daidzeína y la biochanina A (Mendoza *et al.*, 2002). En la mayoría de los estudios realizados, se ha reportado que la exposición a los fitoestrógenos causa alteraciones en las funciones endocrinas a nivel de los ovarios o testículos; también influyen en el tiempo para alcanzar la pubertad, provocan alteraciones en la producción de gametos e incluso pueden interferir de cierta manera con la lactancia (Cederroth *et al.*, 2012).

Los estudios realizados en diferentes especies de plantas indican que el trébol no es la única planta donde se encuentran este tipo de compuestos, ya que en la familia de las leguminosas se han encontrado mayores cantidades de estos compuestos (Sirotkin y Harrath, 2014). Las leguminosas tales como la soya, la alfalfa y el trébol forman parte importante de la dieta de las personas y de los animales y estudios recientes apuntan el potencial estrogénico que estas plantas tienen sobre la fisiología reproductiva en diferentes especies de mamíferos, incluido el humano (Cederroth *et al.*, 2012).

Los estudios que se realizan para ampliar el conocimiento acerca de los efectos estrogénicos que algunas plantas tienen en la reproducción son de gran importancia, debido a que los fitoestrógenos pueden causar efectos similares a los de los estrógenos.

## 1.1 ESTRÓGENOS

Los estrógenos son hormonas esteroides que tienen un papel importante en diferentes funciones del organismo, tales como la regulación del crecimiento celular, la reproducción, el desarrollo y la diferenciación sexual (Jia *et al.*, 2015). Estas hormonas son producidas principalmente por las gónadas y la placenta, pero también son sintetizadas en otros tejidos como: son las células del tejido adiposo y algunas estructuras cerebrales (Cui *et al.*, 2013; Findlay *et al.*, 2010) donde en cada uno de estos órganos tienen funciones importantes.

El estrógeno más potente es el 17  $\beta$  estradiol ( $E_2$ ), mientras que la estrona y el estriol tienen una actividad más débil comparada con el  $E_2$  (Lazari *et al.*, 2009). Entre los órganos blanco del  $E_2$  se encuentran el hipotálamo, la hipófisis, el hueso, el tejido glandular mamario, el hígado y las gónadas. La acción de esta hormona sexual se da a través de sus receptores para estrógenos (ERs) (Jia *et al.*, 2015), los cuales se encuentran generalmente en el citoplasma, aunque ya se ha demostrado la presencia de ERs en la membrana celular (Findlay *et al.*, 2010).

## 1.2 RECEPTORES PARA ESTRÓGENOS (ERs)

Los receptores son proteínas que juegan un papel importante en el mecanismo de acción de las hormonas, para así inducir respuestas celulares (Findlay *et al.*, 2010). Se han definido también como factores de transcripción nuclear específicos, activados por ligando, y actualmente se conocen dos subtipos de ERs: ER $\alpha$  y ER $\beta$  (DeMayo *et al.*, 2002).

Ambos subtipos comparten una estructura aparentemente similar, la cual está formada por proteínas que se encuentran arregladas de una manera modular formando las regiones A/B, C, D y E/F (Fig. 1). Estas regiones participan en la formación de dominios independientes que a su vez pueden interactuar entre sí. La región A/B es el dominio N-terminal y solamente presenta un 16% de similitud entre el ER $\alpha$  y el ER $\beta$  y está involucrado en las interacciones intra e inter moleculares y en la activación de genes de transcripción. El dominio de unión al DNA (DBD) está formado por la región C y está altamente conservada entre los dos subtipos de receptores; comparten un 97% de similitud entre los aminoácidos y las secuencias específicas de unión al DNA denominadas como elementos de respuesta a estrógenos (EREs). La región D está formada por el dominio con función de bisagra, tiene un papel importante en la dimerización del receptor y en la unión a las proteínas chaperonas de choque térmico (Hsp). La región E/F, localizada en el extremo C-terminal, comprende los dominios de unión al ligando (LBD); ambos subtipos de receptores muestran solamente un 59% de similitud en la secuencia de aminoácidos de este dominio (Jia *et al.*, 2015).

Los ERs contienen además dos regiones llamadas función de activación (AF-1 y AF-2), importantes en la actividad transcripcional dependiente del ligando y lo hacen al interactuar con co-activadores de transcripción (Marino *et al.*, 2006).

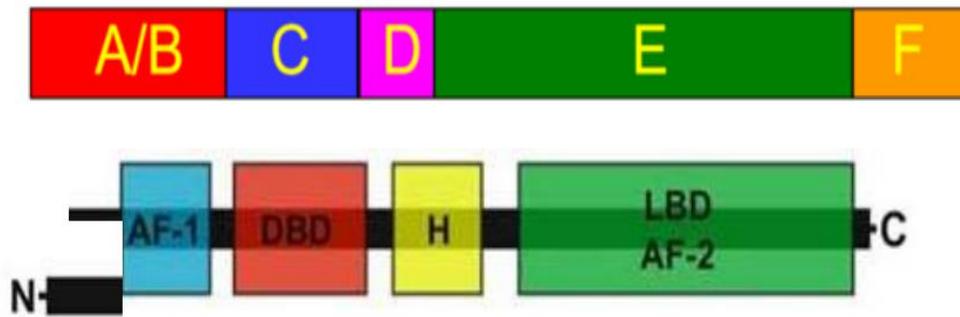


Fig 1. Estructura de las regiones y dominios de los ERs.

El mecanismo clásico de respuesta a los E<sub>2</sub> es mediante la vía genómica, en esta vía el receptor involucra la unión del E<sub>2</sub> al receptor citoplasmático y una vez dimerizado es translocado al núcleo para unirse a los EREs localizados en genes promotores. La unión de la hormona con el receptor induce un cambio conformacional en el dominio de unión al ligando, lo que provoca que las proteínas co-activadoras sean reclutadas (Björnström y Sjöberg, 2005).

El E<sub>2</sub> también puede ejercer acciones no genómicas al interactuar a través de receptores membranales y desencadenar la activación de varias cascadas de proteínas-cinasas (Björnström y Sjöberg, 2005).

Además de la diferencia estructural entre el ER $\alpha$  y ER $\beta$ , se ha descrito también que estos receptores tienen patrones de expresión diferentes en los distintos tejidos del organismo (Findlay *et al.*, 2010). El ER $\alpha$  se expresa principalmente en el ovario, el útero, la placenta, las glándulas mamarias, los riñones, el hueso, el tejido adiposo y el hígado. Mientras que el ER $\beta$  se encuentra principalmente en las células granulosas y de la teca en los folículos ováricos, en las células de Leydig, en los espermatozoides, en las células de Sertoli, en el epidídimo, en la próstata en el hipotálamo, el sistema

cardiovascular, en el pulmón, en el riñón, en el colon y en la vagina (Jia *et al.*, 2015; Kim y Park, 2012).

### 1.3 ESTRÓGENOS EN EL MACHO

Las principales hormonas sintetizadas por los testículos son los andrógenos, E<sub>2</sub>, inhibina, activina y oxitocina. El principal andrógeno, es la testosterona (T), que es sintetizada a partir del colesterol en las células de Leydig por estímulo de la hormona luteinizante (LH) para expresar y activar a las enzimas que participan en la esteroidogénesis. La reacción enzimática inicial es la conversión de colesterol a pregnenolona, esta reacción se lleva a cabo mediante la acción de la enzima P450<sub>scc</sub>. La siguiente reacción es catalizada por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), la cual cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona. En las siguientes reacciones se forma 17α- hidroxiprogesterona y androstenediona reguladas por acción de la enzima P450 17β- hidroxilasa/17-20 liasa (P450<sub>c17</sub>; CYP17), el último paso en la transformación de androstendiona a T, es regulado por la enzima 17β- hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β-HSD) (Stooco y Mc Phaul, 2006).

La T sintetizada difunde libremente al interior del túbulo seminífero y se une a la proteína unidora de andrógenos (ABP) en las células de Sertoli. También puede ser transformada a dihidrotestosterona (DHT) por medio de la enzima 5α-reductasa, o bien ser aromatizada a E<sub>2</sub> en las células de Sertoli.

El E<sub>2</sub> es sintetizado en las células de Leydig, en las células germinales y en las células de Sertoli (Hess, 2003), ya que en estos tipos celulares se expresa la enzima P450 aromatasa, que se encarga de la conversión de T a E<sub>2</sub> (Lazari *et al.*, 2009). El E<sub>2</sub>

juega un papel crítico en la función reproductiva masculina, ya que modula la libido y la espermatogénesis (Schulster *et al.*, 2016). La ausencia de síntesis de estrógenos en ratones knockout para aromatasa (ARKO) resulta en la disminución de la fertilidad (Hess, 2003).

### 1.3.1 ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es el proceso por el cual se forman células haploides llamadas espermatozoides a partir de células diploides ( $2n$ ) indiferenciadas, llamadas espermatogonias (Fig. 2.), ubicadas en la base de la lámina basal del túbulo seminífero. Este proceso es regulado por hormonas tales como la LH, la FSH, la T y el  $E_2$  y se lleva a cabo dentro del túbulo seminífero (Cheng y Mruk, 2010). El proceso de la espermatogénesis consiste principalmente de tres fases secuenciales importantes (Johnson y Everitt, 2007) que son:

1.- Espermatocitogénesis: Inicia cuando las espermatogonias indiferenciadas comienzan a dividirse mitóticamente al inicio de la pubertad, marcando el inicio de la espermatogénesis. Las espermatogonias A indiferenciadas se dividen mitóticamente para producir más espermatogonias; algunas de éstas maduran y forman espermatogonias A más diferenciadas llamadas: A1, A2, A3 y la A4. Las espermatogonias A4 se dividen nuevamente por mitosis y se diferencian en espermatogonias intermedias (In) y, posteriormente en espermatogonias tipo B. Las espermatogonias B se dividen por mitosis para producir dos espermatoцитos primarios en preleptoteno, los cuales inician la primera división meiótica (Johnson y Everitt, 2007) (Fig. 2).

2.- Meiosis: Cada espermatocito primario en preleptoteno, con su contenido de ADN duplicado, continúa su camino hacia el compartimiento adluminal del túbulo seminífero, atravesando las uniones estrechas formadas entre las células de Sertoli que forman la barrera hemato-testicular. Una vez que termina la primera división meiótica cada espermatocito primario es capaz de producir dos espermatocitos secundarios que inician la segunda división meiótica para que ocurra la reducción del número de cromosomas y producir cada uno dos espermátidas redondas haploides que serán capaces de entrar a la siguiente fase.

3.- Espermiogénesis: Durante esta fase ocurre la transformación de las espermátidas redondas haploides a espermatozoides altamente condensados y maduros. La primera etapa es la construcción de la vesícula acrosomal a partir del aparato de Golgi, posteriormente el acrosoma forma un casquete que cubre 1/3 del núcleo del espermatozoide y este sistema acrosomal migra hacia la superficie ventral del núcleo de la espermátida (Hess y Renato de Franca, 2008). Adicionalmente, en el núcleo ocurre la condensación de la cromatina y el reemplazo de histonas por protaminas; de esta manera los espermatozoides desarrollan una cromatina fuertemente comprimida en la cual la expresión genética está completamente ausente. Durante este proceso también comienza la formación del flagelo. El citoplasma restante se desecha en la gota citoplasmática y las mitocondrias forman un anillo alrededor de la base del flagelo para formar el cuello (Gilbert, 2005). Una vez que los espermatozoides están completamente formados son liberados dentro del lumen del túbulo seminífero mediante un proceso conocido como espermiación.

En la rata el proceso de transformación de espermatogonia a espermatozoide toma 48 días (Johnson y Everitt, 2007) y se divide en XIV etapas, siendo las etapas VII y VIII andrógeno dependientes y las células expresan una gran cantidad de receptores para andrógenos (ARs).

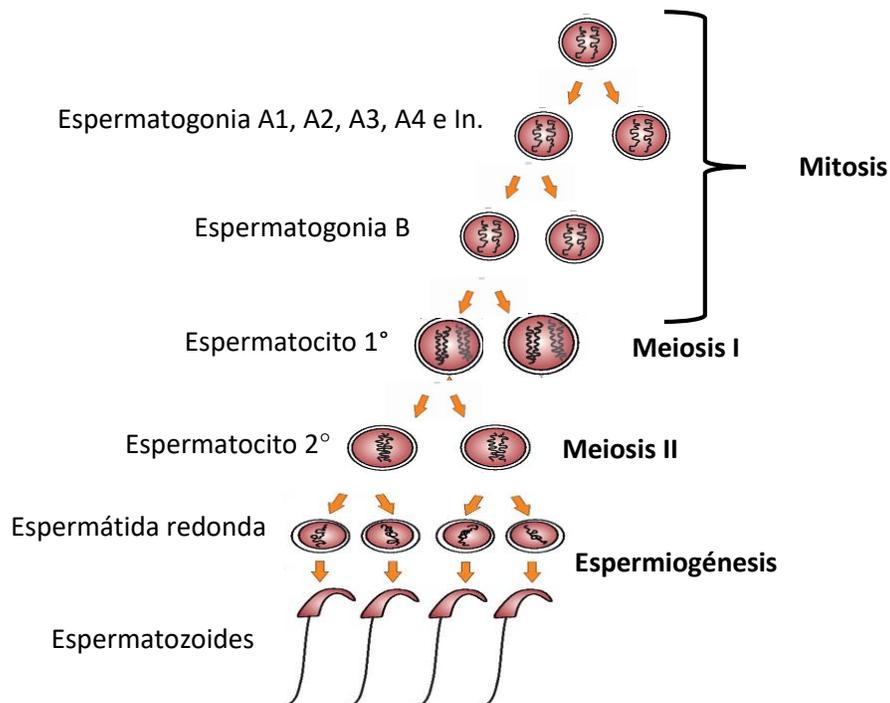


Fig 2. Proceso de espermatogénesis en la rata. Se muestran las tres principales fases: Mitosis, Meiosis y Espermiogénesis.

### 1.3.2 CONDUCTA SEXUAL MASCULINA

En la rata macho, la capacidad copulatoria se adquiere entre los 45 y 75 días de edad (Hull y Dominguez, 2007). El comportamiento sexual de la rata macho puede ser descrito como una serie de patrones motores que eventualmente culminan con la eyaculación (Veening y Coolen, 2014). El apareamiento es regulado principalmente

por el E<sub>2</sub> y la DHT, siendo el E<sub>2</sub> el responsable de la cópula a nivel central y la DHT regula los reflejos genitales (Hull y Dominguez, 2007).

El estímulo quimiosensorial recibido por el sistema vomeronasal es el estímulo más importante para el inicio del apareamiento en los roedores (Hull y Dominguez, 2007). Durante el inicio de esta conducta, el macho determina si el medio es seguro y si la hembra es receptiva. Durante esta fase pre-copulatoria el macho muestra conductas exploratorias, acercándose, siguiendo y olfateando la región anogenital de la hembra (Veening y Coolen, 2014). Posteriormente el macho se acerca a la grupa de la hembra y la monta, haciendo movimientos pélvicos superficiales y, si detecta la vagina de la hembra, inserta su pene en la vagina realizando movimientos pélvicos más profundos durante 200-300 msec; a continuación desmonta rápidamente hacia atrás y acicala sus genitales. Después de 7 a 10 intromisiones, el macho eyacula. La eyaculación se caracteriza por un empuje más largo y profundo además de una desmonta mucho más lenta. La eyaculación se acompaña de contracciones rítmicas de los músculos bulbo esponjosos e isquiocavernosos en la base del pene, además de contracciones de los músculos del esfínter anal y de los músculos esqueléticos. Después de la eyaculación, el macho descansa durante el intervalo post-eyaculatorio (PEI), que puede durar de 6 a 10 minutos antes de reanudar el apareamiento (Hull y Dominguez, 2007).

La conducta sexual masculina es regulada por áreas cerebrales específicas. El olor de la hembra es percibido por el sistema olfatorio y después es procesado en estructuras críticas para la cópula como son: la amígdala medial (MeA), el núcleo de la cama de la estría terminal (BNST) y el área pre óptica media (mPOA) en el

hipotálamo. El mPOA es el sitio más importante en la regulación de la conducta sexual, ya que recibe la información de diferentes sistemas sensoriales, y como respuesta envía conexiones a otros núcleos hipotalámicos, al mesencéfalo y al tronco cerebral, los cuales regulan patrones autonómicos, somato-motores y estados motivacionales (Hull y Domínguez, 2007). En cuanto a la regulación endocrina de la conducta sexual, ésta depende de la aromatización de la T a E<sub>2</sub> en el mPOA. Cuando se estimulan los ERs y los ARs situados en el MPOA se realiza la cópula completa en las ratas macho.

Además del E<sub>2</sub> y la DHT, la activación de la conducta sexual depende de la acción de neurotransmisores tales como la dopamina, el glutamato y el óxido nítrico (cuya síntesis depende tanto de la T como del E<sub>2</sub>), facilitando la cópula y los reflejos genitales (Hull y Domínguez, 2007).

#### 1.4 ESTRÓGENOS EN LA HEMBRA

En las hembras, los ovarios llevan a cabo dos funciones importantes; 1) formar gametos femeninos, a través de la ovogénesis (Fig. 3) y 2) sintetizan E<sub>2</sub>, mediante la esteroidogénesis ovárica (Fig.4) (Tres Guerres y Castillo, 2006).

##### 1.4.1 OVOGÉNESIS

La ovogénesis es el proceso de formación, crecimiento y maduración de los gametos femeninos denominados ovocitos. Este proceso inicia a partir de las ovogonias, células que se originan a partir de las células germinales primordiales (CGP) durante el desarrollo embrionario. Conforme las ovogonias migran hacia la cresta gonadal, proliferan por mitosis. Al llegar a la cresta germinal, inician la primera división meiotica, forman ovocitos primarios, mismos que quedan arrestados en la fase

de diploteno de la profase I, etapa donde permanecen detenidos hasta que, en la pubertad, la LH reactiva la meiosis (Sánchez y Smitz, 2012). Al finalizar la primera división meiótica, se forman dos células hijas de diferente tamaño, cada una con 23 cromosomas. Una de las células es el ovocito secundario, que recibe la mayor parte del citoplasma, mientras que la otra es el primer cuerpo polar y no recibe citoplasma. El ovocito secundario continúa con la meiosis II y se detiene en metafase II para ser liberado del ovario, en espera de ser fertilizado (Fig. 3) (Cornejo, 2009). El proceso de maduración del ovocito ocurre dentro de estructuras especiales a las cuales se les denomina folículos. Los folículos primordiales están constituidos por una capa de células somáticas que rodean al ovocito; posteriormente el folículo sufrirá un proceso complejo de proliferación, diferenciación y maduración de las células foliculares. El folículo maduro está formado por varias capas de células que rodean al ovocito y reciben el nombre de células de la granulosa y dos capas de células más externas denominadas células de la teca (Tres Guerres y Castillo 2006). La función de las células foliculares es llevar a cabo la esteroidogénesis.

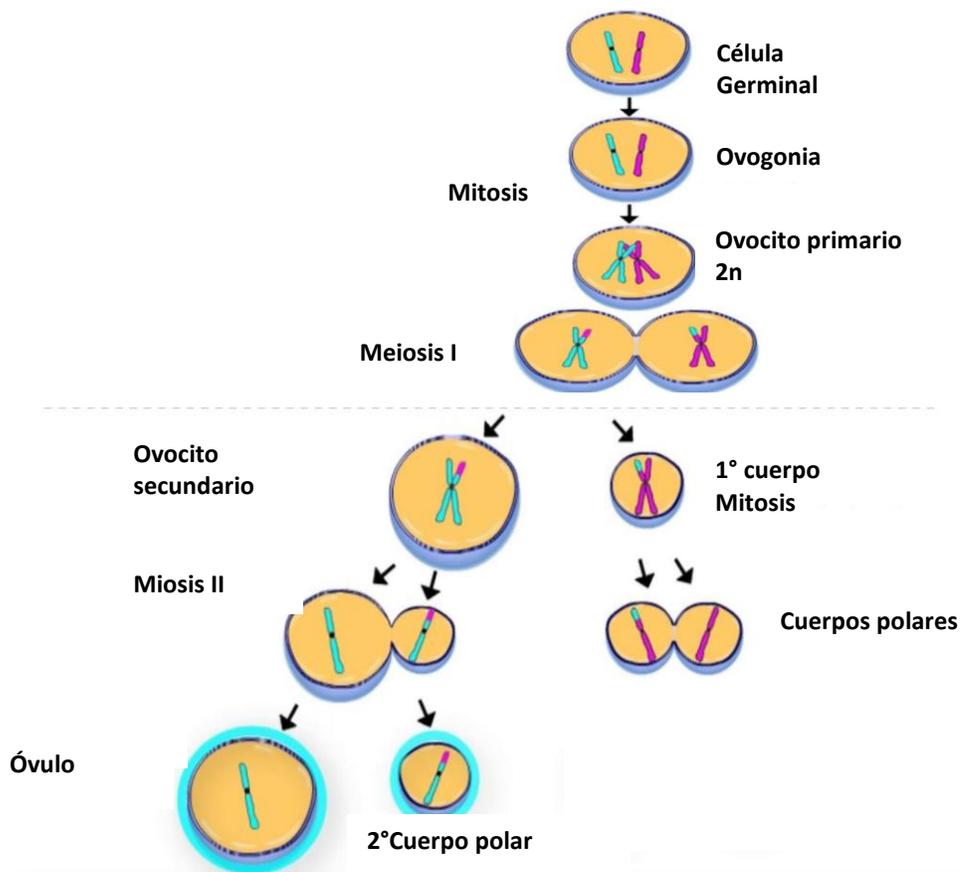


Fig 3. Proceso de ovogénesis. Se muestra la división mitótica en las ovogonias, el proceso de meiosis I en los ovocitos primarios y el proceso de meiosis II en los ovocitos secundarios para formar un ovulo maduro.

#### 1.4.2 ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA

La síntesis de las hormonas esteroideas está regulada por la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Jefferson, 2010) cuya síntesis y liberación es regulada por la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH) (Prieto y Velázquez, 2002) .

En las células de la teca se expresan receptores para LH y receptores para lipoproteínas (HDL y LDL). Estas células responden a la LH y expresan las enzimas StAR, P450 scc, 3β-HSD y P450 c17, que son responsables de la síntesis de los

andrógenos, androstenediona y T (Williams y Erickson, 2000). La androstenediona y la T se difunden hacia las células de la granulosa, las cuales expresan receptores para FSH, la cual estimula la activación de la enzima P450Arom (CYP 19 A1), necesaria para que las células de la granulosa aromaticen la androstendiona a estrona (E<sub>1</sub>) y, posteriormente, la enzima 17-β HSD convierte la E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub> (Fig. 4) (Williams y Erickson, 2000).

El E<sub>2</sub> ejerce un papel regulador importante en diversos aspectos de la reproducción de la hembra, tales como: el desarrollo de los folículos ováricos y la activación del pico preovulatorio de gonadotropinas (Findlay *et al.*, 2010). También ejerce efectos de retroalimentación positiva y negativa sobre las estructuras del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O), regula el ciclo estral (DeMayo *et al.*, 2002), estimula el crecimiento del endometrio uterino y la receptividad sexual (deCatanzaro y Pollock, 2016).

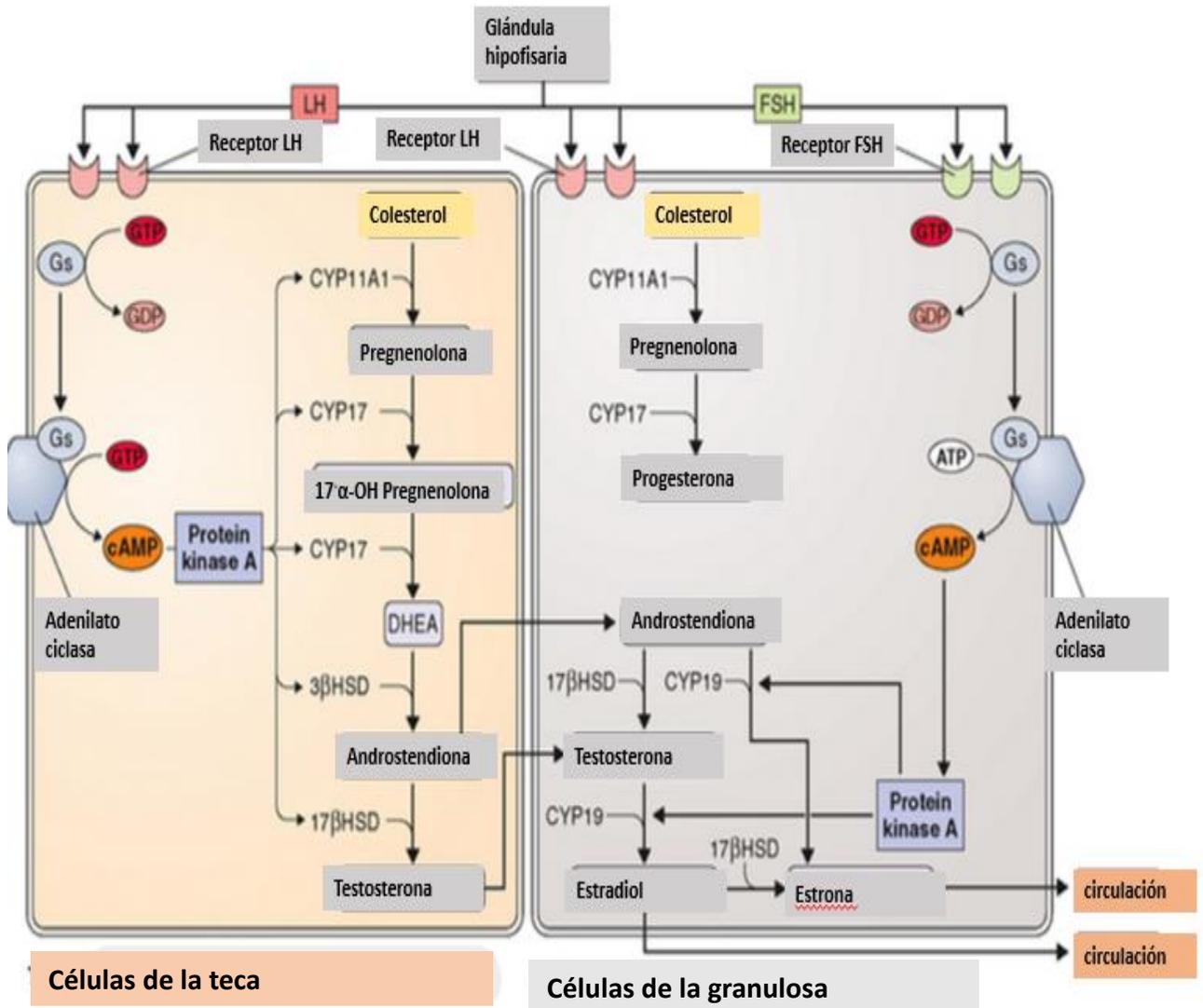


Fig 4. Esteroidogénesis ovárica. El proceso necesita de células de la teca para la síntesis de andrógenos. Las células de la granulosa transforman los andrógenos a estrógenos. Se muestran las enzimas que intervienen en el proceso. <https://clinicalgate.com/ovarian-hormones-structure-biosynthesis-function-mechanism-of-action-and-laboratory-diagnosis/>

### 1.5 CICLO ESTRAL DE LA RATA

En la rata, el ciclo estral tiene una duración aproximada de 4 a 5 días y está dividido en 4 etapas: el proestro, con una duración de aproximadamente 12-14 horas; el estro, con una duración aproximada de 25-27 horas; el metaestro, que dura

alrededor de 6-8 horas, y el diestro con un tiempo de duración de 55-57 horas (Freeman, 2006).

Durante el ciclo estral las células del epitelio vaginal presentan cambios histológicos importantes en su estructura. Las cuales se pueden evaluar mediante un frotis vaginal donde puede diferenciarse cada una de las cuatro etapas del ciclo. La evaluación del ciclo es utilizada como marcador del estado funcional del eje H-H-O a través de la identificación de cada una de las etapas.

El proestro, se caracteriza por presentar células epiteliales nucleadas; en la etapa de estro, predominan las células cornificadas (células queratinizadas y sin núcleo); durante el metaestro, también llamado diestro I, el tipo celular predominante son los leucocitos, los cuales aparecen mezclados con células epiteliales nucleadas y células cornificadas; finalmente la etapa de diestro se caracteriza por una gran cantidad de leucocitos (Goldman *et al.*, 2007). La apariencia de estas células está relacionada con los cambios en la mucosa vaginal, el útero y los ovarios, los cuales a su vez son dependientes de las concentraciones de gonadotropinas y de esteroides ováricos (Fig 5).

En la etapa de estro la queratinización vaginal es una respuesta al incremento en la secreción de  $E_2$ , que comienza a incrementar desde el segundo día del diestro, permaneciendo en el diestro y alcanzando su pico máximo a la mitad del proestro. Durante esta etapa hay un incremento en la liberación de FSH y de LH para inducir la ovulación en las primeras horas del estro (Goldman *et al.*, 2007). En cuanto a la  $P_4$ , ésta se incrementa durante el proestro; este incremento ocurre casi simultáneamente con la oleada de LH, los niveles de  $P_4$  alcanzan un pico máximo en la tarde de proestro,

volviendo a niveles basales en la mañana del estro y en el caso de la P<sub>4</sub> también hay un segundo pico de origen lúteo alrededor del mediodía del metaestro (Freeman, 2006).

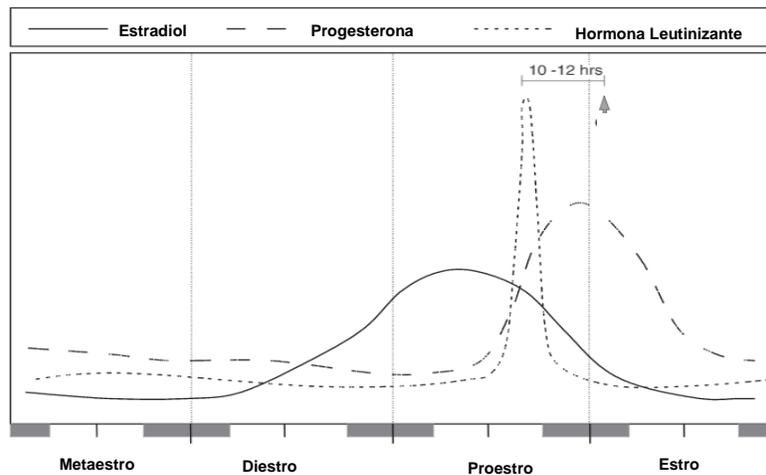


Fig 5. Patrón esquemático del ciclo estral de la rata, se muestran las concentraciones de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y LH. Tomado de Goldman *et al.*, 2007.

## 1.6 CONDUCTA SEXUAL EN LA HEMBRA

Cuando una rata hembra está receptiva, muestra una serie de conductas precopulatorias para atraer al macho, estas conductas proceptivas consisten en saltos, carreras y movimiento rápido de las orejas. Estas conductas dirigidas al macho no sólo atraen su atención sino que incrementan las posibilidades de tener encuentros físicos necesarios para que la hembra presente el patrón motor de lordosis. La conducta de lordosis es un signo claro de la receptividad, durante la cual la hembra permite que el macho pueda llevar a cabo la intromisión y eyacular.

Estas señales genito-sensoriales estimuladas durante la cópula convergen en los niveles lumbosacros de la médula espinal y se dispersan a distintas áreas del sistema nervioso central: tronco del encéfalo, tálamo, hipotálamo y el sistema límbico.

A nivel de la columna vertebral los segmentos lumbares están más relacionados con los estímulos del tracto genital femenino. A nivel de sistema nervioso, el tronco encefálico inferior, el núcleo paragigantocelular (nPGi), el núcleo caudal del rafe, la región de la sustancia *gris periacueductal* (PAG), la parte parvocelular del núcleo subparafascicular (SPFp) y el núcleo ventromedial (VMN) son estructuras involucradas en la conducta sexual femenina. Todas estas estructuras mantienen conexiones neurales y son influenciadas por diferentes tipos de hormonas y neuropéptidos (Veening *et al.*, 2014).

Las principales hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos que pueden influir en el comportamiento sexual de la hembra y en la facilitación de la conducta sexual son el E<sub>2</sub>, la P<sub>4</sub>, la acetilcolina, la norepinefrina, la dopamina, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la GnRH, la prolactina y la oxitocina (Mani y Portillo, 2010).

De las estructuras mencionadas anteriormente, el VMN es la estructura más importante en la vía motora para producir la conducta de lordosis. Este núcleo mantiene conexiones parcialmente recíprocas con áreas como: la sustancia gris periacueductal (PAG), que recibe información sensorial directa de neuronas del cordón lumbosacro e inervaciones desde el perineo, la vagina y el cuello uterino, la región del mPOA, la amígdala, el núcleo de la cama de la estría terminal (BNST), el sistema olfatorio, la vagina y el clítoris. Además de las numerosas sustancias neuroactivas que ejercen un efecto estimulante sobre la conducta de lordosis. El E<sub>2</sub> es la hormona más importante en la función del VMN, ya que es necesaria para inducir la respuesta de lordosis (Veening *et al.*, 2014).

## 1.7 FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos son moléculas no esteroideas de origen vegetal las cuales son estructural y funcionalmente parecidas a los estrógenos (Fig. 6) (Jargin, 2014). Estas moléculas pueden ejercer su efecto al unirse con los ERs e imitar una acción estrogénica (Cederroth *et al.*, 2012), pero sus efectos no son necesariamente idénticos a los provocados por el E<sub>2</sub> (Adams, 1995). Los fitoestrógenos tienen una estructura estable y un bajo peso molecular, lo que les permite atravesar la membrana celular, unirse a los ERs e inducir la expresión de genes, alterando el metabolismo de las hormonas esteroides (Soujanya *et al.*, 2016).

Los fitoestrógenos son sintetizados y utilizados por las plantas como parte de su defensa natural ante parásitos y depredadores (Rietjens *et al.*, 2016). La concentración de fitoestrógenos puede variar dependiendo del ambiente en el que se encuentre la planta, tales factores ambientales como la temperatura, la humedad, la presencia de hongos y bacterias, la edad de la planta (Adams, 1995), la localización (Jefferson *et al.*, 2007), la cosecha y el procesamiento pueden interferir con las concentraciones de fitoestrógenos (Kuhnle *et al.*, 2009).

### 1.7.1 CLASIFICACIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS

Los principales grupos de fitoestrógenos son las isoflavonas (genisteína, daidzeína, gliciteína), las flavonas (luteolina), los coumestanos (coumestrol), los estilbenos (resveratrol) y los lignanos (matairesinol, pinoresinol) (Jefferson *et al.*, 2012).

El grupo de fitoestrógenos más estudiado es el de las isoflavonas, donde se encuentra la genisteína y la daidzeína (Fig. 6). Estos compuestos son predominantes en la soya y otras leguminosas, por lo tanto son los compuestos fitoestrógenicos más consumidos en la dieta del ganado, de los roedores e incluso de los humanos (Cederroth *et al.*, 2012). En los últimos años se han estudiado intensamente los efectos de estos fitoestrógenos sobre la reproducción.

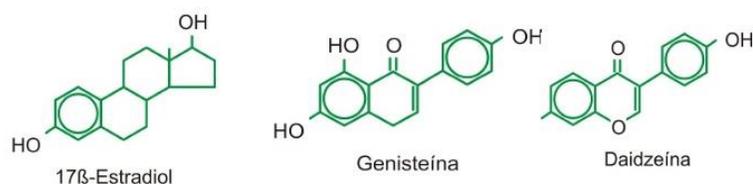


Fig. 6. Estructura y comparación molecular de isoflavonas: genisteína y daidzeína respecto al 17β estradiol (Kim *et al.*, 2012).

### 1.8 LA DAIDZEÍNA

La daidzeína pertenece al grupo de las isoflavonas. Entre los diferentes tipos de isoflavonoides derivados de la soya, la daidzeína y su forma glucosilada, es una de las más abundantes (Ohno *et al.*, 2003). Debido a que su estructura es semejante a la de los estrógenos endógenos, al igual que otras isoflavonas, tiene la capacidad de competir con el E<sub>2</sub> para unirse con el ERβ, por el cual tiene mayor afinidad (Ohno *et al.*, 2003).

Algunos de los efectos de la daidzeína sobre aspectos reproductivos en mamíferos han sido reportados tanto en hembras como en machos. En las ratas hembra pueden alterar la progresión del ciclo estral y disminuir la conducta sexual femenina (Kouki *et al.*, 2003). En el caso de ratas macho jóvenes, la daidzeína causa

disminución en los niveles de T, y en el número de erecciones (Pan *et al.*, 2008). En estudios *in vitro* realizados en células humanas de trofoblasto se demostró que la daidzeína es capaz de disminuir la concentración de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) (Jeschke *et al.*, 2005). Los efectos estrogénicos provocados por la daidzeína no solo están restringidos a mamíferos sino también en otros vertebrados; en patos jóvenes de 100 días de edad, la suplementación con daidzeína en la dieta provocó mayor peso corporal, incremento en el peso de oviductos y disminución en la tasa de puesta de huevos (Zhao *et al.*, 2005).

#### 1.8.1 EFECTOS DE LOS FITOESTRÓGENOS EN EL ORGANISMO.

Como se mencionó anteriormente, la acción biológica del E<sub>2</sub> está mediada por dos subtipos de receptores: los ER $\alpha$  y los ER $\beta$ , los cuales a su vez están distribuidos de manera diferente en los distintos órganos del sistema reproductor de machos y hembras. Por tanto, los fitoestrógenos pueden ejercer algunos efectos sobre los órganos reproductivos.

Al interactuar los fitoestrógenos con los receptores estrogénicos, pueden actuar como agonistas cuando la cantidad de estrógenos en el medio es baja y actuar como antagonistas cuando la cantidad de estrógenos en el medio es alta (Hwang *et al.*, 2006). Además los fitoestrógenos pueden activar e inhibir la respuesta del ER $\alpha$  o del ER $\beta$ , dependiendo la unión al subtipo de receptor, la supresión o la inducción de co-activadores específicos permitiendo a estos componentes inducir o inhibir la acción estrogénica (Mueller *et al.*, 2004).

En el rumen de los bovinos y ovinos, los fitoestrógenos pueden ser metabolizados a equol, el cual contribuye a los efectos estrogénicos de las isoflavonas por lo que el destino metabólico de los fitoestrógenos es de suma importancia (Adams, 1995). En algunas ocasiones, el efecto biológico de los fitoestrógenos puede deberse a los metabolitos generados en el intestino de los organismos, o de manera directa también pueden ser absorbidos y tener algún efecto biológico. Una vez absorbidas, las isoflavonas son conjugadas con ácido glucorónico en el hígado y excretadas en la orina (Sirotkin y Harrath, 2014).

La manera en la cual los fitoestrógenos entran al organismo es a través de la dieta, ya que se encuentran en muchos productos alimenticios como son algunas frutas y las plantas de la familia leguminosa. Una leguminosa que ha mostrado tener efectos estrogénicos en los animales es el mezquite.

## 1.9 EL MEZQUITE

El mezquite es una planta perteneciente al Filo Espermatofita, Subfilo Angiosperma, Clase Dicotiledónea, Familia Leguminosae, Subfamilia Mimosidae, Género *Prosopis*. Alrededor de mundo existen 44 especies de *Prosopis*, de las cuales 40 se distribuyen en el continente americano y 10 en la república mexicana. Las 10 especies de mezquite distribuidas en casi todo el territorio nacional, son: *Prosopis palmeri*, *P. reptans* var. *cineroscens*, *P. pubescens*, *P. articulata*, *P. laevigata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. glandulosa* var. *tipica*, *P. glandulosa* var. *torreyana* y *P. mexicanum* (De La Torre-Almaráz et al., 2009).

El bosque de *Prosopis* o mezquital se desarrolla principalmente en las regiones áridas y semiáridas de México, su distribución es amplia, encontrándose hasta los 2,050 msnm (metros sobre el nivel del mar) (Sauceda *et al.*, 2014).

Esta planta puede encontrarse como arbusto o árbol espinoso y puede alcanzar hasta los diez metros de altura. El sistema radicular puede tener una profundidad de hasta cincuenta metros, la corteza del tallo es de color oscuro, las hojas son compuestas, bipinadas con 12 a 15 pares de folíolos, las flores forman una inflorescencia de color amarillo y el fruto es una vaina alargada de color paja a rojo violeta (Sauceda *et al.*, 2014).

#### 1.9.1 COMPUESTOS QUÍMICOS EN EL MEZQUITE

Las vainas de mezquite contienen altas cantidades de Ca, K y Se en el pericarpio, mientras que el Mg, Fe y el Zn se encuentran principalmente en la semilla. La vaina contiene también un 17-31% de fibra cruda. El pericarpio contiene principalmente sacarosa, mientras que las semillas contienen la mayoría de la proteína. La vaina de mezquite contiene bajos niveles de aminoácidos como isoleucina y treonina, pero alto contenido en lisina. En cuanto a ácidos grasos insaturados, el ácido linoleico se encuentra en mayor cantidad y, de manera secundaria, el ácido oleico; entre los ácidos grasos saturados el principal es el ácido palmítico (Freyre *et al.*, 2010).

Algunos de los compuestos fenólicos encontrados en el mezquite y que actúan como fitoestrógenos en el mezquite son: el mezquitol, como compuesto en mayor cantidad encontrándose en el tronco y la vaina, donde las concentraciones son

aproximadamente de 6mg/L (Sirmah *et al.*, 2009); también se ha encontrado quercetina, isoharmnetina (Giannineto, 1975 ), luteolina y vitexina (Harzallah-Skhir y Ben, 2005); también se ha detectado daidzeína (5.27 µg/g) y genisteína (6.25 µg/g) en el extracto de la vaina del mezquite (González *et al*, 2015).

### 1.9.2 USOS DEL MEZQUITE

El mezquite se ha utilizado desde tiempos históricos como uno de principales recursos naturales. Es explotado por los habitantes de las regiones áridas y es utilizado como fuente de energía (leña y carbón), en la elaboración de postes para cercas, maderas de gran valor, así como alimento para consumo humano y forraje para el ganado; esta planta también es utilizada con fines medicinales, la corteza del árbol secreta un exudado conocido como goma de mezquite, que se utiliza en la industria alimentaria, las flores también son utilizadas para producir miel, es importante también en la prevención de la erosión del suelo, cumple una función relevante en los ecosistemas debido a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y generar materia orgánica que se incorpora al suelo mejorando así su fertilidad y favorece la nutrición de las plantas circundantes (Sauceda *et al.*, 2014).

En la alimentación, la harina de la vaina de mezquite es utilizada para la elaboración de postres, jarabes (Cruz, 1999), panes o incluso como sustituto de café (Cruz, 1986), el mezquite se utiliza como forraje para el ganado y en muchas ocasiones puede ser el único alimento que consumen los animales (Retana-Márquez 2012).

La disponibilidad del mezquite para su uso como forraje se ha incrementado a medida que han disminuido los suelos utilizados para pastoreo y se encuentran nuevas

plantas como alternativas alimenticias para los animales (Sawal *et al.*, 2004). El mezquite es una planta que podría reemplazar a otros alimentos como el salvado, debido a su alto contenido de carbohidratos (15%) y proteínas (12 %) (Sawal *et al.*, 2004). En la actualidad, la vaina molida y en forma de harina tiene gran demanda para la ganadería bovina. Su aprovechamiento es por medio de la recolección manual de los habitantes de la zona, durante los meses de julio a septiembre (Sauceda *et al.*, 2014).

En la actualidad, no existen datos con respecto a las cantidades exactas que consumen los humanos y el ganado y, por ser una planta ampliamente distribuida y consumida en el territorio nacional así como en otros países de los continentes Asiático y Africano (Choge *et al.*, 2007), es importante evaluar los posibles efectos estrogénicos de la vaina de mezquite en diversos aspectos de la función reproductiva.

Actualmente existen pocos estudios dedicados a evaluar los efectos estrogénicos de ciertas plantas como las leguminosas, a las cuales se les han atribuido efectos nocivos para la salud cuando se consumen en grandes cantidades. Algunos de los efectos nocivos son: alteraciones a nivel del sistema nervioso, pérdida de peso, desequilibrio en los niveles de nutrientes (William y Jafri, 2015) y alteraciones reproductivas en el caso de las ratas hembra después de la administración del extracto de vaina de mezquite (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La primera evidencia sobre los efectos que causan los fitoestrógenos en la reproducción se describió en el año de 1946, cuando se observó que las ovejas que consumían grandes cantidades de trébol rojo (*Trifolium pratense*), presentaban problemas de fertilidad (Bennets *et al.*, 1946). Los problemas de fertilidad observados en las ovejas eran temporales o permanentes (Adams, 1995). Dichos efectos se atribuyeron a los altos niveles de formonetina, una isoflavona, encontrada en esta planta. Posteriormente se reportaron otros efectos sobre la fisiología reproductiva de las ovejas relacionados con el consumo de plantas con compuestos fitoestrógenicos, entre los que se encontraron: quistes ováricos, problemas de comportamiento sexual y estros irregulares (Adams, 1995).

Los efectos de los alimentos con contenido fitoestrogénico sobre la fertilidad no son exclusivos de ovejas, ya que se han reportado efectos negativos en el ganado vacuno (Kallela *et al.*, 1984; Romero R *et al.*, 1997) y en animales de laboratorio tanto en hembras como en machos (Cardoso y Báó, 2007; Gallo *et al.*, 1999; Jefferson *et al.*, 2012).

### 2.2 FITOESTRÓGENOS EN LAS HEMBRAS

Con respecto a la importancia de los estrógenos sobre la fisiología reproductiva de las hembras y el papel de los fitoestrógenos para inducir respuestas estrogénicas, los estudios realizados para analizar los efectos producidos por dichos compuestos, han dado lugar a distintos experimentos con animales de laboratorio. Recientemente,

se han reportado datos relacionados con los posibles efectos negativos de los fitoestrógenos durante el desarrollo sexual como: el inicio prematuro de la pubertad, reducción de la fertilidad, alteraciones en el ciclo estral y en la función ovárica, así como alteraciones en la capacidad de respuesta hipofisaria provocando efectos adversos en la liberación de FSH y LH (Patisaul y Jefferson, 2010).

Los efectos producidos por el consumo de fitoestrógenos pueden variar dependiendo de su administración o consumo durante etapas específicas del desarrollo. Por ejemplo, los roedores expuestos a genisteína durante el período neonatal muestran alteraciones en el ciclo estral, lo que sugiere que esta isoflavona provoca alteraciones en las estructuras involucradas en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) en esta etapa sensible del desarrollo, por lo que puede estar influyendo en el aumento o la disminución en la liberación de GnRH (Kim y Park, 2012).

Asimismo, se ha observado que el útero y la vagina son órganos sensibles a la acción de estos compuestos fitoestrogénicos durante las primeras etapas del desarrollo. La exposición de ratas gestantes a la genisteína (50 mg/día) a partir del día 17 gestacional hasta el día 21 post-parto, tiene un efecto marcado sobre la estructura y función de los órganos reproductivos, causando disminución de los pesos ováricos y uterinos. Si la dieta con genisteína se prolonga hasta el día 70 postparto, se observan formaciones de quistes ováricos (Awoniyi *et al.*, 1998).

En los ratones la exposición crónica a dietas con alta concentración de isoflavonas (mezcla de daidzeína y genisteína en concentración de 500 µg/g) durante la gestación, la lactancia y hasta el día 21 postnatal induce pubertad precoz,

aceleramiento de la apertura vaginal y un incremento en el número de folículos multiovocitos (MOFs) (Takashima-Sasaki *et al.*, 2006). Los efectos evaluados después de la administración neonatal de dos tipos de isoflavonas, no son sólo morfológicos sino funcionales. El tratamiento neonatal por cinco días con genisteína (1 mg) o E<sub>2</sub> (100 µg) provoca apertura vaginal temprana, estros persistentes o prolongados, además de un LQ más bajo que el grupo control pero más alto que el grupo E<sub>2</sub> cuyo LQ era el más bajo (Kouki *et al.*, 2003).

Los fitoestrógenos administrados durante la etapa adulta también generan efectos estrogénicos. En ratas adultas ovariectomizadas en las que se administraron diferentes dosis de genisteína (5.4 y 54 mg/kg) y E<sub>2</sub> (0.17 y 0.7 mg/kg) durante tres meses, se observó que el E<sub>2</sub> y la genisteína en alta concentración inducen un aumento en el peso del útero, provocó diferencias en los pesos corporales y además en el análisis histológico se mostró hiperplasia e hipertrofia en el epitelio uterino de las ratas tratadas con E<sub>2</sub>. En las glándulas mamarias se observó que altas concentraciones de E<sub>2</sub> y genisteína incrementan la proliferación celular y la expresión de receptores a P<sub>4</sub> (PRs), mientras que los niveles de LH disminuyen por efecto del E<sub>2</sub>, pero no cambian por efecto de la genisteína (Rimoldi *et al.*, 2007).

La exposición a compuestos fitoestrogénicos en algunas leguminosas se han estudiado tanto en roedores de laboratorio como en hembras de ganado bovino. Todas han mostrado ser susceptibles a los efectos estrogénicos generados por el consumo de esas plantas. En un grupo de 608 vacas alimentadas con alfalfa contaminada por el hongo *Pseudopeziza medicaginis*, a las cuales se les realizaron 1264 inseminaciones durante un año, únicamente el 30% de las vacas quedaron preñadas;

aunado a esto, se observó un incremento en el porcentaje de abortos (Romero *et al.*, 1997).

### 2.3 FITOESTRÓGENOS EN LOS MACHOS.

El E<sub>2</sub> es esencial para el desarrollo, el mantenimiento y la función del sistema reproductivo en los machos; por lo tanto, la administración o privación de E<sub>2</sub>, ya sea durante el desarrollo o en la etapa adulta puede causar cambios estructurales y funcionales en el sistema reproductor. Dichos efectos han sido observados con la administración neonatal de E<sub>2</sub> en ratas macho, en los cuales causa disminución en la concentración espermática, en el número de células de Sertoli, alteraciones en la morfología testicular y disminución en la concentración de T, así como distensión de los túbulos de la rete-testis, reducción de la altura del epitelio de los conductos eferentes y del epidídimo, lo cual causa infertilidad (Glover y Assinder, 2006).

Por otro lado, en ratas macho juveniles la administración de tres dosis de daidzeína (2, 20 y 100 mg/kg) durante noventa días consecutivos, provocó disminución en los niveles de T y un menor número de erecciones (Pan *et al.*, 2008). En otro estudio, las ratas macho que fueron alimentados con una dieta que contenía soya mostraron un incremento en las concentraciones plasmáticas de FSH, una disminución en el peso testicular y corporal comparados con los machos alimentados con una dieta libre de soya (Atanassova *et al.*, 2000).

Además, los efectos en ratones machos descendientes de hembras expuestas a la administración de fitoestrógenos durante la gestación, las cuales fueron alimentadas con una dieta rica en soya que contenía 22–26 mg/kg/día de genisteína y

22–26 mg/kg/día de daidzeína, desde la concepción hasta la etapa adulta provocaron menor concentración espermática, menor número de células germinales y reducción del tamaño de la camada ( Cederroth *et al.*, 2010).

Asimismo, ratas con altas concentraciones de fitoestrógenos en la dieta (225 µg/g de genisteína, 180 µg/g de daidzeína y 60 µg/g de gliciteína) presentan baja concentración espermática, reducción de volumen del núcleo de las espermátidas redondas y alargadas, además de provocar un incremento en el número de espermatoцитos y espermátidas redondas con apoptosis (Assinder *et al.*, 2007).

También, se ha observado que los conejos alimentados con una dosis de 20 mg/kg/día de soya adicional a la dieta normal de soya y alfalfa, reducen la ingesta de comida, provocando una disminución del peso corporal y el volumen del semen. Sin embargo, no se han reportado cambios significativos en la morfología de órganos genitales y el comportamiento sexual (Cardoso y Báo, 2007). Además, la administración crónica de daidzeína por 12 semanas en conejos adultos altera la función eréctil (Srilatha y Adaikan, 2004).

Los efectos producidos por los fitoestrógenos en el ciclo estral, en el peso de los órganos reproductivos y en la conducta sexual en hembras y machos demuestra que estos compuestos pueden afectar la biosíntesis de hormonas esteroideas, a través de inhibir la acción de enzimas como la P450Arom y la 5α- reductasa (Cederroth *et al.*, 2012). También pueden alterar los niveles de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), debido a que en estudios *in vitro* se ha mostrado que los fitoestrógenos son capaces de desplazar a la T y al E<sub>2</sub> de los sitios de unión de SHBG.

Todos estos efectos demuestran la capacidad que tienen los fitoestrógenos para alterar el sistema endocrino de la reproducción.

#### 2.4 EFECTO DEL EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN LA REPRODUCCIÓN DE LAS HEMBRAS.

Pocos estudios han demostrado que la administración del extracto de la vaina de mezquite ejerce efectos en algunos aspectos reproductivos. En un estudio se observó que el extracto de la vaina de mezquite administrado a ratas durante la etapa neonatal altera el ciclo estral y causa apertura vaginal temprana, dichos efectos son considerados como estrogénicos (Carrasco *et al.*, 2010). En otro estudio realizado en ratas hembra adultas intactas u ovariectomizadas se evaluaron los efectos producidos por el extracto de vaina de mezquite comparando sus efectos con los efectos provocados por dos isoflavonas (genisteína y daidzeína) y los efectos provocados por el E<sub>2</sub>. Los resultados mostraron que las hembras intactas tratadas con vaina de mezquite presentaron ciclos estrales alterados, una disminución en el cociente de lordosis y un incremento en el peso de los órganos reproductivos, comparadas con las hembras control. En las hembras ovariectomizadas, el extracto de vaina de mezquite, la daidzeína y la genisteína fueron capaces de inducir estros y metaestros prolongados (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

#### 2.5 EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN LA REPRODUCCIÓN DE LOS MACHOS

Los efectos del extracto de la vaina de mezquite sobre la reproducción en los machos se ha observado en un estudio donde se evaluaron los efectos de la

administración de genisteína, daidzeína, extracto de *Leucaena* y extracto de la vaina de mezquite comparando los efectos de cada uno de los tratamientos con los efectos producidos por la administración de E<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos en ese trabajo muestran que la genisteína, la daidzeína y el extracto de vaina de mezquite provocan alteraciones en el comportamiento sexual masculino, incremento en el número de células germinales apoptóticas y, al mismo tiempo, se observó una disminución significativa en la calidad espermática, en el peso testicular y en la concentración plasmática de T (Retana-Márquez *et al.*, 2016).

El mezquite está siendo utilizado como parte de la dieta del ganado y en ocasiones como único alimento, debido a su alto contenido nutrimental y su disponibilidad aún en tiempo de sequía, es claro que se necesitan más estudios relacionados con los posibles efectos estrogenizantes que el mezquite podría provocar sobre la reproducción de las especies.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La alimentación es parte fundamental para el desarrollo. Los animales forrajeros y las personas que adoptan una dieta vegetariana dependen en gran medida de alimentos naturales que contienen nutrientes que pueden ser aprovechados, pero también compuestos no nutritivos que pueden tener efectos negativos sobre la salud. Algunos de estos compuestos son los fitoestrógenos, los cuales al ser consumidos han mostrado tener efectos dañinos en varios aspectos reproductivos en animales silvestres, domésticos y de laboratorio. Algunos de los efectos negativos reportados son: problemas de fertilidad, alteraciones en el ciclo estral, quistes ováricos, endometriosis y otros.

Uno de los principales grupos de plantas que contienen grandes cantidades de fitoestrógenos son las leguminosas. El mezquite es una leguminosa que ha mostrado provocar efectos estrogénicos dañinos en modelos animales experimentales. Además también se ha observado de manera empírica que cuando las cabras gestantes consumen grandes cantidades de vaina de mezquite, abortan.

Tomando en consideración que en las regiones áridas y semiáridas del país, se utiliza la vaina de mezquite como alternativa de alimentación para el ganado debido a la escasez de alimento en época de sequía, este tipo de estudios deben ser realizados con el fin de determinar si el consumo de mezquite al ser utilizado como forraje o alimento humano puede resultar contraproducente en la reproducción de organismos de importancia económica como el ganado o incluso en el humano.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que los estudios realizados en laboratorio han mostrado el potencial estrogénico del mezquite, es importante ampliar la información de la actividad estrogénica de esta planta y sus efectos en la reproducción animal.

Por ser la vaina de esta leguminosa la que se consume por los animales, en el presente trabajo se obtendrá el extracto de esta vaina y se evaluará su efecto en diversos aspectos de la fisiología reproductiva de la rata. Dichos efectos se compararán con los efectos estrogenizantes observados con un compuesto fitoestrogénico conocido como la daidzeína, que ha mostrado tener efectos negativos sobre la reproducción en ratas hembras y machos. Además si consideramos que la daidzeína y otros compuestos fitoestrogénicos están contenidos en el extracto de la vaina de mezquite, también es

necesario comparar el efecto de este extracto con los provocados por el E<sub>2</sub>, que es el estrógeno endógeno natural que induce los mayores efectos observados en la reproducción.

Los efectos que se presenten en la reproducción de los animales experimentales tratados con el extracto de la vaina de mezquite podrían demostrar su importancia en el control para el consumo de esta leguminosa.

## **5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué efectos causará el extracto de la vaina de mezquite (*Prosopis juliflora*) sobre la fertilidad reproductiva de ratas hembras y machos? ¿Dichos efectos serán similares a los provocados por la daidzeína y el E<sub>2</sub>?

## **6. HIPÓTESIS**

El extracto de la vaina de mezquite causa efectos negativos en la fisiología reproductiva de las ratas hembras y machos afectando en consecuencia la fertilidad, de una manera similar a los efectos provocados por la daidzeína y el E<sub>2</sub>.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos del extracto de la vaina de mezquite sobre algunos parámetros reproductivos de la rata.

### **7.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluar los efectos del extracto de la vaina de mezquite sobre la conducta sexual, los órganos reproductivos y la fertilidad en la rata hembra adulta.

Evaluar los efectos del extracto de la vaina de mezquite sobre la conducta sexual, los órganos reproductivos y la fertilidad en la rata macho adulta.

Comparar los efectos producidos por el extracto de la vaina de mezquite con los efectos del fitoestrógeno daidzeína y el E<sub>2</sub> en la reproducción de las ratas machos y hembras.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

Todos los procedimientos experimentales utilizados en este estudio están apegados a los lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (2010), y se ajustaron a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### **8.1 OBTENCIÓN Y MANEJO DE ANIMALES**

Se utilizaron 40 ratas macho y 160 ratas hembras de la cepa Wistar, con un peso de 250 a 300 g y con 3 meses de edad, obtenidas en las instalaciones del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa. Los animales (n=10) se distribuyeron y mantuvieron confinados en cajas de acrílico (50x30x20 cm), bajo condiciones de temperatura controlada (23±1°C) y un ciclo de luz-obscuridad invertido 12:12 (la luz se apagó a las 10:00 am). El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

### **8.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE VAINA DE MEZQUITE**

La vaina de mezquite se recolectó en la Huasteca Hidalguense. La vaina madura se seleccionó en el laboratorio y se secó en un horno a 60° C durante 24

horas, posteriormente se molió entera (vainas y semillas) en un molino. De 2.0 kg de vaina molida se preparó un extracto total hasta agotamiento en extractores tipo Soxhlet con una mezcla de etanol/agua 4:1 v/v. El etanol del extracto fue retirado por destilación entre 78°C y 87°C.

### 8.3 SELECCIÓN DE MACHOS SEXUALMENTE EXPERTOS

Antes de iniciar la administración de los tratamientos, los machos se entrenaron sexualmente en tres sesiones semanales utilizando hembras receptoras ovariectomizadas, tratadas previamente con E<sub>2</sub> (10 µg) y P<sub>4</sub> (2 mg), aquellos machos que realizaron al menos 3 eyaculaciones durante los treinta minutos de cada prueba, fueron seleccionados como machos sexualmente expertos y fueron utilizados para llevar a cabo este proyecto.

### 8.4 FORMACIÓN DE GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS

Las ratas, hembras y machos, se asignaron de manera aleatoria a uno de los cuatro grupos experimentales: 1) Vehículo: control negativo o testigo (CON); 2) Extracto crudo de vaina de mezquite (MEZ); 3) Daidzeína: control positivo de un compuesto fitoestrogénico (DAI); y 4) Estradiol: control positivo de la hormona endógena (E<sub>2</sub>). Para los machos la n=10 en cada grupo y para las hembras la n= 40 en cada grupo.

Inmediatamente se registró el peso corporal de todos los animales de cada grupo experimental.

Los tratamientos experimentales se administraron a machos y hembras por vía subcutánea durante 30 días consecutivos. Esta vía de administración se seleccionó

debido a que la administración oral a través de una sonda orogástrica puede generar estrés a los animales. Además se consideró que los otros tratamientos, DAI y E<sub>2</sub> se realizan de forma frecuente por esta vía, y la administración de fitoestrógenos por vía subcutánea produce efectos semejantes a los provocados por la administración de fitoestrógenos de manera oral (Jefferson *et al.*, 2005). Con base a estos criterios se decidió en este estudio homogeneizar la vía de administración para evitar una variable más en el estudio experimental.

#### DOSIS UTILIZADAS EN CADA GRUPO EXPERIMENTAL

- 1) Grupo CON: aceite vegetal, 0.2 mL/día.
- 2) Grupo MEZ: 1g de MEZ/0.2 mL/día. Dosis equivalente al consumo diario de mezquite en borregos, que es de 3.5 g/kg/día (Retana-Márquez *et al.*, 2012).
- 3) Grupo DAI (Sigma, pureza >97%): 1.6 mg/0.2mL de aceite vegetal/día. Dosis utilizada en otros estudios y que se ha reportado produce efectos reproductivos, tales como disminución de niveles hormonales y respuesta eréctil en macho (Pan *et al.*, 2008), así como alteraciones en el ciclo estral de las ratas hembras (Retana-Márquez *et al.*, 2012).
- 4) Grupo E<sub>2</sub> (Sigma, pureza >98%): 10 µg/0.2 mL de aceite vegetal/día. Dosis que induce el comportamiento receptivo en ratas hembras (Retana-Márquez *et al.*, 2012) y causa atrofia testicular en las ratas machos.

## 8.5 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS EN LAS HEMBRAS

### 8.5.1 EVALUACION DEL CICLO ESTRAL

Para la evaluación del ciclo estral de la rata se realizaron frotis vaginales diariamente durante el tratamiento experimental, para ello, se utilizó un asa bacteriológica de metal previamente embebida en solución salina al 0.9% (NaCl 0.9%), la cual se introdujo en la vagina de cada hembra. Las muestras obtenidas se colocaron en un portaobjetos para su tinción con hematoxilina-eosina (H&E).

Tinción hematoxilina & eosina

El procedimiento y tiempo utilizado para la tinción fue el siguiente:

- La laminilla se colocó 15 minutos en colorante hematoxilina y se lavó con agua destilada.
- Posteriormente, se colocó 5 minutos en colorante eosina y se lavó con agua destilada. Enseguida se colocaron durante 3 minutos en alcohol etílico absoluto.
- Después las muestras se dejaron secar y se colocó resina sintética en xilol al 60%.
- Inmediatamente cada muestra se cubrió con un cubreobjetos.
- Finalmente, los frotis fueron observadas al microscopio óptico (OLYMPUS CX41), con el objetivo 40x para determinar la etapa del ciclo estral, según los tipos celulares observados en la Figura 7.

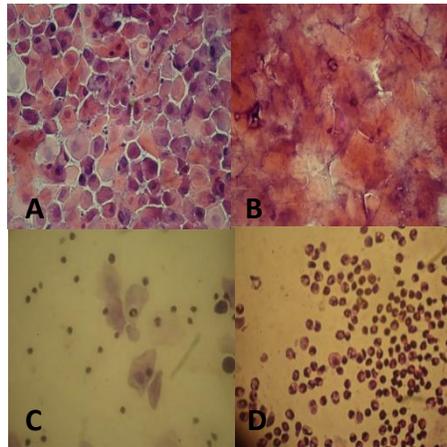


Fig. 7. Se muestra el tipo de células observadas en los frotis vaginales. A) Proestro: presencia de células nucleadas en un 80-100%; B) Estro: presencia de células epiteliales queratinizadas con forma cornificada y sin núcleo en un 80-100%; C) metaestro: presencia de 50 % de células cornificadas y 50% leucocitos; D) diestro: presencia de leucocitos en un 80-100%.

#### 8.5.2 CONDUCTA SEXUAL FEMENINA

La conducta sexual en la hembra se evaluó al finalizar los treinta días de tratamiento. Para ello, las hembras en etapa de proestro, se colocaron en un redondel de plexiglass (40x40x50 cm) con un macho experimental sexualmente activo y se registraron los siguientes parámetros:

**Proceptividad:** consistió en identificar la presencia de los patrones conductuales estereotipados como orejeo, brincos y arrancones dirigidos hacia el macho.

**Receptividad:** se consideró la conducta de lordosis la cual ha sido utilizada como un indicador de receptividad sexual.

**Cociente Lordótico:** se evaluó utilizando a los machos sexualmente expertos, los cuales realizaron 10 montas consecutivas y se cuantificó el número de veces que las hembras presentaron lordosis.

Este cociente se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$LQ = (\# \text{ lordosis} / \# \text{ montas}) \times 100$$

**Intensidad de la lordosis:** Se cuantificó de acuerdo a la clasificación de Erskine, *et al*, 2004, donde se evalúa el grado de flexión del dorso y el grado en que la cresta sagital de la cabeza se alinea en un plano vertical. La calificación se basa en una escala de no flexión dorsal vertebral (0), leve flexión dorsal junto con un ligero movimiento de la cabeza hacia el plano vertical (1), flexión dorsal moderada y acoplada con el movimiento vertical de la cabeza (2) y la flexión dorsal extrema junto con el movimiento vertical de la cabeza (3).

### 8.5.3 CRUZAMIENTOS DE HEMBRAS

Una vez concluido el tratamiento, y después de la evaluación de la conducta sexual de la hembra, cada hembra copuló con los machos experimentales para obtener hembras gestantes. La Fig. 8 muestra el diseño experimental para este propósito.

	n=10 ♀	n=10 ♀	n=10 ♀	n=10 ♀
♂	CON/CON	MEZ/CON	DAI/CON	E <sub>2</sub> /CON
♂	CON/MEZ	MEZ/MEZ	DAI/MEZ	E <sub>2</sub> /MEZ
♂	CON/DAI	MEZ/DAI	DAI/DAI	E <sub>2</sub> /DAI
♂	CON/E <sub>2</sub>	MEZ/ E <sub>2</sub>	DAI/ E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> /E <sub>2</sub>

Fig 8. Se muestran las combinaciones de cruizas entre machos y hembras experimentales para evaluar la fertilidad masculina y femenina.

Después del apareamiento, cada hembra fue alojada en una caja individual y 2 semanas después se registró el número de hembras que quedaron gestantes. Al término del periodo gestacional se registró el número de crías por grupo experimental de cada una de las cruas.

#### 8.5.4 OBTENCIÓN DE ÓRGANOS SEXUALES

Una vez que se realizó el destete de las crías (21 días), las hembras se sacrificaron en etapa de proestro (n=3) y en etapa de diestro (n=3), para ello, el animal fue anestesiado, con una dosis de pentobarbital sódico (25 mg/kg) administrada por vía intraperitoneal y enseguida se obtuvo el peso corporal final de cada hembra. Posteriormente se realizó una incisión longitudinal ventral para la toma de una muestra de 3 mL de sangre por punción cardíaca, enseguida se disectaron los ovarios, el útero y la vagina, al término se registró el peso de cada órgano y se colocaron en paraformaldehído al 4% (Sigma-ALDRICH, Germany) donde se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 24 horas. Posteriormente los tejidos fueron procesados para su inclusión en parafina.

### 8.6 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE LOS MACHOS

#### 8.6.1 CONDUCTA SEXUAL MASCULINA

La evaluación de la conducta sexual del macho se realizó durante los días 10, 20 y 30 del tratamiento. La prueba consistió en someter a cada macho en presencia de hembras ovariectomizadas, pre-tratadas 24h antes con E<sub>2</sub> (10 µg) y con P<sub>4</sub> (2 mg) 4 h antes de la prueba. Las pruebas se realizaron en la fase oscura y con luz roja. Cada macho fue colocado en un redondel de acrílico de 40 X 40 X 50 cm y se dejó un

periodo de habituación de 5 minutos, posteriormente se introdujo a la hembra receptiva y se les permitió copular durante 30 minutos.

Durante la prueba se evaluaron los siguientes parámetros:

**Latencia de monta (LM):** Tiempo que tarda el macho en realizar una monta desde que se coloca la hembra receptiva.

**Latencia de intromisión (LI):** Tiempo que tarda el macho en realizar una intromisión.

**Latencia de eyaculación (LE):** Tiempo que tarda el macho en realizar una eyaculación después de la primera intromisión.

**Número de montas (NM):** Número de montas realizadas antes de cada eyaculación.

**Numero de eyaculaciones (NE):** Número de eyaculaciones que presentan los machos durante el periodo de prueba.

**Intervalo posteyaculatorio (IP):** Tiempo que tarda el macho en reanudar la conducta sexual después la última eyaculación.

#### 8.6.2 OBTENCIÓN DE LOS ÓRGANOS SEXUALES MASCULINOS

Al finalizar las pruebas de conducta sexual masculina, cada macho se anestesió con pentobarbital sódico (25 mg/kg de peso corporal) administrado por vía intraperitoneal. Una vez anestesiados, se registró el peso corporal e inmediatamente se realizó una incisión en la línea media ventral del abdomen y se disectaron y pesaron las glándulas sexuales accesorias (próstata y vesículas seminales), así como los testículos y el epidídimo. Un testículo de tres machos de cada grupo experimental se perfundió a través de la arteria testicular con solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS: NaCl 137mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.03 mM y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.47 mM) y

con paraformaldehído al 4% (Sigma- Aldrich, Germany). Enseguida se colocaron en un vial que contenía la solución fijadora y se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Posteriormente, los testículos se cortaron de manera transversal en su parte media y se volvieron a introducir en paraformaldehído al 4% donde se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Al día siguiente, se realizaron varios lavados con PBS, para eliminar el exceso de solución fijadora. Enseguida se lavaron tres veces con alcohol al 70% y se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Antes del deceso del animal se obtuvieron de 3 a 4 mL de sangre por punción cardiaca para su posterior análisis hormonal.

En el caso del epidídimo, se pesó y se utilizó inmediatamente después de su disección para realizar las pruebas de análisis espermático.

### 8.6.3 ANÁLISIS ESPERMÁTICO

Para el análisis espermático fue necesario obtener los espermatozoides de la cauda de epidídimo. La cauda del epidídimo se colocó en un vaso de precipitado que contenía 1mL de PBS a una temperatura de 37° C, se realizó un pequeño corte con unas tijeras de disección de punta fina e inmediatamente se liberaron los espermatozoides, los cuales se homogeneizaron libremente en la solución de PBS, para su inmediato análisis. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

**Movilidad:** se colocaron 10  $\mu$ L de la muestra de espermatozoides sobre un portaobjetos, y se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjetos. Las laminillas fueron analizadas en el microscopio de luz con el objetivo 40x para registrar el número de espermatozoides que presentaron movilidad progresiva y el número de

espermatozoides inmóviles. El número total de espermatozoides contados por cada rata fue de 200.

**Viabilidad:** para evaluar la cantidad de espermatozoides vivos y muertos, se colocaron 10 µL de muestra de la suspensión de espermatozoides, más 10 µL de colorante eosina-nigrosina (1% eosina, 5% nigrosina y 2.9% de citrato de sodio disueltos en 100 mL de agua) en un portaobjetos, posteriormente, se colocó el cubreobjetos y se observaron en el microscopio con el objetivo de 40x. Los espermatozoides no teñidos se consideraron vivos y los espermatozoides teñidos de color rojo se consideraron muertos. Se contaron 200 espermatozoides por cada muestra.

**Concentración:** para conocer el número de espermatozoides presentes en la muestra se colocaron 500 µL de agua destilada en un tubo de micro-centrifuga más 25 µL de la muestra de espermatozoides (dilución 1:21), se homogenizó la mezcla y posteriormente se colocaron 10 µL de la muestra diluida en cada uno de los dos extremos de la cámara de Neubauer (Neubauer-improved, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany), inmediatamente se observaron en el microscopio de luz con el objetivo 20x. El análisis se realizó contando solo los espermatozoides que se encontraban dentro de 8 subcuadros específicos.

La concentración espermática se calculó a partir de esta siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides contados} \times \text{N}^{\circ} \text{ de subcuadros (8)} \times \text{factor de dilución (21)} \times \frac{10000}{2}$$

**Morfología:** se colocaron 10 µL de la suspensión en el portaobjetos y se cubrieron mediante un cubreobjetos, esta muestra fue observada en el microscopio con el objetivo 40x y se evaluaron 200 espermatozoides, en los cuales se registró el número

de espermatozoides con estructura normal en cabeza, cuello, segmento intermedio y cola, también se registró el número de espermatozoides que presentaron anomalías.

## 8.7 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS REPRODUCTIVOS

El útero, la vagina y el testículo una vez fijados en paraformaldehído se procesaron para ser incluidos en parafina. En breve, cada tejido en paraformaldehído se lavó con PBS para eliminar el fijador, luego se colocó en alcohol al 70 % durante 24 horas y posteriormente se procedió a colocar los tejidos en un histoquinet (Leica, TO 1020, Leica Biosystem Richmond, Inc. USA). La serie de alcoholes y xilenos se colocó en orden y tiempo como se indica en la tabla 1.

<b>Compuesto</b>	<b>Volumen (L) /Tiempo</b>
Alcohol 80%	1.5 /1.5 hrs
Alcohol 96%	1.5 /1.5 hrs
Alcohol 96%	1.5 /1.5 hrs
Alcohol 96%	1.5 /1.5 hrs
Alcohol absoluto	1.5 /1 hrs
Alcohol absoluto	1.5 /1 hrs
Alcohol absoluto-xiliol	1.5 /1hrs
Xileno I	1.5 /1hrs
Xileno II	1.5 /1hrs
Parafina I	1.5 /2hrs
Parafina I	1.5 /2hrs

Tabla 1. Reactivos y tiempo utilizado para el procesamiento histológico.

Al día siguiente, los tejidos fueron embebidos en Paraplast-plus (McCormick™ Scientific, Leica Biosystems Richmond, Inc. USA) para formar bloques, los cuales se dejaron enfriar durante 24 horas.

## 8.8 CORTES HISTOLÓGICOS

Con cada uno de los bloques, se realizaron cortes transversales de 5 µm de grosor con un micrótopo de rotación (Leica microtome, Leica Biosystem Richmond, Inc.USA). Cada corte se colocó en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina (poli-L- Lysine Hidrobromide, Sigma Aldrich, Ind., USA).

Los cortes de útero, vagina y testículo se realizaron de forma transversal en diferentes segmentos del tejido, para obtener cortes representativos en diferentes niveles de cada órgano.

## 8.9 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTORES FEMENINOS

Para el estudio histológico del útero y la vagina se realizó la tinción de hematoxilina eosina (H&E). Cada corte de tejido de 5 µm de grosor fue desparafinado y rehidratado de acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio. Las laminillas se colocaron en una estufa a una temperatura de 60°C, durante una hora. Posteriormente, se realizaron lavados en las soluciones siguientes: xilol I (6 min), xilol II (6 min), xilol-OH (6 min), alcohol etílico absoluto al 100% (5 min), alcohol etílico absoluto II al 100 % (5 min), alcohol-éter (3 min), alcohol al 96 % (3 min), alcohol al 80% (3min), alcohol al 70% (3 min), enseguida se realizó un lavado con agua destilada y después se colocaron en hematoxilina de Harris (Hycel de México, S,A de C.V) durante 6 min. Al

terminar, se realizó un lavado con agua de la llave e inmediatamente se colocaron en alcohol- ácido clorhídrico (OH-HCl) durante 1 seg y se lavaron con agua destilada; los tejidos se mantuvieron en solución Scott durante 10 min y, posteriormente, se lavaron con agua destilada. Enseguida, se colocaron en eosina (Sigma Aldrich, USA) durante 4 min, al terminar se realizó un lavado con agua destilada y, enseguida se realizaron lavados con concentraciones ascendentes de etanol: en concentración de 96%, alcohol absoluto I (100%), alcohol absoluto II (100%) y, finalmente, se realizaron dos lavados con xilol-OH y xilol de 2 minutos cada uno.

Las laminillas fueron montadas con resina sintética (Hycel de México, S,A de C.V) cubriéndolas con xilol al 60%, se colocó un cubreobjetos, para su evaluación histológica en el microscopio.

#### 8.10 MEDICIÓN DE LA ALTURA DEL EPITELIO VAGINAL Y UTERINO

Para evaluar las alturas de los epitelios vaginales y uterinos se seleccionaron cortes de vagina y útero de 3 ratas diferentes en las etapas proestro y diestro del ciclo estral, por cada grupo experimental. Posteriormente, se colocaron las laminillas en el microscopio de luz (OLYMPUS CX41) con el objetivo de 40x y se analizaron con la cámara (*AmScope 3.7 Microscope Camera*), la altura de los epitelios se determinó mediante el software (*AmScope 3.7*) y se seleccionó la altura del epitelio vaginal y uterino de treinta sitios distintos por cada corte evaluado.

## 8.11 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TESTÍCULOS

El análisis de la muerte celular en el testículo se realizó con la técnica de TUNEL (Terminal deoxinucleotide transferase-mediated deoxy-UTP nick end-labeling) utilizando para ello un kit comercial (In-Situ Cell Detection, POD kit, Roche, Germany)

Como primer paso los cortes de testículos obtenidos en el micrótopo de un grosor de 5  $\mu\text{m}$ , fueron desparafinados de acuerdo con el protocolo estándar establecido en el laboratorio. Se colocaron las laminillas en una estufa a 60°C durante una hora. Posteriormente se colocaron las laminillas en baños de xilol I, xilol II durante 5 min cada uno y con OH-xilol durante 6 min. Enseguida se hidrataron los tejidos con concentraciones decrecientes de alcohol etílico durante 3 min, en el orden siguiente (100%, 96%, 80% y 70%). Al finalizar los tejidos fueron lavados con PBS y se mantuvieron en la solución amortiguadora hasta el inicio de la prueba. Antes de iniciar la prueba, los tejidos fueron delimitados en el portaobjetos con un lápiz punta diamante. Inmediatamente los tejidos fueron tratados con 50  $\mu\text{l}$  de proteínasa K (Proteinase K, recombinant PCR Grade, Roche, Germany) a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disuelta en Tris-HCl 10 mM/ EDTA 0.1mM y pH= 8.0. Las lamillas se colocaron en una cámara oscura húmeda y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Al finalizar, se realizaron dos lavados con PBS durante 5 minutos cada uno.

Enseguida, los tejidos se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de solución de permeabilización (Triton X-100 0.1% disuelto en citrato de sodio 0.1%) a 4°C durante 5 min. Al finalizar, se lavaron con PBS durante 5 minutos.

Posteriormente, los tejidos fueron tratados con 25  $\mu\text{l}$  de una mezcla compuesta por la enzima desoxinucleotidil transferasa- (TdT) y trifosfato de dideoxiuridina con

fluoresceína no radiactiva-dUTP (dilución 1:10) y, se incubaron a 37°C durante 60 minutos dentro de una cámara oscura húmeda. Al finalizar, se realizaron lavados con PBS.

Para la conversión en campo claro, los tejidos fueron tratados con 50 µl de convertidor POD (Converter POD- HRP) y fueron incubados a 37°C durante 30 min dentro de una cámara oscura- húmeda. Posteriormente los tejidos se lavaron 2 veces con PBS y se colocaron 50 µl de DAB (3-3´Diaminobenzidine tetrahydrochloride) a una concentración de 0.05%, durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos, se lavaron tres veces con PBS. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina durante 4 min, se lavaron y se cubrieron con una solución de glicerol/PBS en concentración 1:1, se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjetos y se dejaron secar. Las laminillas fueron analizadas con el microscopio óptico con el objetivo 40x. Las células positivas a TUNEL se caracterizaron por presentar una coloración café intensa.

## 8.12 EVALUACIÓN HORMONAL

La sangre obtenida por punción cardiaca se depositó en tubos de ensayo e inmediatamente fue centrifugada a 2500 rpm durante 20 min, para obtener el suero. Las muestras de suero se almacenaron a -20 °C hasta su determinación hormonal mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay). Se utilizaron los siguientes estuches comerciales: Kit DRG Estradiol ELISA (EIA 2693), Kit DRG Progesterona ELISA (EIA1561) y Kit DRG Testosterona ELISA (EIA1559). En breve, en cada pozo de la placa se colocaron por duplicado 25µl de cada una de las

soluciones estándar (incluidas en el kit), en los siguientes pozos se colocaron 25µl de la muestra de suero de cada grupo experimental y se adicionó la solución enzima conjugado (200 µl en el caso de P<sub>4</sub> y T y 100 µl en el caso de E<sub>2</sub>), inmediatamente se homogenizaron la mezclas durante 10 seg y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante el tiempo que se indica para cada hormona (90 min para E<sub>2</sub> y 60 min para P<sub>4</sub> y T). Una vez que terminó el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados a cada pocillo de la placa con solución de lavado, incluida en el Kit, posteriormente se sacudió la placa y se adicionó la solución sustrato incluida en el Kit de acuerdo a la cantidad que se indicaba para cada hormona (200 µl para P<sub>4</sub> y T, 100 µl para E<sub>2</sub>) y se dejaron incubar a temperatura ambiente (15 min P<sub>4</sub> y T, 30 min para E<sub>2</sub>). Finalmente se colocó la solución stop para detener la reacción enzimática (100 µl para P<sub>4</sub> y T, 50 µl para E<sub>2</sub>). Al finalizar, las muestras se analizaron en un lector de ELISA (Bio Tek, Epoch) en un rango de absorbancia de 450 nm, los datos de absorbancia obtenidos fueron introducidos a un software (Gen5 software versión 1.10) para obtener la concentración hormonal de cada muestra.

### 8.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M) y se analizaron con el programa estadístico GraphPad prism 5.

Los pesos corporales y los pesos de los órganos sexuales, las concentraciones hormonales, los parámetros conductuales masculinos y femeninos, las alturas epiteliales y la calidad espermática se evaluaron con una ANOVA de una vía, seguidas de la prueba post-hoc de Newman-Keuls.

Los porcentajes de fertilidad se evaluaron mediante una Chi-cuadrada.

El nivel de significancia se fijó en  $p < 0.05$ .

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 EFECTO DEL EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN HEMBRAS**

#### **9.1.1 CICLO ESTRAL**

El patrón representativo del ciclo estral en los diferentes grupos experimentales, se muestra en la Fig 9. Cada etapa se evaluó diariamente mediante el frotis vaginal durante el periodo de tratamiento. El ciclo estral de las hembras tratadas con MEZ con respecto al grupo CON presentó alteraciones en los patrones de ciclicidad estral después del quinto día, caracterizado por un alargamiento en las etapas de estro y metaestro, patrón similar al grupo que recibió DAI. También se observó ausencia de la etapa de diestro durante algunos días en estos tratamientos. En el grupo tratado con  $E_2$  se observó una etapa de estro permanente desde el día 11 de tratamiento.

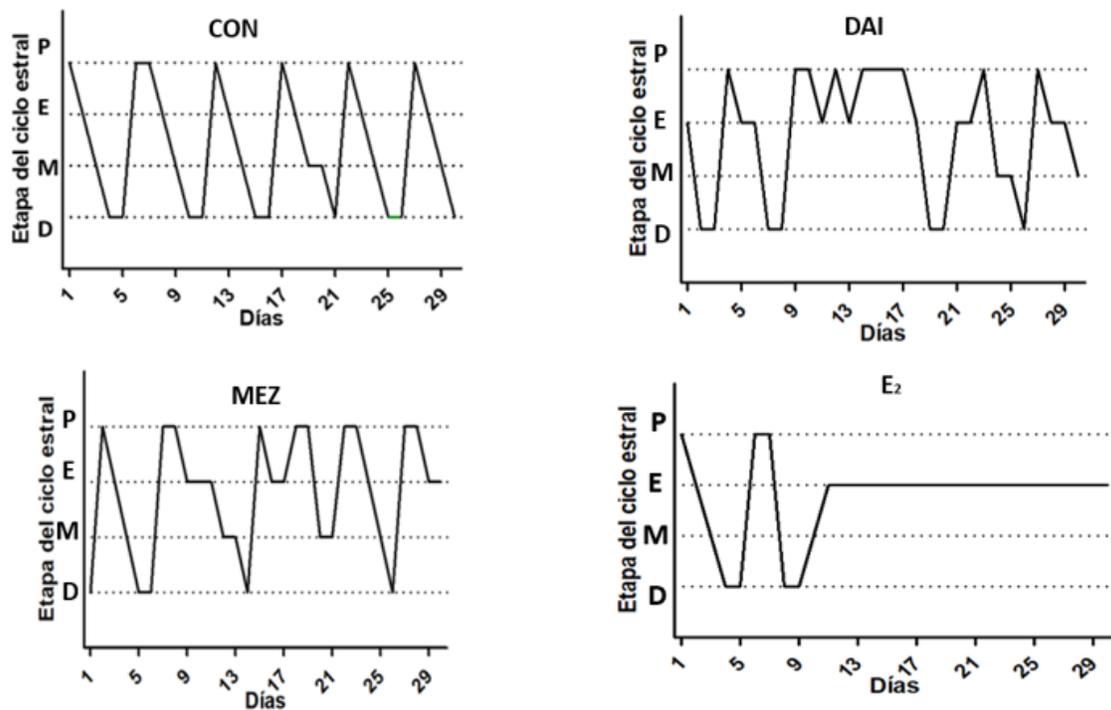


Fig. 9. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub>, sobre la ciclicidad estral en la rata hembra adulta. El tratamiento se realizó durante 30 días. Se evaluaron marcando la duración por día de cada etapa del ciclo estral; estro (E), proestro (P), metaestro (M) y diestro (D). La gráfica muestra alteraciones en la ciclicidad estral del grupo MEZ y DAI. A su vez se puede observar una pérdida de la ciclicidad estral en el grupo E<sub>2</sub>.

### 9.1.2 CONDUCTA SEXUAL FEMENINA

El grupo de hembras que recibieron MEZ y DAI al compararlas con el grupo CON presentaron una disminución significativa en el cociente lordótico (Fig. 10 A) así como en la intensidad de la lordosis (Fig. 10 B). En el grupo que recibió el tratamiento de E<sub>2</sub>, el cociente lordótico y la intensidad de lordosis presentaron valores similares al grupo CON.

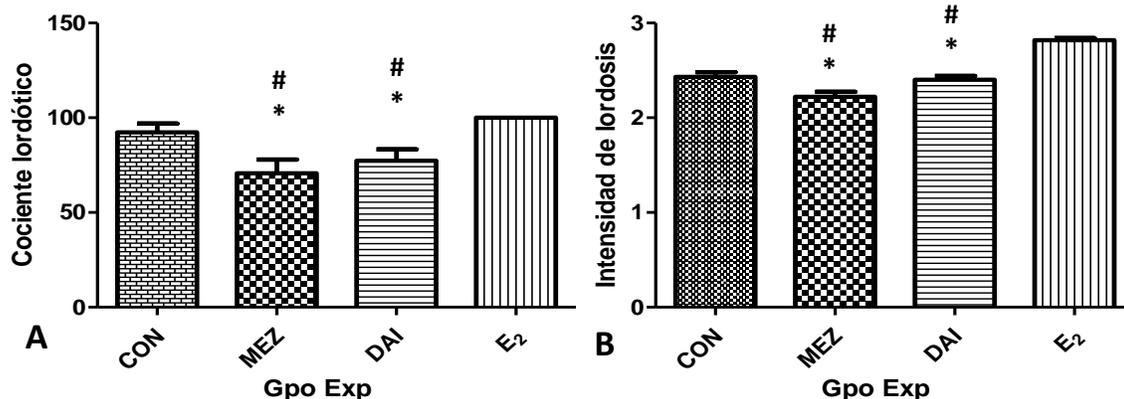


Fig. 10. Conducta sexual femenina. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre el cociente lordótico (A) e intensidad de la lordosis (B). Se observa una disminución en el cociente lordótico y en la intensidad de la lordosis en los grupos tratados con MEZ y DAI. El grupo E<sub>2</sub> no mostró diferencias respecto al grupo control. Los datos se muestran como la media ± EEM. (n=30). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por una prueba pos-hoc de Newman Keuls. \*p<0.05 comparado con el CON, # p<0.05 comparado con E<sub>2</sub>.

### 9.1.3 PESOS CORPORALES Y GLANDULARES EN HEMBRAS

El peso corporal de las hembras tratadas con MEZ, DAI y E<sub>2</sub> durante la etapa de proestro y diestro resultaron inferiores (p<0.01) al grupo CON (Tabla 2). El peso ovárico de las hembras experimentales tratadas con MEZ y DAI, evaluadas durante la etapa de proestro y diestro no mostraron diferencias significativas con el grupo CON, sin embargo, al comparar los pesos de los ovarios de las ratas tratadas con E<sub>2</sub> vs CON resultaron significativamente inferiores (Tabla 2). El peso del útero durante el proestro y diestro no mostró diferencias significativas entre los grupos. El peso de las vaginas de las hembras en proestro de los grupos experimentales de MEZ, DAI y E<sub>2</sub> resultaron mayores (p<0.01) al ser comparado con el peso vaginal de las hembras CON. En la etapa de diestro, no se observaron diferencias significativas del peso vaginal entre los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre el peso corporal y diferentes órganos reproductivos. Los superíndices (<sup>bc</sup>) dentro de la misma columna denotan diferencias significativas (p<0.01). Los datos se presentan como la media ± EEM. (n= 3). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por una prueba pos-hoc de Newman Keuls.

GRUPO	Peso corporal (g)	Peso ovarios (mg)	Peso úteros (mg)	Peso vaginas (mg)
<b>Proestro</b>				
CON	301.8± 11.5 <sup>a</sup>	71.2±5.1 <sup>a</sup>	630.0±97.7 <sup>a</sup>	95.7±12.5 <sup>a</sup>
MEZ	265.9±6.9 <sup>b</sup>	75.6±2.4 <sup>a</sup>	778.7±113.5 <sup>a</sup>	155.7±7.1 <sup>b</sup>
DAI	255.6±6.7 <sup>b</sup>	78.0±2.4 <sup>a</sup>	792.0±60.4 <sup>a</sup>	168.0±22.4 <sup>b</sup>
E <sub>2</sub>	225.5±6.5 <sup>c</sup>	31.4±1.4 <sup>c</sup>	720.0±41.7 <sup>a</sup>	143.0±9.2 <sup>b</sup>
<b>Diestro</b>				
CON	284.6±3.1 <sup>a</sup>	70.0±9.1 <sup>a</sup>	647.5±177.2 <sup>a</sup>	122.5±13.1 <sup>a</sup>
MEZ	251.0±16.8 <sup>b</sup>	63.7±2.6 <sup>a</sup>	860.0±110.0 <sup>a</sup>	160.0±20.0 <sup>a</sup>
DAI	238.3±10.2 <sup>b</sup>	83.0±6.3 <sup>a</sup>	744.0±60.7 <sup>a</sup>	142.0±15.6 <sup>a</sup>

#### 9.1.4 NIVELES HORMONALES DE P<sub>4</sub> Y E<sub>2</sub>

Las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Se puede observar en la Fig. 11 que durante la etapa de proestro predominó una mayor concentración de E<sub>2</sub>, y estas concentraciones disminuyeron en las otras etapas del ciclo; sin embargo, el grupo que recibió MEZ presentó un comportamiento ligeramente distinto, destacando valores similares entre la etapa de proestro y diestro.

Con respecto a las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> durante la etapa de proestro, los grupos de MEZ y DAI presentaron una concentración significativamente menor comparada con el grupo CON. En las etapas de estro y metaestro las concentraciones de P<sub>4</sub> no mostraron diferencias significativas. Los valores de la P<sub>4</sub> durante la etapa de diestro en los grupos MEZ y DAI mostraron un incremento significativo comparado con el grupo CON, aunque sólo fue significativamente mayor en el grupo DAI (Fig. 12).

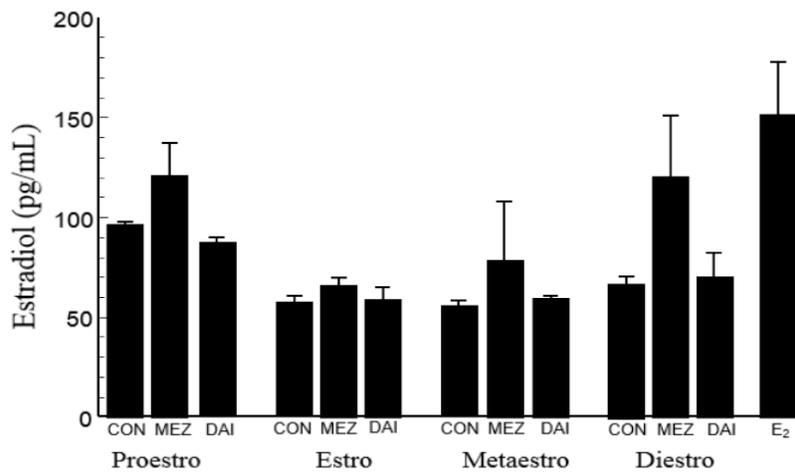


Fig. 11. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre los niveles de concentración sérica de E<sub>2</sub>. Los datos se muestran como la media ± EEM. (n=3). No se encontraron diferencias significativas.

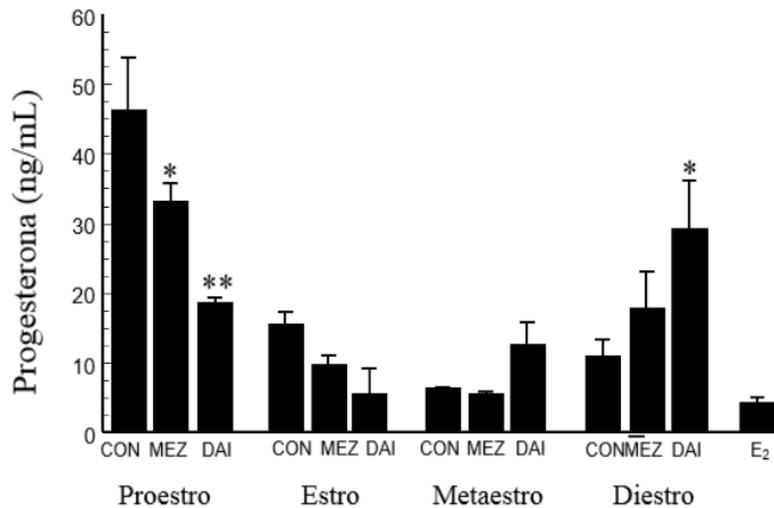


Fig. 12. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre los niveles de concentración sérica de P<sub>4</sub>. Se observan diferencias significativas en las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> en los grupos MEZ y DAI durante la etapa de proestro. En la etapa de diestro se observan diferencias significativas en el grupo DAI. Los datos se muestran como la media ± EEM. n=3. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. \*p<0.05 comparada con el grupo CON.

### 9.1.5 ALTURA DE LOS EPITELIOS

La altura del epitelio uterino se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento de MEZ y DAI durante el proestro y diestro (Fig.13 A y B respectivamente). El corte histológico representativo de útero de cada grupo experimental durante la etapa de proestro y diestro se muestra en la Fig. 14 y 15 respectivamente.

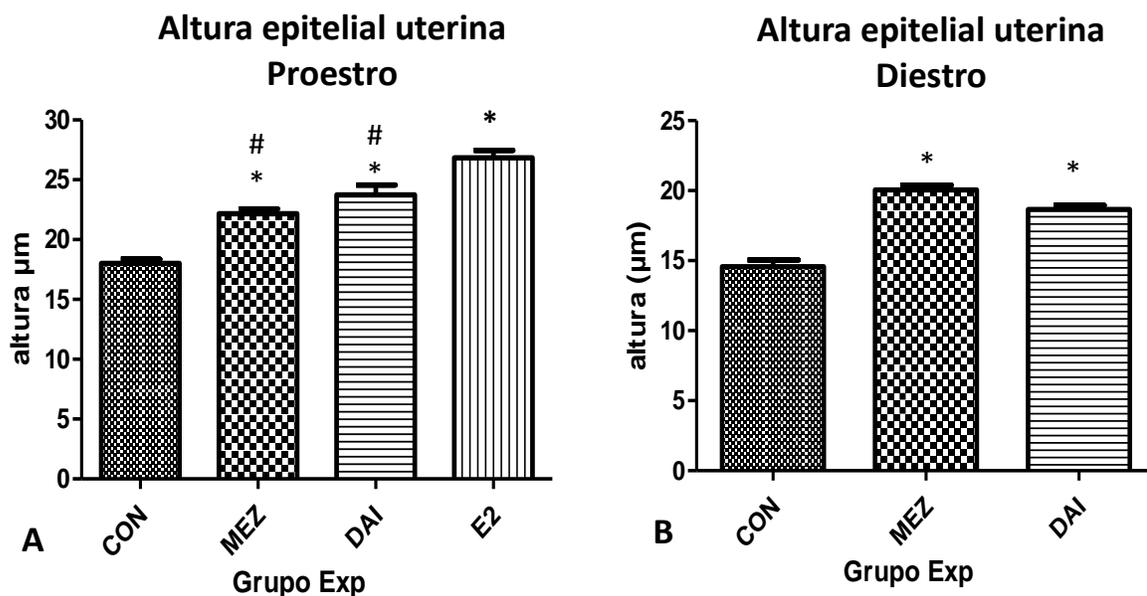


Fig. 13. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre la altura del epitelio uterino. Para el grupo MEZ y DAI durante la etapa de proestro (A), se observa un incremento significativo de la altura epitelial. Los mismos efectos se observan en la evaluación durante la etapa de diestro (B). Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM. (n=3). Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. \* $p < 0.05$  comparado con el CON, #  $p < 0.05$  comparado con E<sub>2</sub>.

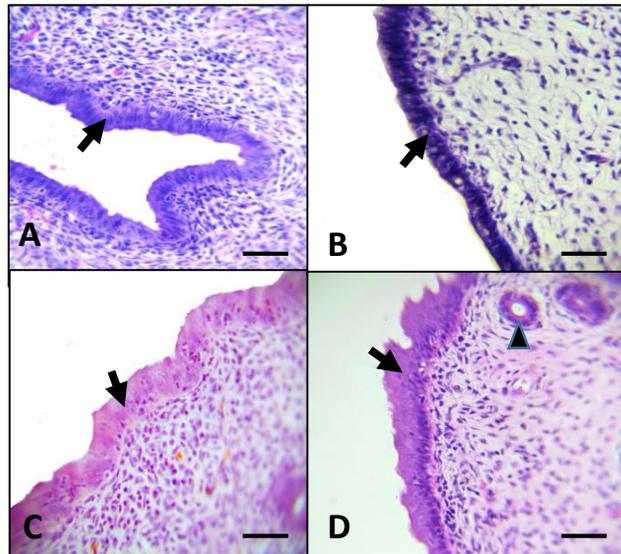


Fig. 14. Microfotografías de cortes histológicos de útero en etapa de proestro. A) CON, B) MEZ, C) DAI y D) E<sub>2</sub> (etapa estro). La flecha indica el epitelio cilíndrico simple en cada corte, glándulas secretoras endometriales (▲), Tamaño de la barra: 25 µm.

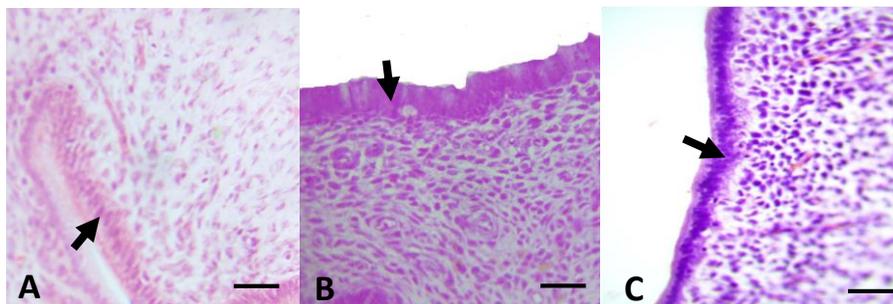


Fig. 15. Microfotografías de cortes histológicos de útero en etapa de diestro. A) CON, B) MEZ, C) DAI. La flecha indica el epitelio cilíndrico simple en cada corte observado. Tamaño de la barra: 25 µm.

Las ratas tratadas con MEZ, DAI y E<sub>2</sub> presentaron un incremento en la altura del epitelio vaginal durante la etapa de proestro (Fig. 16 A) y diestro (Fig. 16 B). La Fig. 17 y 18, muestra un corte histológico representativo de cada epitelio vaginal en cada grupo experimental en la etapa de proestro y diestro respectivamente.

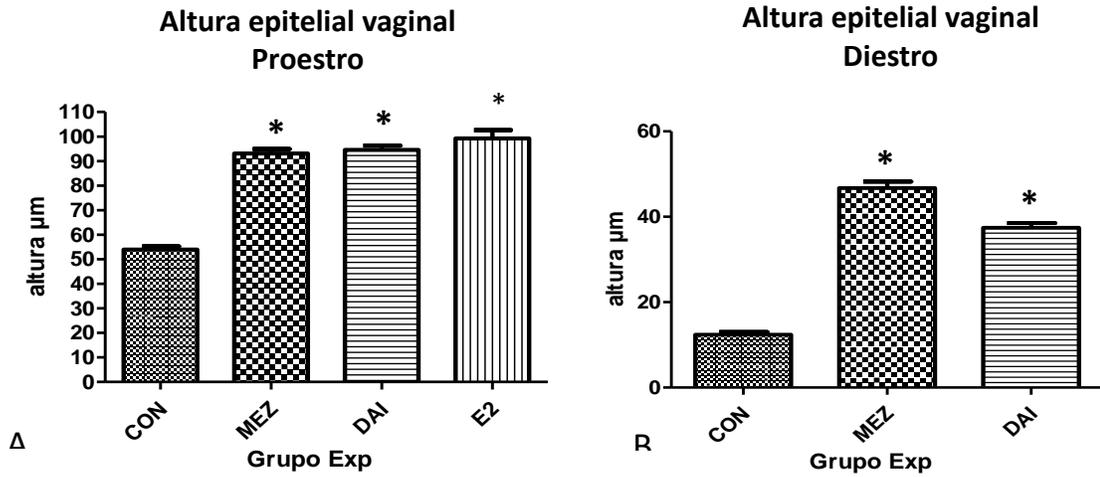


Fig. 16 Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre la altura del epitelio vaginal. Para el grupo MEZ y DAI durante la etapa de proestro (A) se observó un incremento significativo de la altura epitelial. Los mismos efectos se observan en la evaluación durante la etapa de diestro (B). Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM. (n=3). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. \*p<0.05 comparado con el CON.

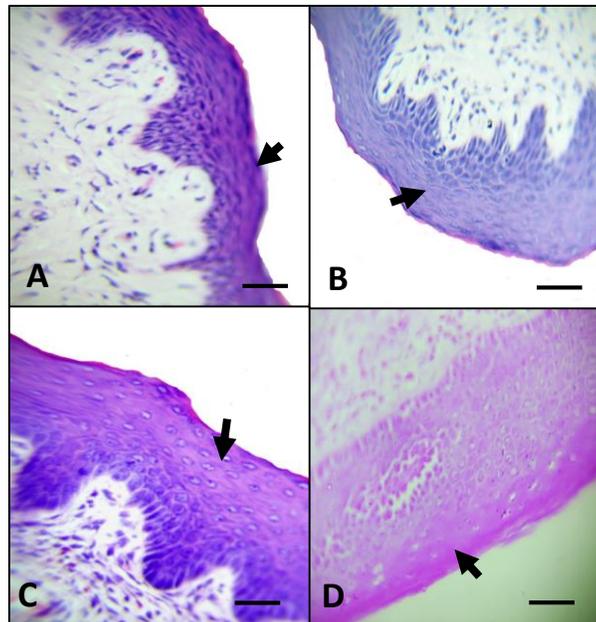


Fig. 17. Microfotografías de cortes histológicos de vagina en etapa de Proestro. A) CON, B) MEZ, C) DAI y D) E<sub>2</sub> (estro). La flecha indica el epitelio plano estratificado en cada corte. Tamaño de la barra: 25 µm.

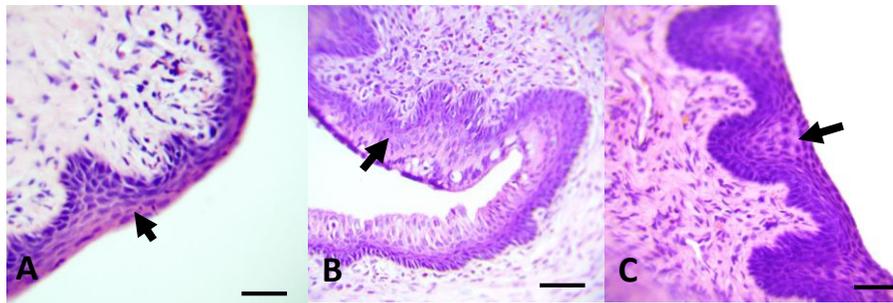


Fig. 18. Microfotografías de cortes histológicos de vagina en etapa de diestro. A) CON, B) MEZ, C) DAI. La flecha indica el epitelio plano estratificado en cada corte observado. Tamaño de la barra: 25  $\mu$ m.

## 9.2 EFECTOS DEL EXTRACTO DE LA VAINA DE MEZQUITE EN LA RATA

### MACHO ADULTA

#### 9.2.1 CONDUCTA SEXUAL MASCULINA

El efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub>, sobre los parámetros evaluados durante el comportamiento sexual masculino mostraron que las latencias de monta, de intromisión, de eyaculación y el número de montas, fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) al ser comparadas con el grupo CON. Por el contrario los resultados en torno al número de eyaculaciones en los grupos experimentales MEZ, DAI y E<sub>2</sub> fueron menores. En cuanto al intervalo post eyaculatorio, el grupo CON presentó un menor ( $p < 0.05$ ) promedio con relación a los valores de los grupos experimentales MEZ, DAI y E<sub>2</sub>. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre los parámetros evaluados en la conducta sexual masculina. Hay un incremento en el tiempo de la LM, LI, LE y IP en los grupos experimentales MEZ, DAI Y E<sub>2</sub>, también se observa un mayor número de montas en estos grupos experimentales. El número de eyaculaciones fue menor en estos grupos experimentales. (ab) Superíndices diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05). Los datos se muestran como la media ± EEM. (n=10). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls

	CON	MEZ	DAI	E <sub>2</sub>
<b>Latencia de monta (Seg)</b>	<b>7.2±1.04<sup>a</sup></b>	<b>54.5±21.04<sup>b</sup></b>	<b>14.5±2.72<sup>b</sup></b>	<b>145.5±45.99<sup>b</sup></b>
<b>Latencia de intromisión (Seg)</b>	<b>9.9±1.03<sup>a</sup></b>	<b>102.9±30.49<sup>b</sup></b>	<b>49.25±15.34<sup>b</sup></b>	<b>211.11±74.75<sup>b</sup></b>
<b>Latencia de eyaculación (Seg)</b>	<b>283.1±25.58<sup>a</sup></b>	<b>519.2±84.35<sup>b</sup></b>	<b>422.33±18.30<sup>b</sup></b>	<b>992.0±162.0<sup>b</sup></b>
<b>Número de montas</b>	<b>3.6±0.49<sup>a</sup></b>	<b>12.5±3.74<sup>b</sup></b>	<b>8.66±0.91<sup>b</sup></b>	<b>16.0±6.0<sup>b</sup></b>
<b>Número de eyaculaciones</b>	<b>3.0±0<sup>a</sup></b>	<b>2.0±0<sup>b</sup></b>	<b>1.7±0.21<sup>b</sup></b>	<b>0.2±0.13<sup>b</sup></b>
<b>Intervalo poseyaculatorio (Seg)</b>	<b>286.5±26.40<sup>a</sup></b>	<b>441.8±62.14<sup>b</sup></b>	<b>409.0±75.32<sup>b</sup></b>	<b>684.5±278.5<sup>b</sup></b>

### 9.2.2 PESOS CORPORALES Y GLANDULARES EN MACHOS

Los machos tratados con MEZ, DAI y E<sub>2</sub> presentaron un menor peso corporal comparado con el peso corporal de los machos del grupo (Tabla 4). De forma similar el peso de los órganos reproductivos masculinos; testículo, epidídimo, glándula seminal y próstata, presentaron una disminución significativa (p< 0.01) en estos mismos grupos. Un dato interesante, es que el grupo que recibió E<sub>2</sub> presentó los pesos de los órganos reproductivos más bajos incluso respecto a los otros grupos experimentales MEZ y DAI.

Tabla 4. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> sobre el peso corporal y de los órganos reproductivos. El peso corporal y glandular en los grupos experimentales es significativamente menor. Los superíndices (<sup>abc</sup>) diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0.01). Los datos se muestran como la media ± EEM. (n=10). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls.

GRUPO	Peso corporal (g)	Peso testicular (mg)	Peso epidídimo (mg)	Glándula seminal (mg)	Prostata (mg)
CON	404.94±8.26 <sup>a</sup>	1.88±0.03 <sup>a</sup>	758±8.13 <sup>a</sup>	2.05±0.09 <sup>a</sup>	658±31.13 <sup>a</sup>
MEZ	352.45±14.11 <sup>b</sup>	1.68±0.03 <sup>b</sup>	6.92±20.91 <sup>b</sup>	1.55±1.13 <sup>b</sup>	553±31.02 <sup>b</sup>
DAI	393.58±14.31 <sup>a</sup>	1.64±0.03 <sup>b</sup>	611.11±30.75 <sup>b</sup>	1.74±1.09 <sup>b</sup>	603±51.98 <sup>a</sup>
E <sub>2</sub>	312.13±7.44 <sup>b</sup>	0.36±0.01 <sup>c</sup>	0.24±0.02 <sup>c</sup>	0.17±0.008 <sup>c</sup>	0.13±0.01 <sup>c</sup>

### 9.2.3 EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

Los datos obtenidos en la calidad espermática: movilidad, viabilidad se muestran en las Fig.19 A y Fig.19 B, respectivamente. En la Fig. 19 A, se observa claramente que el porcentaje de movilidad en el grupo CON es mayor en comparación con los porcentajes de 59.75%, 65.33% y 25.5% obtenidos en los grupos MEZ, DAI y E<sub>2</sub>, respectivamente. El porcentaje de la viabilidad espermática (Fig.19 B) disminuyó en los grupos experimentales MEZ, DAI y E<sub>2</sub>.

La cuenta espermática del grupo CON fue de 153.64 x 10<sup>6</sup>, esta concentración es superior con respecto a los valores obtenidos en los grupos experimentales MEZ, DAI y E<sub>2</sub>. En contraste, el grupo CON mostró menos anomalías espermáticas en cabeza, cola y flagelo que los grupos tratados con MEZ, DAI y E<sub>2</sub> (Fig. 20).

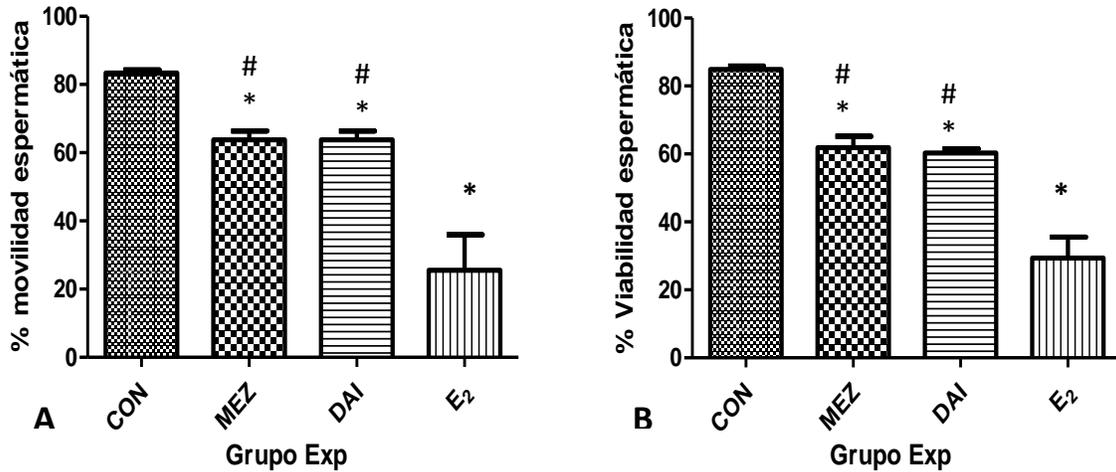


Fig. 19 .Efecto del MEZ, DAI Y E<sub>2</sub> después de 30 días de tratamiento. Se observa una disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles (A) y viables (B) en los grupos experimentales MEZ y DAI respecto al grupo CON. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM. (n=4). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. \*p<0.05 comparado con el CON, # p<0.05 comparado con el grupo E<sub>2</sub>.

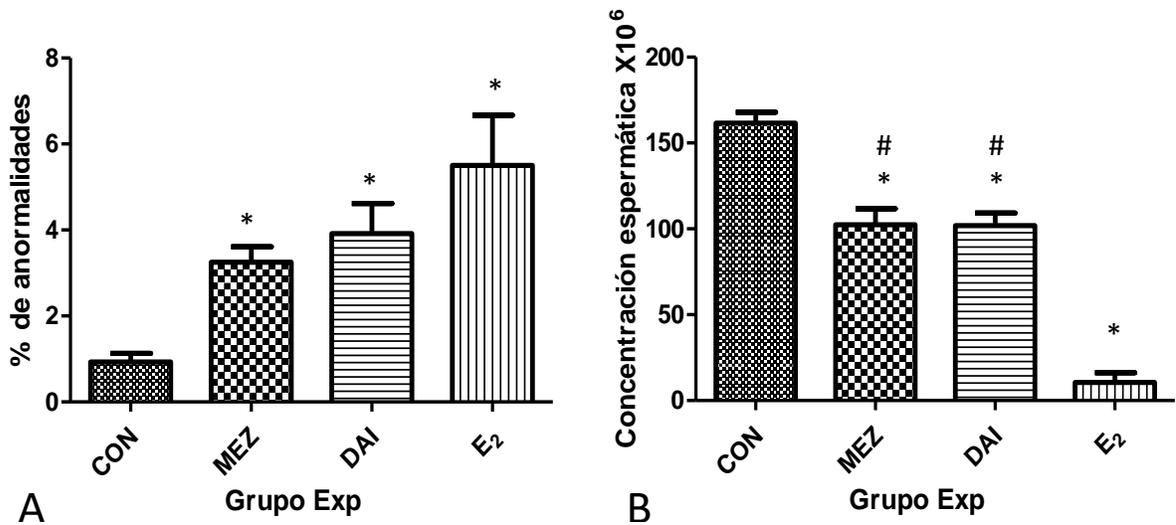


Fig. 20. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> después de 30 días de tratamiento. Se observan alteraciones en la morfología de los espermatozoides (A) y una reducción en la concentración espermática (B). Los datos se presentan como la media  $\pm$  EEM. (n=4). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. \*p<0.05 comparada con el CON y #p<0.05 comparada con E<sub>2</sub>.

#### 9.2.4 NIVELES HORMONALES DE T

Los machos tratados con MEZ, DAI y E<sub>2</sub> presentaron una disminución significativa en la concentración sérica de T (Fig. 21) comparada con el grupo CON. Se puede observar que el grupo E<sub>2</sub> provocó una disminución significativa en la concentración sérica de T.

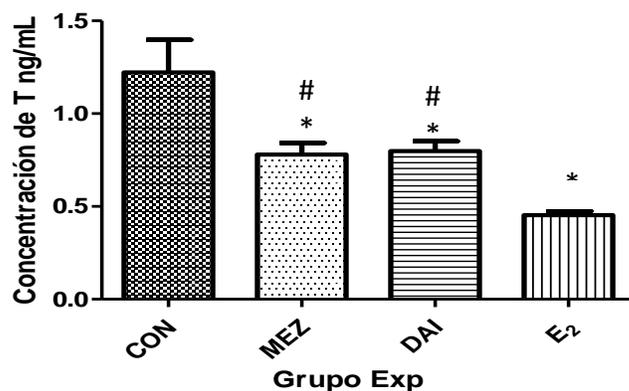


Fig. 21. Efecto del MEZ, DAI y E<sub>2</sub> después de 30 días de tratamiento sobre las concentraciones de T. Las concentraciones de T en los grupos experimentales es significativamente menor comparada con el grupo CON. Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. (n= 10). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls \*  $p < 0.05$  comparado con el grupo CON y #  $p < 0.05$  comparado con el grupo E<sub>2</sub>.

#### 9.2.5 EVALUACION DE LA MUERTE EN CÉLULAS TESTICULARES

Las células germinales positivas a TUNEL se caracterizaron por presentar una coloración café intensa (Fig. 24); los machos que fueron tratados con MEZ y con DAI, presentaron un mayor porcentaje de tubulos seminíferos con células positivas a TUNEL (Fig. 22). Así mismo se observa que hay un ligero incremento en el número de células germinales positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos (Fig. 23). En el caso del grupo tratado con E<sub>2</sub> los efectos observados fueron muy marcados. En

la Fig. 24 se muestran microfotografías en las que se identifican células positivas a TUNEL en los diferentes grupos experimentales.

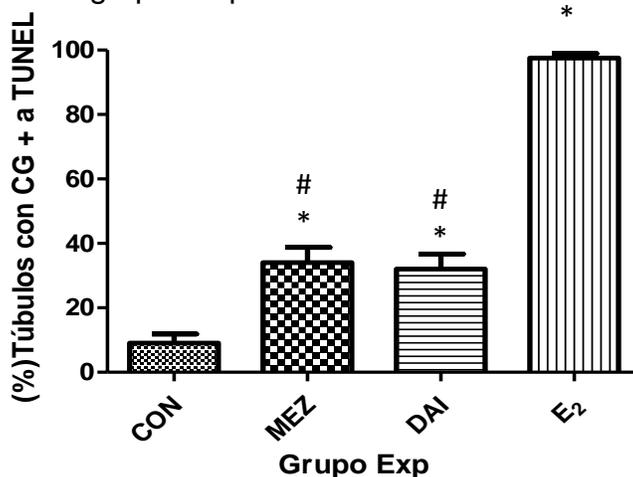


Fig. 22. Porcentaje de túbulos seminíferos con células germinales (CG) positivas a TUNEL en los machos tratados con MEZ, DAI y E<sub>2</sub> durante 30 días consecutivos. Se observa un porcentaje significativamente mayor en los grupos experimentales MEZ, DAI y E<sub>2</sub> en comparación con los testículos del grupo CON. Los datos se muestran como media ± EEM. Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. (n= 3). \*p<0.05 comparada con el CON y # comparada con el grupo E<sub>2</sub>.

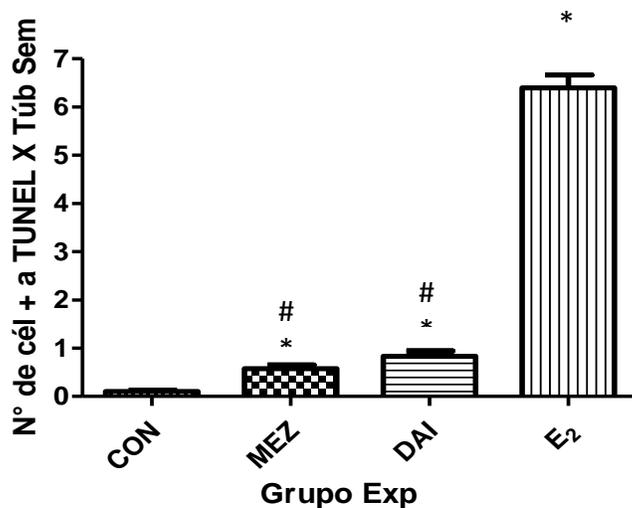


Fig. 23. Número de células positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos en los testículos de los machos tratados con MEZ, DAI y E<sub>2</sub> comparada con el grupo CON. Los datos se muestran como media ± EEM. Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. (n= 3). \*p<0.05 comparada con el CON y # comparada con el grupo E<sub>2</sub>.

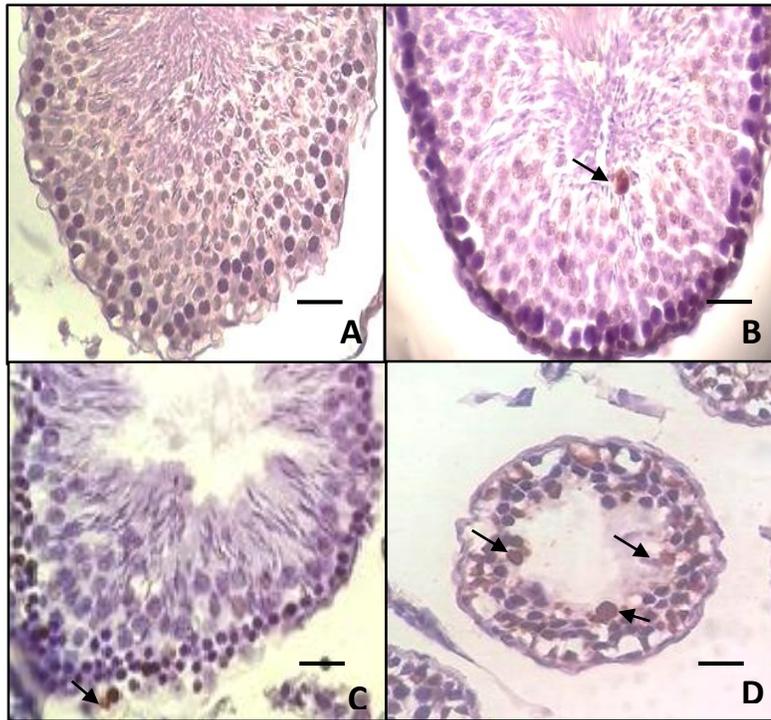


Fig. 24. Microfotografías de cortes transversales de testículos de machos A) CON, B) MEZ, C) DAI y D) E<sub>2</sub>, analizados mediante la técnica de TUNEL. Las células germinales positivas a TUNEL analizadas con el microscopio de luz, se caracterizaron por presentar una coloración café intensa marcadas con la flecha. Tamaño de la barra: 25 µm.

### 9.3 PORCENTAJE DE FERTILIDAD EN HEMBRAS Y MACHOS

Al evaluar el porcentaje de hembras que quedaron preñadas después de cada cruce con los machos experimentales (Tabla 5) se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje la fertilidad de aquellas hembras tratadas con MEZ y DAI. Mientras que las hembras tratadas con E<sub>2</sub> no quedaron preñadas. A su vez y debido a que los machos también fueron evaluados en esta misma prueba de fertilidad, se puede observar que los machos tratados con E<sub>2</sub> también presentaban

completa infertilidad, ya que fueron incapaces de preñar a las ratas experimentales CON, MEZ y DAI.

Tabla 5. Efecto del MEZ, DAI, E<sub>2</sub> sobre la fertilidad en hembras y machos. Hay una disminución en el % de hembras que quedaron preñadas en el grupo MEZ y DAI. Las hembras tratadas con E<sub>2</sub>, no quedaron preñadas. La n =10. \*p<0.05 comparado con el grupo CON-CON.

<b>Cruza de grupos</b>	<b>(%) Hembras preñadas</b>
CON-CON	100
CON-MEZ	100
CON-DAI	100
CON-E <sub>2</sub>	0 *
MEZ-CON	90
MEZ-MEZ	80
MEZ-DAI	80
MEZ-E <sub>2</sub>	0 *
DAI-CON	90
DAI-MEZ	80
DAI-DAI	70
DAI-E <sub>2</sub>	0 *
E <sub>2</sub> -CON	0 *
E <sub>2</sub> -MEZ	0 *
E <sub>2</sub> -DAI	0 *
E <sub>2</sub> -E <sub>2</sub>	0 *

#### 9.4 TAMAÑO DE LAS CAMADAS

El promedio de crías nacidas en las hembras de las diferentes cruzas experimentales (Fig. 25) muestra que las ratas experimentales tratadas con MEZ y DAI tuvieron aproximadamente 5-6 crías, mientras que las hembras del grupo CON tenían alrededor de 9-10 crías, esto indica que hay una disminución en el número de crías en estos grupos.

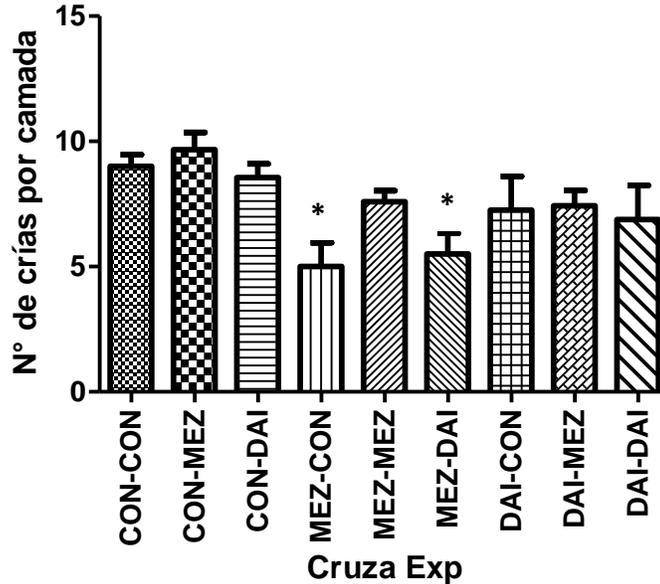


Fig. 25. Número de crías nacidas por camada. Las hembras tratadas con MEZ y DAI, presentaron un número de crías significativamente menor comparadas con las hembras del grupo control. Los datos se presentan como la media ± EEM. Se analizaron con una ANOVA de una vía, seguida por la prueba post hoc de Newman-Keuls. (n= 8). \*p<0.05 comparada con el CON.

## 10. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo mostraron que la administración del MEZ a hembras y machos adultos provoca efectos negativos en distintos aspectos fisiológicos de la reproducción, de manera similar a los efectos observados con el fitoestrógeno daizeína, pero en menor intensidad al compararlos con los efectos provocados por el E<sub>2</sub>.

### Ciclo estral

Los resultados del ciclo estral de la ratas tratadas con MEZ mostraron un alargamiento del ciclo, con mayor número de días en proestro y estro. Las hembras que son expuestas a los fitoestrógenos prenatalmente (Gallo *et al.*, 1999, Nikaido *et al.*,

2004), postnatalmente (Kouki et al., 2003; Soujanya et al., 2016) o en la etapa adulta muestran este tipo de alargamiento del ciclo estral. De manera similar, las mujeres que ingieren isoflavonas en la dieta aumentan la longitud del ciclo menstrual debido a la supresión de los niveles de FSH y LH (Soujanya *et al.*, 2016).

Debido a que la ciclicidad estral es regulada a nivel del hipotálamo por vías de señalización como la vía de Kisspeptina y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Soujanya *et al.*, 2016), es posible que los compuestos fitoestrogénicos provoquen alteraciones en el eje reproductivo. Los fitoestrógenos podrían ejercer una retroalimentación negativa en las neuronas Kisspeptinérgicas y las neuronas GnRH, disminuyendo así la secreción de GnRH y de gonadotropinas, alterando así la ciclicidad estral. Aunque los niveles de estradiol no disminuyeron, es posible que los fitoestrógenos del MEZ estén provocando un efecto antiestrogénico al competir por los receptores para estrógenos, dificultando así la retroalimentación positiva que el E<sub>2</sub> ejerce a nivel hipotalámico provocando una disminución en la liberación de GnRH y de gonadotropinas. Esto quedaría por ser corroborado evaluando los niveles de gonadotropinas.

El MEZ mostró tener efectos estrogénicos en el epitelio vaginal, induciendo su queratinización de la misma manera que la soya, la cual contiene altas cantidades de isoflavonas (Gallo *et al.*, 1999). De la misma forma, la DAI causó estros persistentes y alteraciones en la ciclicidad estral, de manera similar a otros trabajos (Kouki *et al.*, 2003). Queda por confirmar si los efectos del MEZ y de la DAI sobre la vagina están mediados por uno o ambos tipos de ERs.

Contrario a los efectos estrogenizantes en el epitelio vaginal, el MEZ y la DAI generaron efectos antiestrogénicos a nivel central en el control de la conducta sexual de la hembra.

#### Conducta sexual femenina

En las ratas hembra gonado-intactas, la liberación secuencial de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, integran la aparición de conductas proceptivas, conductas copulatorias y la inducción de los eventos endócrinos para que ocurra la ovulación (Mani y Portillo, 2010). La conducta de lordosis es regulada por mecanismos facilitadores del núcleo ventromedial (VMN), así como inhibitorios del septum lateral (Kouki *et al.*, 2003). En el VMN se ha encontrado una gran cantidad de ER $\alpha$  (Patisaul *et al.*, 2004), lo muestra que los estrógenos tienen un importante papel en la regulación del comportamiento sexual femenino. Las isoflavonas como la DAI y genisteína tienen un efecto antiestrogénico en la expresión de la conducta sexual femenina, ya que disminuyen la expresión de los genes que codifican para ER alfa y ER beta (Patisaul *et al.*, 2001) así como la expresión de genes que codifican para PR en el VMN en respuesta al E<sub>2</sub> (Jacob *et al.*, 2001). Lo mismo puede explicarse para el MEZ, ya que los efectos fueron similares a los de la DAI.

Además, los fitoestrógenos también pueden actuar como antagonistas compitiendo con el E<sub>2</sub> por los receptores ER $\alpha$ , y disminuir la unión de E<sub>2</sub> a los ER $\alpha$ ; de esta forma, disminuyen la conducta sexual femenina.

La conducta sexual femenina en la rata depende de la acción sinérgica de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> (Patisaul *et al.*, 2004), pero también es regulada por la oxitocina (Patisaul *et al.*, 2004). La expresión de los genes que codifican para PR y para los receptores a

oxitocina (OR) depende de E<sub>2</sub>. Los fitoestrógenos atenúan la expresión de OR en el MVN (Patisaul *et al.*, 2004). Debido a los posibles efectos a nivel de los OR y PR ocasionados por los fitoestrógenos y la disminución de la concentración de P<sub>4</sub> debido al tratamiento con MEZ y a la DAI repercuten en la disminución de la receptividad en las hembras.

#### Concentración de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>

La reducción en la síntesis de P<sub>4</sub> por efecto de los fitoestrógenos en células de la granulosa (Nynca *et al.*, 2015), así como la reducción en los niveles de mRNA para StART (Chen *et al.*, 2007), confirman que los fitoestrógenos pueden inhibir el crecimiento y maduración de las células de la granulosa (Awoniyi *et al.*, 1998), así como inhibir las enzimas esteroideogénicas, como la 3-βHSD (Ohno *et al.*, 2003), disminuyendo así la síntesis de P<sub>4</sub>.

Con respecto a las concentraciones de E<sub>2</sub>, en el presente trabajo no se observaron alteraciones significativas en las concentraciones de E<sub>2</sub> por efecto por efecto del MEZ y la DAI, lo que implica que la aromatasa folicular no fue inhibida por estos tratamientos como lo indica otro trabajo (Awoniyi *et al.*, 1998). Tampoco se observó incremento significativo de E<sub>2</sub> que pudiera indicar algún efecto compensatorio en la síntesis de E<sub>2</sub>.

Los tratamientos con DAI o MEZ no provocaron disminución del peso ovárico, a diferencia del efecto del E<sub>2</sub>, posiblemente por las bajas dosis de DAI utilizadas en este trabajo. El peso ovárico está influenciado por el número de folículos de Graff y cuerpos lúteos (Kouki *et al.*, 2003). Probablemente ninguno de los tratamientos logró disminuir el desarrollo de los folículos maduros ni la formación de cuerpos lúteos, como

se ha observado en otros trabajos, donde dosis de 10 mg/kg (Zin *et al.*, 2013) y dosis de 1 mg de daidzeína (Kouki *et al.*, 2003) provocan disminución en el peso ovárico.

En lo que respecta al peso uterino, tampoco se observaron cambios significativos en el peso, probablemente debido a las bajas dosis utilizadas. Las dosis de genisteína (54 mg/Kg) (Rimoldi *et al.* 2007) han mostrado que las dosis necesarias para causar aumento del peso uterino son extremadamente elevadas, esto debido a la baja afinidad de los ERs por los fitoestrógenos.

A diferencia de los efectos del MEZ y DAI sobre el peso ovárico y el peso uterino, el peso vaginal se incrementó con estos tratamientos, lo que podría sugerir que este órgano es más sensible a los efectos estrogenizantes de los fitoestrógenos, ya que responde a las bajas dosis utilizadas. Estos resultados confirman los datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, donde se observó un incremento en la altura del epitelio vaginal al utilizar el extracto de la vaina de mezquite en una dosis de 4g/kg (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

#### Altura epitelial

A pesar de que no se observaron cambios en los pesos uterinos de las ratas tratadas con MEZ o DAI, las alturas epiteliales del útero y la vagina se incrementaron. Ambos tejidos poseen los dos subtipos de ERs, lo que permite que ambos tratamientos ejerzan efectos estrogénicos en estos órganos, aunque en menor medida que el E<sub>2</sub>, el cual indujo la mayor proliferación del endometrio, así como proliferación y queratinización de las células epiteliales de la vagina.

## Fertilidad en la hembra

La actividad estrogénica inducida por la acción de los fitoestrógenos es capaz de actuar sobre el eje H-H-G conduciendo a un desequilibrio hormonal seguido de la infertilidad (Soujanya *et al.*, 2016). Sin embargo, la alimentación también juega un papel importante en la reproducción y, si los fitoestrógenos inducen una disminución en el peso corporal, como se observó en este trabajo, sería importante evaluar si el estado nutricional en las hembras experimentales fue alterado, ya que las ratas experimentales presentaron un peso corporal menor y su estado nutricional podría haber influido sobre la cantidad de óvulos liberados, provocando un menor número de crías. El E<sub>2</sub> tiene un efecto anorexigénico inhibiendo la acción de péptidos orexigénicos (Butera, 2010) lo que podría explicar el menor peso corporal observado en los animales experimentales afectando su estado nutricional. También el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> juegan un papel importante en la sincronización del transporte del embrión pre-implantado desde el oviducto, hasta que éste es implantado en un útero receptivo. La ausencia de estrógeno en la rata preñada durante la etapa de implantación puede retrasar esta implantación debido a que induce un estado de latencia en el embrión (Soujanya *et al.*, 2016), si se considera un efecto antiestrogénico donde la obstrucción de los receptores a estrógenos por fitoestrógenos previene el crecimiento de los folículos y reduce el número de cuerpos lúteos, esto puede provocar una disminución en el número menor de crías en los grupos experimentales de las ratas hembras que fueron tratadas con MEZ y DAI. De forma similar, la genisteína (0.5, 5mg/Kg) reduce la fertilidad de las ratonas causando bajas tasas de ovulación y pocos sitios de implantación reduciendo así el tamaño de la camada (Jefferson *et al.*, 2005).

## Peso corporal en hembras y machos

Existe una relación inversa entre los niveles de E<sub>2</sub> y la ingesta de alimentos y, durante la fase de proestro, cuando los niveles de estradiol son altos, la ingesta de alimentos es menor. Por el contrario, la ovariectomía incrementa significativamente la ingesta de alimentos y el peso corporal. Esto se debe al efecto del E<sub>2</sub> a nivel hipotalámico, donde incrementa los factores anorexigénicos y disminuye los factores orexigénicos, regulando factores periféricos que participan en la regulación del hambre, como son la grelina, colecistoquinina (Butera, 2010) y la leptina (Weber *et al*, 2001). Los fitoestrógenos parecen tener efectos similares en el sistema que regula la ingesta de alimentos, como lo muestra el peso corporal de los animales de los grupos MEZ, DAI y E<sub>2</sub> en comparación con el CON. Las dietas ricas en fitoestrógenos (600 µg/g) o estradiol (7.5 µg) generan bajos pesos corporales, a través de regulación de la ingesta de alimentos (Weber *et al*, 2001).

## Conducta sexual masculina

El E<sub>2</sub> participa de manera importante en la expresión de la conducta sexual masculina y la administración de fitoestrógenos, causa disminución de la conducta sexual masculina (Wisniewski *et al.*, 2003). El hecho de que los fitoestrógenos inhiban la actividad de la aromatasa, puede generar disminución en las concentraciones de E<sub>2</sub> en las áreas que regulan la conducta sexual masculina, tales como el POA.

La disminución de la conducta sexual, con mayores latencias de monta y eyaculación, y un menor número de eyaculaciones, en los machos tratados con MEZ o DAI, también puede explicarse por la disminución de la 5-dihidrotestosterona (DHT), hormona necesaria para la erección peneana. Los fitoestrógenos también pueden

inhibir a la enzima 5 $\alpha$  reductasa, responsable de la formación de DHT a partir de T. Si además los niveles de T son bajos, la función eréctil se ve seriamente comprometida. Como se demostró en otro trabajo donde la administración de DAI causa efectos similares (Pan et al, 2008).

#### Concentración sérica de T

La T tiene un papel importante en la maduración de espermatidas (Mahabadi *et al.*, 2016). La administración de MEZ y DAI provocaron disminución de los niveles de T. Los fitoestrógenos inhiben a las enzimas 3 $\beta$ -HSD y 17 $\beta$ -HSD, esenciales en la esteroidogénesis testicular, causando así la disminución de la T (Ohno *et al.*, 2003)

#### Apoptosis testicular

La administración de estrógenos, así como la privación de andrógenos induce apoptosis en las células germinales. Las dietas con altas concentraciones de fitoestrógenos también incrementan la apoptosis en las células germinales en desarrollo (Assinder *et al.*, 2007). Dosis bajas de E<sub>2</sub> (10  $\mu$ g), como la utilizada en este trabajo es capaz de incrementar significativamente el número de células positivas a TUNEL, lo mismo que las dosis utilizadas de MEZ y la DAI. Las bajas concentraciones de T observadas en este trabajo eran bajas, esto puede explicar de cierta manera el incremento de la muerte celular en las células germinales testiculares. Los fitoestrógenos por si solos pueden incrementar la apoptosis, deteniendo la síntesis de DNA en los espermatoцитos en preleptoteno, a pesar de no alterar las concentraciones de T, pero sí la espermatogénesis (Svechnikov *et al.*, 2005).

## Calidad espermática

La FSH y el E<sub>2</sub> son necesarias para la expresión de la cadherina, proteína responsable de la adhesión de las células germinales con la célula de Sertoli. Los fitoestrógenos pueden alterar el proceso dinámico de la espermatogénesis reduciendo la expresión de N-cadherinas, disminuyendo así la adhesión de células de Sertoli y células germinales (Schulster *et al.*, 2016), lo que puede contribuir a la disminución en la concentración de espermatozoides en el epidídimo.

El epidídimo es el órgano en el cual maduran los espermatozoides, desarrollan la capacidad de movilidad progresiva y la capacidad de fertilización (Kaneto *et al.*, 1999). Este órgano es dependiente de testosterona y es responsable también del almacenamiento de los espermatozoides (Glover y Assinder, 2006). En el epidídimo los espermatozoides deben ser protegidos de las especies reactivas de oxígeno (ERO), y varias de estas enzimas antioxidantes están bajo regulación de hormonas esteroides. Los fitoestrógenos tienen la capacidad de disminuir la expresión de proteínas antioxidantes y esto puede afectar la calidad espermática al incrementarse las ERO (Glover y Assinder, 2006). Otras proteínas sintetizadas por el epidídimo, necesarias para la maduración de los espermatozoides, están bajo el control de los andrógenos. Por lo tanto, la disminución de los niveles de T compromete la liberación y síntesis de dichas proteínas, afectando la calidad espermática a través de disminuir la concentración, la viabilidad y la movilidad espermática.

## Glándulas sexuales masculinas

La reducción en la concentración de T, causa disminución en el peso de la próstata y de las vesículas seminales, debido a que estos órganos son andrógeno-

dependientes (Kaneto *et al.*, 1999; Mahabadi *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2001). La disminución del peso de la próstata causado por MEZ y DAI, de manera similar a lo que causa la administración de genisteína (Strauss *et al.*, 1998) pueden explicarse por las bajas concentraciones de T en los machos tratados con MEZ y DAI. Otra posibilidad es que la inhibición de la 5 $\alpha$ -reductasa generada por los fitoestrógenos (Weber *et al.*, 2001) contribuya a la disminución del peso de la próstata. Además de la 5 $\alpha$ - reductasa, la enzima aromatasa, también puede ser inhibida por la acción de los fitoestrogenos, provocando una reducción en la formación de estrógenos locales en la próstata, lo que causa disminución en la mitosis en este órgano (Weber *et al.*, 2001).

Así como la próstata, la vesícula seminal es otra de las glándulas exocrinas del tracto reproductor masculino de los mamíferos. Esta glándula secreta un fluido viscoso que contiene sustancias como: fructosa, potasio, bicarbonato, prostaglandias, prolactina (Gonzales,1989), compuestos que juegan un papel importante en la viabilidad, motilidad y la sobrevivencia de los espermatozoides durante su transporte (Cederroth *et al.*, 2010). Al igual que la próstata, es un órgano dependiente de andrógenos y, por lo tanto, la disminución de los niveles de T puede inducir disminución del tamaño de la vesícula seminal (Cederroth *et al.*, 2010), como se observó en este trabajo.

#### Fertilidad en el macho

Los machos tratados con E<sub>2</sub> no fueron capaces de preñar a las hembras con las que copularon, debido a la depleción completa de la espermatogénesis así como la casi nula presencia de espermatozoides en el epidídimo. El MEZ o el tratamiento con dosis bajas de DAI no disminuyeron la fertilidad masculina, a pesar de la apoptosis

inducida en las células testiculares y la disminución de T, ya que fueron capaces de preñar a las hembras de todos los grupos experimentales con las que copularon. Incluso en otros trabajos con dosis elevadas de fitoestrógenos en la dieta, la fertilidad de los machos no se ve afectada, observándose un tamaño de camada normal (12 crías) en las hembras con las que copularon (Glover y Assinder 2006).

## 11. CONCLUSIONES

El tratamiento a largo plazo con MEZ tiene efectos estrogénicos y altera la reproducción en una manera similar a la DAI en hembras y machos, pero con una menor intensidad comparada con el E<sub>2</sub>.

En las hembras el MEZ tiene un efecto estrogénico en la vagina, alargando el ciclo estral, y estimulando la proliferación de los epitelios uterino y vaginal.

El MEZ tiene efectos antiestrogénicos a nivel central, disminuyendo la conducta sexual.

Las alteraciones reproductivas causadas por el MEZ en la hembra reducen su fertilidad.

En los machos, el MEZ tiene efectos antiestrogénicos centrales, disminuyendo la conducta sexual.

A nivel testicular tiene efectos estrogénicos, disminuyendo las concentraciones séricas de T y, en consecuencia el peso de los órganos sexuales dependientes de andrógenos. Sin embargo, a pesar de dichas alteraciones reproductivas no causó infertilidad en los machos.

Las alteraciones reproductivas causadas por el MEZ no repercuten en la fertilidad en los machos.

Es necesario ampliar los estudios para aclarar el mecanismo por el cual estos compuestos pueden alterar la fisiología reproductiva.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, N. R. (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. 73(5): 1509–1515.
- Assinder, S., Davis, R., Fenwick, M., Glover, A. (2007). Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction*. 133(1): 11–19.
- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K. J., Walker, M., Fisher, J. S., Morley, M., Sharpe, R. M. (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): 3898–3907.
- Awoniyi, C. A., Roberts, D., Veeramachaneni, D. N., Hurst, B. S., Tucker, K. E., Schlaff, W. D. (1998). Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertility and Sterility*. 70(3): 440–447.
- Bennetts H.B, Underwood E.J, Shier F.L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. 22: 2-12.
- Björnström, L., Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*. 19(4): 833–842.
- Butera, P. C. (2010). Estradiol and the control of food intake. *Physiology & Behavior*. 99(2): 175–180.

- Cruz G. (1986). Obtención de Harina de Algarroba y Posibilidades de Usarla en productos para la Alimentación Humana. Unpublished Eng. Thesis, Universidad de Piura, Peru.
- Cruz G. (1999). Production and Characterization and Uses of *Prosopis* Seed Galactomannan, Thesis, Swiss Federal Institute of Technology; Zurich, Switzerland.
- Cardoso, J. R., Báo, S. N. (2007). Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. *Animal Reproduction Science*. 97(3–4): 237–245.
- Cornejo, G.V. (2009). Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina De la reproducción*. 1 (4): 115-130.
- Carrasco, M., Salinas, A., Mangione, A. M., Gil, E. R. (2010). Efecto fitoestrogénico del extracto metanólico de frutos de *Prosopis torquata* (Cav. ex Lag.) en ratas Wistar hembras púberes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 24 (2):54-60.
- Cederroth, Christopher R., Zimmermann, C., Beny, J-L., Schaad, O., Combepine, C., Descombes, P., Nef, S. (2010). Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 321(2): 152–160.
- Cederroth, Christopher Robin, Zimmermann, C., Nef, S. (2012). Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 355(2): 192–200.

- Chen, Y.-C., Nagpal, M. L., Stocco, D. M., Lin, T. (2007). Effects of genistein, resveratrol, and quercetin on steroidogenesis and proliferation of MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Journal of Endocrinology*. 192(3): 527–537.
- Cheng, C. Y., Mruk, D. D. (2010). The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365(1546), 1459–1463.
- Choge, S. K., Pasiecznik, N. M., Harvey, M., Wright, J., Awan, S. Z., Harris, P. J. C. (2007). *Prosopis* pods as human food, with special reference to Kenya. *Water SA*. 33(3):419–424.
- Cui, J., Shen, Y., Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*. 19(3): 197–209.
- De La Torre-Almaráz, R., Cota-Trujillo, F. M., García-Rojas, J. L., Campos, J. E., San-Martín, F. (2009). Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la reserva de la biosfera del Valle de Zapotitlán, México. *Agrociencia*. 43(2): 197–208.
- deCatanzaro, D., Pollock, T. (2016). Absorption and distribution of estradiol from male seminal emissions during mating. *The Journal of Endocrinology*. 231(3): 245–257.
- DeMayo, F. J., Zhao, B., Takamoto, N., Tsai, S. Y. (2002). Mechanisms of action of estrogen and progesterone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 955: 48-59.
- Erskine M. S., Lehmann M. L., Cameron N. M., Polston E. K. 2004. Co-regulation of

female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis. *Behavioural Brain Research*. 153 (2): 295-315.

Freeman, M.E. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Neils J.D., Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. Eds. *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, third ed. Academic Press, St. Louis. 2329-2367.

Findlay, J. K., Liew, S. H., Simpson, E. R., Korach, K. S. (2010). Estrogen Signaling in the Regulation of Female Reproductive Functions. *Handbook of experimental pharmacology* 198. 29–35.

Freyre, M. R., Bernardi, C. M. H., Baigorria, C. M., Rozycki, V. R., Piagentini, A. M., Presa, M., Taher, H. A. (2010). Parámetros de Interés Nutricional en Semillas de Vinal (*Prosopis Ruscifolia*). *FAVE Sección Ciencias Agrarias*. 9(1/2):89–96.

Gianinetto I.B., Cabrera J.L., Oberti J.C., Juliani, H.R., (1975). Flavonoid compounds of the genus *Prosopis*. *Lloydia*. 38:265-267.

Gonzales GF. (1989). Functional structure and ultrastructure of seminal vesicles. *Arch Androl*. 22: 1-13.

Gallo, D., Cantelmo, F., Distefano, M., Ferlini, C., Zannoni, G. F., Riva, A., Scambia, G. (1999). Reproductive Effects of Dietary Soy in Female Wistar Rats. *Food and Chemical Toxicology*. 37(5): 493–502.

Gilbert, S. F. (2005). Fecundación: el comienzo de un nuevo organismo. In *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana. 7° edición. Buenos Aires. 197-201

- Glover, A., Assinder, S. J. (2006). Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Journal of Endocrinology*. 189(3): 565–573.
- Goldman, J. M., Murr, A. S., Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 80(2): 84–97.
- González, GK., Muñoz, M., Romero, C., Dorantes L., Porra, M. R., San Martín, E., Guerrero, I., (2015). Posible uso de vaina de *Prosopis* en alimentación de ovinos: contenido de compuestos fenólicos. Reunión Anual del Programa Cooperacito Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales. San José, Costa Rica.
- Harzallah-Skhir, F., Ben Jannet, H. (2005). Flavonoids diversification in organs of two *Prosopis farcta* (Banks & Sol.) Eig. (Leguminosea, Mimosoideae) populations occurring in the northeast and the southeast of Tunisia.
- Hess, R. A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1( 52): 1-14-
- Hess, R. A., Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 636: 1–15.
- Hull, E. M., Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Hormones and behavior*. 52(1): 45–55.

- Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J., Lee, S. H., Kang, Y. S., Choe, T. B., Han, K. O. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 101(4–5): 246–253.
- Jargin, S. V. (2014). Soy and phytoestrogens: possible side effects. *GMS German Medical Science*, 12: 1-5.
- Jacob, D.A., J.L. Temple, H.B. Patisaul, L.J. Young, y E.F. Rissma .( 2001). Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor  $\alpha$ . *Exp. Biol. Med.* 226 (4):301-306.
- Jefferson, W. N. (2010). Adult Ovarian Function Can Be Affected by High Levels of Soy<sup>12</sup>. *The Journal of Nutrition*. 140(12): 2322S–2325S.
- Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., Newbold, R. R. (2005). Adverse Effects on Female Development and Reproduction in CD-1 Mice Following Neonatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein at Environmentally Relevant Doses. *Biology of Reproduction*. 73(4): 798–806.
- Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., Newbold, R. R. (2007). Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reproductive Toxicology*.23(3): 308–316.
- Jefferson, W. N., Patisaul, H. B., Williams, C. J. (2012). Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction*. 143(3): 247–260.
- Jeschke, U., Briese, V., Richter, D.-U., Bruer, G., Plessow, D., Waldschläger, J., Friese, K. (2005). Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on production of

- human chorionic gonadotropin in term trophoblast cells in vitro. *Gynecological Endocrinology*. 21(3): 180–184.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 29(4): 557–568.
- Johnson, M. H., Everitt, B. J. (2007). Testicular Function in the Adult. In *Essential reproduction*. 6<sup>o</sup> ed. Blackwell Pub. Australia. 61-79.
- Kallela, K., Heinonen, K., Saloniemi, H. (1984). Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. A case report. *Nordisk Veterinaermedicin*. 36(3–4): 124–129.
- Kaneto, M., Kanamori, S., Hishikawa, A., Kishi, K. (1999). Epididymal sperm motion as a parameter of male reproductive toxicity: sperm motion, fertility, and histopathology in ethinylestradiol-treated rats. *Reproductive Toxicology*. 13(4): 279–289.
- Kim, S. H., Park, M. J. (2012). Effects of phytoestrogen on sexual development. *Korean Journal of Pediatrics*. 55(8): 265–271.
- Kouki, T., Kishitake, M., Okamoto, M., Oosuka, I., Takebe, M., Yamanouchi, K. (2003). Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Hormones & Behavior*. 44(2): 140–145.
- Kuhnle, G. G. C., Dell'Aquila, C., Runswick, S. A., Bingham, S. A. (2009). Variability of phytoestrogen content in foods from different sources. *Food Chemistry*. 113(4): 1184–1187.

- Lazari, M. F. M., Lucas, T. F. G., Yasuhara, F., Gomes, G. R. O., Siu, E. R., Royer, C., Porto, C. S. (2009). Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia*. 53(8): 923–933.
- Mahabadi, J. A., Bafrani, H. H., Nikzad, H. (2016). Efecto de la Dieta Suplementada con Sésamo en la Histología de la Próstata y Vesícula Seminal de Ratas Adultas. *International Journal of Morphology*. 34(2): 604–609.
- Mani, S., Portillo, W. (2010). Activation of Progesterone Receptors in Female Reproductive Behavior: Interactions with Neurotransmitters. *Frontiers in neuroendocrinology*. 31(2): 157–171.
- Mueller, S.O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., Korach, K.S. (2004). Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$  in Human Cells. *Toxicological Sciences*. 80 (1): 14-25.
- Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Current Genomics*. 7(8): 497–508.
- Mendoza, R. M., Medina, A. L. M., Gutiérrez, J. F. P., Izquierdo, A. C. (2002). Parámetros reproductivos en vacas holstein alimentadas con alfalfa alta en cumestrol. *Archivos de Zootecnia*. 51 (195): 373-376.
- Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N., Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reproductive Toxicology*. 18(6): 803–811.

- Nynca, A., Sadowska, A., Orłowska, K., Jabłonska, M., Ciereszko, R. E. (2015). The Effects of Phytoestrogen Genistein on Steroidogenesis and Estrogen Receptor Expression in Porcine Granulosa Cells of Large Follicles. *Folia Biologica*. 63(2):119–128.
- Ohno, S., Nakajima, Y., Inoue, K., Nakazawa, H., Nakajin, S. (2003). Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. *Life Sciences*. 74(6): 733–742.
- Ososki, A. L., Kennelly, E. J. (2003). Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research*. 17(8): 845–869.
- Prieto-Gómez B, Velázquez-Paniagua M. (2002). Fisiología de la Reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev Fac Med UNAM*. 45 (6): 252-257.
- Pan, L., Xia, X., Feng, Y., Jiang, C., Cui, Y., Huang, Y. (2008). Exposure of juvenile rats to the phytoestrogen daidzein impairs erectile function in a dose-related manner in adulthood. *Journal of Andrology*. 29(1): 55–62.
- Patisaul, H.B. Dindo M., Whitten, P.L., Young L.J. 2001. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive Behavior and Estrogen Receptor alpha- and beta-dependent gene expression in the brain. *Endocrinology* .142 (7): 2946-2952
- Patisaul, H. B., Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31(4): 400–419.
- Patisaul, H. B., Luskin, J. R., Wilson, M. E. (2004). A soy supplement and tamoxifen inhibit sexual behavior in female rats. *Hormones and Behavior*. 45(4): 270–277.

- Retana-Márquez, S., Aguirre, F. G., Alcántara, M., García-Díaz, E., Muñoz-Gutiérrez, M., Arteaga-Silva, M., Delgadillo, J. A. (2012). Mesquite pod extract modifies the reproductive physiology and behavior of the female rat. *Hormones and Behavior*. 61(4): 549–558.
- Retana-Márquez, S., Juárez-Rojas, L., Hernández, A., Romero, C., López, G., Miranda, L., Delgadillo, J. A. (2016). Comparison of the effects of mesquite pod and *Leucaena* extracts with phytoestrogens on the reproductive physiology and sexual behavior in the male rat. *Physiology & Behavior*. 164(Pt A): 1–10.
- Rietjens, I. M. C. M., Louisse, J., & Beekmann, K. (2016). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology*. 174(11): 1263-1280.
- Rimoldi, G., Christoffel, J., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W. (2007). Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environmental Health Perspectives*. 115 (Suppl 1), 62–68.
- Romero R, Carlos M, Tarrago Castellanos, M. del R., Muñoz Mendoza, R., Arista Reyes, R., Rosado Garcia, A. (1997). Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinaria México*. 28(1): 25–30.
- Sauceda, E. N. R., Martínez, G. E. R., Valverde, B. R., Ruiz, R. M., Hermida, M. de la C. C., Torres, S. M. M., Ruiz, H. H. P. (2014). ANÁLISIS TÉCNICO DEL ÁRBOL DEL MEZQUITE (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) En México. *Ra Ximha*. 10 (3): 173-193.
- Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1822(12): 1896–1912.

- Sawal, R. K., Ratan, R., Yadav, S. B. S. (2004). Mesquite (*Prosopis juliflora*) Pods as a Feed Resource for Livestock A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 17(5): 719–725.
- Schulster, M., Bernie, A. M., Ramasamy, R. (2016). The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology*. 18(3): 435–440.
- Sirmah, P., Dumarçay, S., Masson, E., Gérardin, P. (2009). Unusual amount of (-)-mesquitol from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Natural Product Research*. 23(2): 183–189.
- Sirotkin, A. V., Harrath, A. H. (2014). Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*. 741: 230–236.
- Soujanya, M. G. S., Reddy, K. P., Sridevi, V., Ramach, P., Reddy, R., Reddy, P. S. (2016). In Utero Exposure of Biochanin-A Alters Female Reproduction in Rat. *Journal of Clinical and Molecular Endocrinology*. 1(2):1-10.
- Srilatha, B., Adaikan, P. G. (2004). Estrogen and phytoestrogen predispose to erectile dysfunction: do ER-alpha and ER-beta in the cavernosum play a role? . *Urology*. 63(2): 382–386.
- Strauss, L., Mäkelä, S., Joshi, S., Huhtaniemi, I., Santti, R. (1998). Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 144(1): 83–93.
- Stocco, D. M., McPhaul, M. J. (2006). Physiology of testicular steroidogenesis. In:

- Neils.J.D.,Plant, M.T., Donald, W.P., Challis, J.G.C., de Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. Eds. Knobil and Neill's Physiology of reproduction, third ed. Academic Press, St. Louis, 829-983.
- Svechnikov, K., Supornsilchai, V., Strand, M.-L., Wahlgren, A., Seidlova-Wuttke, D., Wuttke, W., Söder, O. (2005). Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary-gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. *The Journal of Endocrinology*. 187(1): 117–124.
- Takashima-Sasaki, K., Komiyama, M., Adachi, T., Sakurai, K., Kato, H., Iguchi, T., Mori, C. (2006). Effect of Exposure to High Isoflavone-Containing Diets on Prenatal and Postnatal Offspring Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70(12): 2874–2882.
- Tresguerres, J. A., & Castillo, C. (2006). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. *Fisiología humana*. 3rd edición México: Mc Graw Hill-Interamericana; 2005. p. 1007-1015.
- Van der Spuy, Z. M. (1985). Nutrition and reproduction. *Clinics in Obstetrics and Gynaecology*. 12(3): 579–604.
- Veening, J. G., Coolen, L. M. (2014). Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: Emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 121(Supplement C): 170–183.
- Veening, J. G., Coolen, L. M., Gerrits, P. O. (2014). Neural mechanisms of female sexual behavior in the rat; comparison with male ejaculatory control. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 121: 16–30.

- Weber, K. S., Setchell, K. D., Stocco, D. M., Lephart, E. D. (2001). Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *The Journal of Endocrinology*. 170(3): 591–599.
- Wisniewski, A. B., Klein, S. L., Lakshmanan, Y., Gearhart, J. P. (2003). Exposure to Genistein During Gestation and Lactation Demasculinizes the Reproductive System in Rats. *The Journal of Urology*. 169(4): 1582–1586.
- William, K., Jafri, L. (2015). Mesquite (*Prosopis juliflora*) Livestock Grazing, Its Toxicity and Management. *Journal of Bioresource Management*. 2(2): 49-58.
- Williams, C. J., Erickson, G. F. (2000). Morphology and Physiology of the Ovary. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
- Zhao, R. Q., Zhou, Y. C., Ni, Y. D., Lu, L. Z., Tao, Z. R., Chen, W. H., Chen, J. (2005). Effect of daidzein on egg-laying performance in Shaoxing duck breeders during different stages of the egg production cycle. *British Poultry Science*. 46(2): 175–181.
- Zin, S. R. M., Omar, S. Z., Khan, N. L. A., Musameh, N. I., Das, S., Kassim, N. M. (2013). Effects of the phytoestrogen genistein on the development of the reproductive system of Sprague Dawley rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 68(2): 253–262.