



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00049

Matrícula: 2153803762

EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Leucaena leucocephala* EN LA CONDUCTA Y FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA DE LA RATA HEMBRA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 9 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

MTRA. GABRIELA LOPEZ  
DRA. LETICIA GONZALEZ NUÑEZ  
DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS  
DR. JOSE GERARDO PERERA MARIN

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: SERGIO JONATHAN ROMERO PALACIOS

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

*Aprobar*

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



*Sergio Jonathan Romero Palacios*

SERGIO JONATHAN ROMERO PALACIOS

ALUMNO

REVISÓ

*Lic. Julio Cesar de Lara Isassi*  
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

*Sara Lucia Camargo Ricalde*  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

*Gabriela Lopez*

MTRA. GABRIELA LOPEZ

VOCAL

*Leticia Gonzalez Nuñez*  
DRA. LETICIA GONZALEZ NUÑEZ

VOCAL

*Adriana Lizbeth Juarez Rojas*

DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS

SECRETARIO

*Jose Gerardo Perera Marin*

DR. JOSE GERARDO PERERA MARIN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

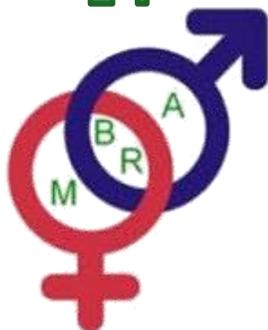
“Efecto del extracto de *Leucaena leucocephala*  
en la conducta y fisiología reproductiva de la  
rata hembra.”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN  
ANIMAL QUE PRESENTA EL: BIÓLOGO  
SERGIO JONATHAN ROMERO PALACIOS

DIRECTORA: DR. MARÍA SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ

ASESORA: M. EN C. SUSANA ROJAS MAYA

ASESORA: M. EN BIOL. EXP. GABRIELA LÓPEZ



CDMX, México. Febrero, 2018

## **COMITÉ TUTORAL**

### **Directora**

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

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

sretanam@gmail.com

### **Asesora**

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

Facultad de Veterinaria

Universidad Nacional Autónoma de México

srm@unam.mx

### **Asesora**

**M. en Biol. Exp. Gabriela López**

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

galo@xanum.uam.mx

## **Jurado**

M. en Biol. Exp. Gabriela López

Presidente

Departamento de biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. Gerardo Perera Marín

Secretario

Departamento de Endocrinología

Facultad de Veterinaria, UNAM

Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas

Vocal

Universidad Insurgentes

Dra. Leticia González Núñez

Vocal

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto Politécnico Nacional y a el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría con número CVU 717924 y por el apoyo para la compra de material utilizado en el desarrollo del proyecto de investigación “Efecto del extracto de *Leucaena leucocephala* en la conducta y fisiología reproductiva de la rata hembra” el cual estuvo a cargo de la Dra. María del Socorro I. Retana Márquez.

## **Aprobación de tesis**

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Efecto del extracto de *Leucaena leucocephala* en la conducta y fisiología reproductiva de la rata hembra” con fecha de 1 de diciembre del 2017.

M. en Biol. Exp. Gabriela López  
Presidente

Dra. Gerardo Perera Marín  
Secretario

Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas  
Vocal

Dra. Leticia González Núñez  
Vocal

## **Dedicatorias y agradecimiento**

Quiero agradecer infinitamente a todas las personas que estuvieron involucradas durante el desarrollo de mi maestría y de la escritura de esta tesis.

Agradezco a mis padres María Elena Palacios y Martín Romero porque sin ellos nada de esto sería posible, por estar conmigo en todo momento y por siempre invitarme a superarme día con día apoyando mis decisiones sean o no sean las correctas. Los amo.

Gracias a mi hermana Salma, es una de las razones por las que vivo y me hace vivir. Su simple presencia me hace feliz, sé que siempre estará conmigo y yo siempre con ella. Le dedico esta tesis.

Muchas a gracias a mis amigos Elizabeth, Alfredo, Daniel, Yosimar, Gustavo, Sarahí, Gelos, Jaqueline, Tania, Pablo, Arturo, Fannie, y Pepe por todos los momentos agradables que me hicieron pasar.

Con mención especial agradezco a Eunice y Flor por el infinito apoyo y por dejarme compartir con ellas momentos agradables y no tan agradables durante el desarrollo de mi proyecto, sin ellas todo me hubiera costado lo doble.

Gracias a la Doctora Retana por su apoyo y por invitarme siempre a conocer y dudar más, siempre la admiraré, es una de las mejores docentes que he tenido en mi vida. A mis asesoras, la maestra Gabriela y Susana por su disposición a ayudarme siempre. A mis sinodales, Dra. Lizbeth, Dra. Leticia y Dr. Perera por su ayuda en la corrección de esta tesis (que estoy seguro, les sacó varios sustos). Y nuevamente a la maestra Hortensia, por su gran apoyo en la parte histológica, y por inculcarme el

amor a la biología de la reproducción, ella siempre será una fuente de inspiración para mí (y estoy seguro de que para muchos de sus alumnos), siempre seré su más grande admirador.

Gracias a mi familia, mis abuelitas (Estela y Herminia), mis tías y tíos y todos mis primos y sobrinos, soy una persona afortunada en tener la familia que tengo. A la señora María Elena Valencia, su esposo, sus hijas y nietos, siempre cuentan conmigo y espero siempre contar con ustedes.

Y principalmente esta tesis está dedicada a David Sánchez, sin su apoyo, la elaboración de mi proyecto no tendría sentido, le agradezco con todo mi corazón por estar siempre conmigo y ayudarme cuando más lo he necesitado, por invitarme a siempre querer más y creer en mí. Por favor, síguelo haciendo y continuemos con nuestras locuras por toda la vida. Gracias David.

# Índice

<b>Índice</b>	1
<b>Índice de figuras</b>	4
<b>Resumen</b>	6
<b>Summary</b>	7
<b>1. Introducción.</b>	8
1.1 <i>Leucaena leucocephala</i>	8
1.2 Fitoestrógenos	10
1.3 Esteroidogénesis	13
1.3.1 Ovario y hormonas sexuales	15
1.4 Ciclo estral en rata	18
<b>2 Antecedentes</b>	22
<b>3 Planteamiento del problema</b>	26
<b>4 Justificación</b>	26
<b>5 Pregunta de investigación</b>	27
<b>6 Hipótesis</b>	27
<b>7 Objetivos</b>	28
7.1 Objetivo general	28
7.2 Objetivos específicos	28
<b>8 Materiales y métodos</b>	29
8.1 Materiales	29
8.1.1 Material biológico	29
8.2 Diseño experimental	29
8.2.1 Extracto de <i>Leucaena</i>	31
8.2.2 Ovariectomía bilateral	32
8.2.3 Citología vaginal y ciclo estral	32
8.2.4 Pruebas de conducta sexual femenina	33

8.2.5	Pesos ováricos y uterinos	34
8.2.6	Análisis morfológico	34
8.2.7	Evaluación hormonal	35
8.2.8	Análisis estadístico	36
<b>9</b>	<b>Resultados</b>	<b>38</b>
9.1	Hembras intactas	38
9.1.1	Progresiones de los ciclos estrales	38
9.1.2	Conducta sexual femenina	39
9.1.3	Niveles hormonales	40
9.1.4	Pesos	43
9.1.5	Epitelios vaginales	45
9.1.6	Epitelios uterinos	48
9.2	Hembras ovariectomizadas	51
9.2.1	Progresiones de los ciclos estrales	51
9.2.2	Parámetros de la Conducta sexual	53
9.2.3	Niveles hormonales	54
9.2.4	Pesos	56
9.2.5	Epitelios vaginales	58
9.2.6	Epitelios uterinos	60
<b>10</b>	<b>Discusión</b>	<b>62</b>
10.1	Hembras intactas	62
10.1.1	Progresión del ciclo estral	59
10.1.2	Conducta sexual	64
10.1.3	Niveles hormonales	65
10.1.4	Pesos	65
10.1.5	Grosor de epitelios vaginales y uterinos	65
10.2	Hembras ovariectomizadas	67

10.2.1 Epitelio vaginal	67
10.2.2 Conducta sexual	68
10.2.3 Pesos	69
10.2.4 Niveles hormonales	69
10.2.5 Grosor de epitelios vaginales y uterinos	70
<b>11 Conclusiones</b>	<b>72</b>
<b>12 Bibliografía</b>	<b>73</b>

## Índice de figuras y tablas

Figura 1.- <i>Leucaena leucocephala</i>	8
Figura 2.- Biosíntesis de hormonas esteroides y enzimas participantes	14
Figura 3.- Esteroidogénesis ovárica en las fases folicular y lútea	18
Tabla 1.- Principales cambios que ocurren en diferentes órganos y en la conducta sexual de la rata en los diferentes estadios del ciclo estral en la rata	21
Figura 4.- Diagrama de organización de los grupos experimentales	31
Figura 5.- Desarrollo	31
Figura 6.- Representaciones fotográficas de la escala de reflejos de lordosis utilizada en rata Long-Evans. Los números indican intensidad de clasificación de lordosis en una escala de 0-3	34
Figura 7.- Ciclos estrales representativos de los diferentes tratamientos en hembras gonado-intactas	38
Figura 8.- Conducta sexual en hembras intactas durante los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 de tratamiento.	39
Figura 9.- Concentración de estradiol (pg/mL) en hembras intactas en cada etapa del ciclo estral.	41
Figura 10.- Concentración de progesterona (ng/mL) en hembras intactas en cada etapa del ciclo estral	42
Figura 11.- Pesos corporales de hembras intactas durante el proestro y el diestro	43
Figura 12.- Pesos ováricos de hembras intactas	44
Figura 13.- Pesos vaginales de hembras intactas.	44
Figura 14.- Pesos uterinos de hembras intactas	45
Figura 15.- Espesor de los epitelios vaginales de hembras intactas	46
Figura 16.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios y músculos vaginales de hembras intactas en proestro	47
Figura 17.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios y músculos vaginales de hembras intactas en diestro	48
Figura 18.- Espesor de los epitelios vaginales de hembras intactas	49

Figura 19.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios y músculos uterinos de hembras intactas en proestro	50
Figura 20.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios y músculos uterinos de hembras intactas en diestro.	51
Figura 21.- Progresiones representativas de la citología de los epitelios vaginales para los diferentes grupos de tratamientos en hembras ovariectomizadas.	52
Figura 22.- Promedio de los parámetros de la conducta sexual en hembras ovariectomizadas durante los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 de tratamiento	53-54
Figura 23.- Concentración de estradiol (pg/mL) en hembras ovariectomizadas	55
Figura 24.- Concentración de estradiol (ng/mL) en hembras ovariectomizadas.	56
Figura 25.- Pesos corporales de hembras ovariectomizadas.	57
Figura 26.- Pesos vaginales de hembras ovariectomizadas	57
Figura 27.- Pesos uterinos de hembras ovariectomizadas	58
Figura 28.- Espesor de los epitelios vaginales de hembras ovariectomizadas para cada tratamiento.	59
Figura 29.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios y músculos vaginales de hembras ovariectomizadas	60
Figura 30.- Espesor de los epitelios uterinos de hembras ovariectomizadas para cada tratamiento.	61
Figura 32.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios y músculos uterinos de hembras ovariectomizadas	61

## Resumen

*Leucaena leucocephala*, es un arbusto perennifolio perteneciente a las leguminosas. Se utiliza con fines comestibles y como forraje; sin embargo, su uso como forraje se limita debido a que provoca daños físicos y reproductivos. Esta planta contiene fitoestrógenos como el kaempferol, la quercetina, la isoharmnetina y la luteolina, los cuales podrían ser responsables de los efectos antireproductivos. Los fitoestrógenos son moléculas no esteroideas que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar los cambios que ocurren en la fisiología reproductiva de la rata hembra por efecto del extracto de *L. leucocephala*. Se recolectaron hojas de la planta para obtener el extracto. Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa Wistar, en dos condiciones fisiológicas: hembras intactas y ovariectomizadas. Los grupos experimentales fueron: vehículo (0.5 ml de aceite de cártamo); extracto de *Leucaena*, (4 g/Kg en 0.55 ml); daidzeína (1.6 mg/Kg, en 0.5 ml de solución) y estradiol (40 µg/Kg, en 0.5 ml); la administración se realizó durante 30 días consecutivos por vía intraperitoneal, se evaluó la progresión de los ciclos estrales y la conducta sexual cada 5 días. Al finalizar los tratamientos se eutanisaron, se disectaron los aparatos reproductivos, se pesaron y fijaron. El suero sanguíneo se utilizó para evaluar la concentración de estradiol y progesterona por el método de ELISA.

Los resultados mostraron que, en las hembras intactas, el extracto modificó el ciclo estral, aumentó el peso y engrosó el epitelio en la vagina y disminuyó el peso corporal en ambas condiciones fisiológicas. En las hembras intactas las concentraciones de progesterona y la conducta sexual disminuyeron. En las hembras ovariectomizadas se indujo la conducta sexual, se incrementó el grosor epitelial en la vagina y disminuyó el peso corporal. Estos resultados indican que el extracto tiene efectos estrogénicos similares a los de daidzeína y al estradiol, tanto en hembras intactas como en ovariectomizadas.

## Summary

*Leucaena leucocephala*, commonly known as *guaje*, is a perennial tree or shrub legume, which is used mainly for edible purposes and as fodder; however, its use as forage is limited due to its anti-reproductive effects. The phytoestrogens contained in this plant (kaempferol, quercetin, isoharmnetin and luteolin) could be responsible for the antireproductive effects in animals. Phytoestrogens are non-steroidal molecules present in plants that can act as estrogen agonists or antagonists. Therefore the objective of this work was to determine the effects of *Leucaena leucocephala* extract on the reproductive physiology of the female rats treated with this legume. Plant leaves were collected to obtain the extract. Wistar adult female rats were used in two physiological conditions: intact and ovariectomized: the experimental groups for each condition were: vehicle (0.5 ml); *Leucaena* extract, (4 g/Kg in 0.55 ml); daidzein (1.6 mg/Kg, in 0.5 ml); and estradiol (40 µg/Kg, in 0.5 ml); the treatments were for 30 consecutive days, during which estrus cycles and sexual behavior were evaluated. At the end of the treatments rats were euthanized, and reproductive organs were obtained, weighed and fixed with paraformaldehyde at 4%. Serum concentration of estradiol and progesterone was analyzed by ELISA test.

The results showed that, in intact females, *Leucaena* extract modified the estrous cycle, increased the weight and thickened the vaginal epithelium. Body weight, serum progesterone concentrations and sexual behavior decreased. In ovariectomized females vaginal epithelium thickened, sexual behavior was promoted, while body weight decreased. These results indicate that the *Leucaena* extract has estrogenic effects which are similar to those of daidzein and estradiol, both in intact and ovariectomized females.

## 1. Introducción

### 1.1. *Leucaena leucocephala*

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, conocida popularmente como guaje, es uno de los árboles tropicales más comunes de México, tanto silvestre como cultivado, es un árbol o arbusto perennifolio perteneciente a las leguminosas (Fam. Fabaceae), que puede medir 3 hasta 12 m de altura con un diámetro de hasta 25 cm, con hojas alternas, bipinnadas, de 9 a 25 cm de largo, verde grisáceas y glabras; foliolos 11 a 24 pares, de 8 a 15 mm de largo, elípticos y algo oblicuos, su inflorescencia presenta cabezuelas, con 100 a 180 flores blancas, de 1.2 a 2.5 cm de diámetro; flor de 4.1 a 5.3 mm de largo; pétalos libres; cáliz de 2.3 a 3.1 mm (figura 1).



Figura 1.- *Leucaena leucocephala* (tomado de: <http://herbario.ual.es/portfolio-items/leucaena-leucocephala-lam-de-wit/>)

La *Leucaena* tiene sus orígenes en América Central y en la Península de Yucatán, donde su valor forrajero fue reconocido hace más de 400 años por los conquistadores españoles que llevaban la planta y las semillas en sus galeones a Filipinas para alimentar su ganado, desde ahí fue introducida a Indonesia, Malasia, Papúa Nueva Guinea y sureste de Asia; por lo que se ha naturalizado pantropical (Brewbaker y col., 1985). Se usa comúnmente como aromatizante, artesanal, colorante, combustible, comestible, maderable, medicinal, melífera y forrajera (29.2 % de materia fresca (Giang y col., 2016); 5 a 30 % de materia seca, 20 a 27 % de proteína, rico en calcio, potasio y vitaminas), tiene un porcentaje de digestibilidad de 60 a 70 %, también, el forraje de *Leucaena* es bajo en sodio y yodo, pero alto en  $\beta$ -carotenos. Los taninos en las hojas y especialmente los tallos de *Leucaena* reducen la digestibilidad de la materia seca y la proteína, pero mejoran el valor de la proteína.

Su uso como forrajera, sin embargo, es limitado debido a los efectos dañinos que puede causar daño en mamíferos, por ejemplo, debilidad, pérdida de peso, aborto, caída de pelo en caballos, mulas y burros y bocio (CONABIO: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/44-legum26m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/44-legum26m.pdf)).

Con respecto a sus características químicas obtenidas por comparación de datos físicos y espectrales (ultravioleta-visible, infrarroja, resonancia magnética nuclear y masas-tándem) (Chen y Wang, 2011) el extracto metílico de *Leucaena* está conformado por 14 compuestos dentro de los cuales se encuentran cuatro son esteroides:  $5\alpha$ ,  $8\alpha$ -epidioxi-( $24\xi$ )-ergosta-6,22-dien- $3\beta$ -ol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostenona y

estigmastenona; un triterpeno: lupeol; un glicérido: 1,3-dipalmitoil-2-oleil glicerol; un alcaloide:  $\beta$ -N-3-hidroxi-4-piridona; dos benzenoides: metilparabeno y ácido isovanílico; y cinco clorofilas: feofitina-a, metiléster feofórbido, metil-13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-S)-feofórbido-b, 13<sup>2</sup>-hidroxi-(13<sup>2</sup>-S)-feofitina-a y aristofilo-C. También se hace mención que esta planta tiene contenido de fitoestrógenos como el kaempferol, la quercitina, la isorhamnetina y la luteolina (Hassan y col., 2014)

En algunas investigaciones se describe a *Leucaena* como árbol multipropósito; sin embargo, aunque es un consenso generalizado, que el follaje de la especie presenta una buena composición química en términos de proteína y de minerales, se ha observado una elevada variabilidad en los indicadores de calidad de todos los cultivares estudiados, asociada a las características de cultivo; así como a la interacción de estas con el medio circundante y su composición química (Ludueña, y col., 2007).

### 1.1. Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son productos de origen vegetal con actividad natural bactericida y fungicida. La familia incluye varios miembros como: las flavonas (kaempferol y quercitina), isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina y equol), lignanos (enterolactona, enterodiol y ácido nordihidroguaiarético), coumestanos (coumestrol), micotoxinas (zearalonona) y estilbenos (resveratrol) (Zhao y Mu, 2010). La característica común de los fitoestrógenos es que son moléculas no esteroideas y que poseen una estructura difenólica heterocíclica (Branca, 2003), a la que se encuentran unidos grupos oxo, ceto, hidroxi y ésteres de metilo. Desde el punto de

vista funcional, se trata de sustancias similares al 17  $\beta$ -estradiol por el anillo fenólico que presentan y a los Moduladores Selectivos de los Receptores Estrogénicos (SERM), ya que están dotados de actividad estrogénica (Hernández-Elizondo, y col. 2009).

Los fitoestrógenos poseen una larga data en la historia de la ciencia. Frecuentemente son mencionados como estrógenos débiles, fueron sintetizados químicamente antes de conocerse la estructura de los esteroides de mamíferos, en los años 1920-1930. Un poco más tarde, Windaus recibió el premio Nóbel por este descubrimiento a pesar de que fue una estructura errónea (Windaus, 1932). En 1940 los fitoestrógenos resurgieron como principios estrogénicos en el trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) que causó infertilidad en ovejas en el oeste de Australia (Barnes, 2004).

El primer fitoestrógeno se encontró en un alga verde-azulada (cianobacteria) que habita las playas de ríos y lagos y podría ser el resultado de una deshidrogenación introduciendo dobles enlaces en los anillos esteroideos. Existen por lo menos 220 especies de vegetales que contienen fitoestrógenos (Ludueña y col., 2007).

La importancia de todos los fitoestrógenos radica principalmente en que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos (Whitten y col., 2002), ya que al igual que los estrógenos, ejercen su influencia en tejidos donde existen receptores para estrógenos, tanto en el macho como en la hembra (Rosselli y col., 2000).

Las isoflavonas son una subclase de flavonoides con una estructura química similar a la del estradiol en la cual ambas contienen al menos un anillo fenólico en su

estructura. Existen tres formas libres mayoritarias de isoflavonas: Genisteína, Daidzeína y Gliciteína y dos minoritarias: Formononetina y Biochanina A (Committee on Toxicity, 2003).

Los fitoestrógenos tienen más afinidad por los receptores beta ( $ER\beta$ ) que por los receptores alfa ( $ER\alpha$ ) (Whitten y *col.*, 2002) por lo que, dada la diferente distribución de los receptores alfa y beta, cabe esperar que sus acciones sean más marcadas en aquellos órganos y tejidos diana en los que predominan los receptores beta, como son el sistema nervioso central, el hueso, la pared vascular y el tracto urogenital, de la misma forma que al no tener casi acción sobre el  $ER\alpha$  se limitaría la proliferación del tejido mamario y endometrial (López-Luengo, 2002).

En las plantas, las isoflavonas específicas presentes varían ampliamente y con regularidad se acumulan sólo bajo condiciones específicas de estrés. Los mecanismos por los cuales estos fitoestrógenos influyen sobre la producción hormonal, metabólica y acciones biológicas parecen depender de sus propiedades agonistas-antagonistas estrogénicas. Se postula que estos químicos vegetales poseen dos acciones biológicas importantes: la unión a receptores de hormonas y a enzimas metabolizantes de hormonas. Las isoflavonas están presentes predominantemente como glicósidos y en consecuencia son compuestos altamente polares (Ludueña y *col.*, 2007).

Por lo anterior es importante conocer el proceso por el cual se sintetizan las hormonas sexuales femeninas (esteroidogénesis), para así conocer el efecto que podrían tener los fitoestrógenos en la fisiología reproductiva

## 1.2. Esteroidogénesis

Las hormonas esteroides se clasifican en esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos), glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona). Se sintetizan principalmente en las glándulas suprarrenales (glucocorticoides y mineralocorticoides), en las gónadas (andrógenos, estrógenos y progestágenos), en la placenta (progestágenos) y en el sistema nervioso central (neuroesteroides). Su principal efecto es sobre la homeostasis corporal al modular diversas funciones como son la reproductiva, incluyendo el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, entre otros. La esteroidogénesis puede estar sujeta a una regulación a corto o largo plazo dependiendo del tejido. En las gónadas y en las glándulas suprarrenales la regulación es aguda, en tanto que en el cerebro y en la placenta es crónica. Los dos tipos de regulación pueden estar bajo el control de diversos factores u hormonas, que en el caso de la respuesta aguda inicia en el orden de minutos e implica la movilización del colesterol hacia la mitocondria (Hu y *col.*, 2010) y su translocación de la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde ocurre la síntesis de pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (CYP11A1) derivándose de está las demás hormonas esteroides (figura 2) (Gómez-Chang y *col.*, 2012).

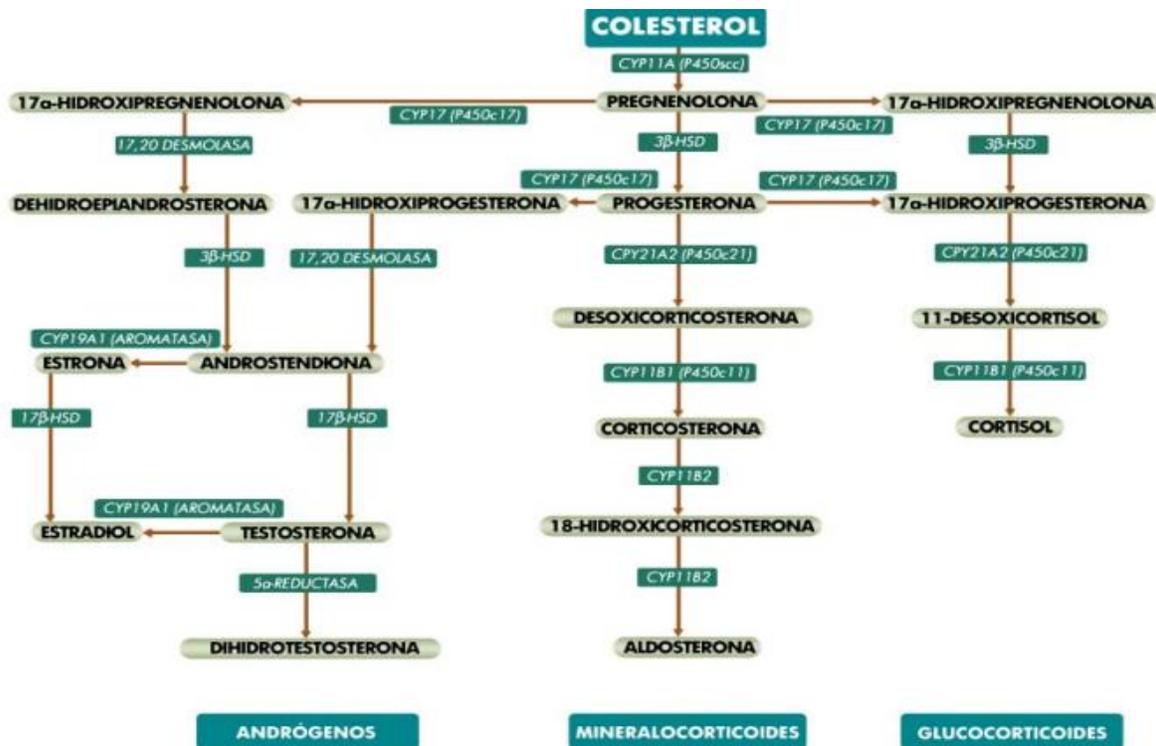


Figura 2.- Biosíntesis de hormonas esteroides y enzimas participantes (tomado de:

Gómez-Chang y col., 2012)

La cascada de señalización más estudiada en la esteroidogénesis es la mediada por la cinasa de proteínas (PKA) dependiente del adenosín monofosfato cíclico/AMPC. El efecto agudo de las hormonas tróficas como la FSH y LH incrementan el contenido intracelular de AMPC activando a la PKA, la cual fosforila proteínas involucradas en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, como es el caso de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein), cuya expresión aumenta por el efecto hormonal que promueve la esteroidogénesis en gónadas y corteza suprarrenal (Granot y col., 2003). Por lo contrario, la respuesta crónica por hormonas tróficas (FSH y LH) se inicia en el transcurso de horas e involucra también la participación de PKA a través de la fosforilación de factores de transcripción relacionados con la activación de genes que codifican para enzimas esteroidogénicas, además de la

proteína StAR (Manna y *col.*, 2009). La vía mediada por PKA/AMPc es la principal cascada estimulada en los diferentes tejidos esteroideogénicos; sin embargo, hay evidencias de la participación de otras vías de señalización activadas tanto por hormonas como por factores derivados de macrófagos y factores de crecimiento que actúan a través de PKA o bien a través de otras vías independientes de AMPc y que pueden estar mediadas por la proteína cinasa dependiente de calmodulina (PKC), iones de cloruro y calcio, metabolitos derivados del ácido araquidónico o proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Cabe mencionar que las respuestas generadas independientemente de las concentraciones de AMPc, suelen ser poco potentes comparadas con las que son mediadas por PKA/AMPc, por lo que su efecto se relaciona con la modulación o potenciación de la esteroideogénesis actuando en forma sinérgica con PKA. Cualquiera que sea la cascada de señalización activada, destaca la importancia de los eventos de fosforilación o desfosforilación de sustratos específicos por proteínas cinasas y fosfatasas, respectivamente, con efectos pleiotrópicos sobre diferentes funciones celulares como son el metabolismo, crecimiento, la diferenciación y la esteroideogénesis (Gorostizaga y *col.*, 2007).

### 1.2.1. Ovario y hormonas sexuales

El ovario se divide en tres regiones: la corteza externa conformada por el epitelio germinal y los folículos; la médula localizada en la región central del ovario e integrada por tejido estromal y la región del hilio (Carr, 1998). Las células esteroideogénicas dentro del ovario corresponden a las células de la granulosa, las cuales forman parte del compartimento vascular que rodea a los ovocitos y las

células de la teca que están ubicadas en el estroma ovárico. Ambos compartimentos están separados por la lámina basal. Las funciones principales del ovario son la ovogénesis y la síntesis de hormonas esteroides. La unidad funcional del ovario es el folículo, el cual está constituido por células de la granulosa, de la teca e intersticiales que rodean al ovocito en crecimiento, funcionando como soporte nutricional además de llevar a cabo la síntesis de hormonas esteroides. El ovario secreta esteroides como la pregnenolona, progesterona,  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona,  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona, androstendiona, testosterona, estrona y  $17\beta$ -estradiol (Gómez-Chang, 2012). Bajo el estímulo de hormonas, factores de crecimiento y citocinas, la biosíntesis de esteroides cambia cualitativa y cuantitativamente a lo largo del ciclo ovárico, presentando una intensa actividad esteroidogénica durante la fase lútea y pasando de ser un órgano principalmente productor de estrógenos a uno predominantemente secretor de progesterona. En el humano, la esteroidogénesis ovárica ocurre de acuerdo con la teoría de dos células/dos gonadotropinas. La producción de estrógenos por las células de la teca, requiere de la síntesis de precursores androgénicos (androstendiona) a partir del colesterol, bajo la acción de la LH. Los andrógenos difunden hacia el compartimento avascular de las células de la granulosa. A este nivel, y por efecto de la FSH, los andrógenos son biotransformados a estrógenos por acción de la aromatasa (CYP19) (Havelock y *col.*, 2004). En la fase lútea, el compartimento ocupado por las células de la granulosa se vasculariza, permitiendo así el aporte de colesterol, aunado a un incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas que resulta en el aumento de la producción de progesterona y estrógenos derivados de los andrógenos de la

teca (Figura 3). En el ovario, las células de la granulosa, por acción de la FSH, constituyen la principal fuente de estrógenos requeridos para el crecimiento, la ovulación y el desarrollo de las características sexuales secundarias, entre otras. Durante la fase lútea o progestacional del ciclo ovárico, las células de la granulosa luteinizadas se encargan de la producción de progesterona, hormona responsable de los cambios durante la fase lútea del ciclo menstrual y esencial para el mantenimiento del embarazo (Hu y col., 2010). Una vez ocurrida la ovulación, las células del folículo ovárico van a constituir el cuerpo lúteo, el cual sintetiza predominantemente progesterona en respuesta a la LH, a través de la vía AMPc/PKA. Como en otras células esteroidogénicas, existen otras vías de señalización que se activan en forma dependiente de AMPc pero independiente de PKA, como en las células de la granulosa, donde a través de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (dependientes de AMPc) se activan también las vías de MAPK, PI3-K y PKB. La participación MAPK ha sido implicada en la regulación de la esteroidogénesis utilizando LH y hCG, las que además de elevar las concentraciones de AMPc, activan a ERK1/2 (quinasas efectoras de MAPK) en células de la granulosa luteinizadas. También se ha observado que, durante la luteinización de las células de la granulosa, la secreción de progesterona inducida por hCG coincide con un descenso en la expresión de la subunidad catalítica de PKA, lo que sugiere que durante la luteinización de las células de la granulosa la síntesis de progesterona es menos dependiente de PKA (Chin y Abayasekara, 2004).

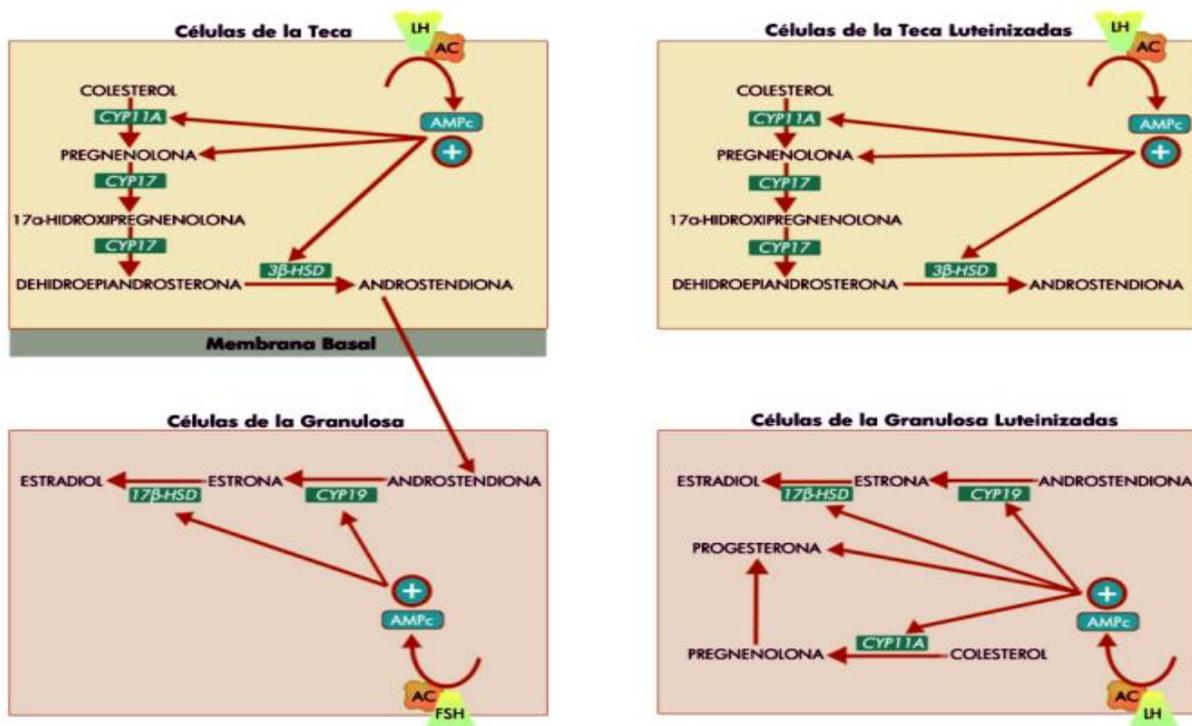


Figura 3.- Esteroidogénesis ovárica en las fases folicular y lútea (Tomado de: Gómez-Chang y *col*, 2012).

### 1.3. Ciclo estral en rata

El ciclo estral, es regulado principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Scandroglio y Spitali, 1968; Caligioni, 2009); comprende una serie de cambios cíclicos que se manifiestan a nivel de ovario, útero y vagina. Estos cambios son mediados por las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) las cuales estimulan al ovario para la síntesis de hormonas esteroides (estrógenos y progesterona), lo que causa las siguientes cuatro fases del ciclo estral: proestro, estro, metaestro y diestro; cada una de ellas tiene una duración y características citológicas que hacen evidente el estado fisiológico del ciclo sexual (Goldman y *col.*, 2007).

Las ratas hembras contienen en sus ovarios (desde antes de nacer) miles de ovocitos primarios, arrestados en el leptoteno de la profase I de la primera división meiótica. Al llegar a la pubertad (36-39 días de edad) (Arata y col., 1981), los ovarios (con alrededor de 3000 folículos primarios cada uno) se activan por la estimulación hormonal y cada 4 o 5 días un grupo de ovocitos sigue su desarrollo para la maduración de los ovocitos.

Al conjunto formado por el ovocito, rodeado por una sola capa de células planas (pregranulosa), se le denomina folículo primordial. En su desarrollo posterior, la capa de células que circunda al ovocito sufrirá procesos de diferenciación y proliferación, dando lugar a células cúbicas (granulosa), formando los folículos primarios, con una sola capa de células foliculares. Posteriormente, el folículo continuará la maduración para desarrollar el folículo secundario, formado por más de una capa de células foliculares; en tanto que los folículos terciarios se caracterizan por presentar entre las células foliculares, las vesículas de Call-Exner y folículo preovulatorio o folículo De Graaf, con la diferenciación de la capas interna y externa de las células de la teca, la formación de la cavidad del antro folicular y los cambios funcionales que condicionarán su desarrollo hasta la ovulación, evento desencadenado por el efecto de la progesterona (Pallarés, 2009).

En la ovulación, las células del folículo ovárico se luteinizan, lo que origina la formación del cuerpo lúteo, lo que indica el número de ovocitos liberados. Justo antes de la liberación del ovocito se completa la primera división meiótica y se forma el primer cuerpo polar. La segunda división meiótica empieza inmediatamente

después, pero se detiene en la metafase II. Los óvulos permanecen viables por 10-15 horas luego de la ovulación y en el caso de que se produzca la fertilización se induce la terminación de la segunda división meiótica; lo que genera el segundo cuerpo polar. En términos estrictos, las células germinales femeninas no son en ningún momento haploides, ya que expulsan el segundo cuerpo polar en el momento en que reciben el grupo haploide de cromosomas proveniente del espermatozoide (Benavides y Guénet, 2003).

El efecto de las hormonas esteroidales (estrógenos y progesterona), desencadenan además cambios a nivel de útero y vagina.

El efecto secuencial de los estrógenos y progesterona en el útero provoca la hidratación de endometrio, así como el crecimiento glandular y el desarrollo de las condiciones de receptividad del endometrio, necesarias para que la implantación se lleve a cabo; en tanto que, a nivel de la vagina, se desencadenan cambios cíclicos de las células epiteliales de la vagina.

Los cambios de las células del epitelio vaginal se han utilizado como un método para determinar las fases de los ciclos reproductivos en mamíferos. Además, la citología vaginal proporciona un índice del estado funcional de los cambios cíclicos del ovario y útero. Estos cambios provocan efectos temporales en la conducta reproductiva, el consumo de alimentos y fluidos, la actividad locomotora que varían marcadamente con el estado del ciclo estral (Pallarés, 2009).

Los principales cambios que ocurren en las distintas fases del ciclo estral a nivel de ovario, útero, vagina y conducta se presentan resumidos en la siguiente tabla (Rodríguez y Pásaro, 1998):

Tabla 1.- Principales cambios que ocurren en diferentes órganos y en la conducta sexual de la rata en los diferentes estadios del ciclo estral en la rata (modificado, Rodríguez y Pásaro, 1998).

FASE	OVARIO	ÚTERO	VAGINA	CONDUCTA
Proestro	Crecimiento rápido de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido con fluido aumentando su tamaño.	Epitelio grueso. Células epiteliales superficiales. Frotis vaginal con abundancia de células epiteliales.	Estado receptivo a la copulación hacia el final de proestro  Poca receptividad a la copulación.
Estro	Maduración de folículos. Ovulación.	Máxima distensión. Inicio de degeneración vacuolar del epitelio uterino.	Epitelio grueso. Capa de células cornificadas en superficie. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas.	de teratización.
Metaestro	Formación de cuerpos lúteos.	Alguna degeneración vacuolar, pero también regeneración.	Descamación del epitelio cornificado. Epitelio delgado. Invasión de leucocitos. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas y	No hay receptividad.
Diestro	Crecimiento de los cuerpos lúteos. Folículos de varios tamaños.	Regeneración del epitelio uterino.	Epitelio delgado. Regeneración del epitelio. Frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales.	No hay receptividad.

## 2. Antecedentes

Los efectos que los fitoestrógenos tienen en la reproducción son variados, van desde la disminución de la conducta sexual, alteraciones en la expresión de receptores para estradiol y progesterona, hasta infertilidad. El coumestrol genera menor expresión de los receptores para progesterona (PR) inducidos por estradiol en los núcleos paraventricular y ventromedial, áreas que regulan el comportamiento sexual y la secreción de gonadotropinas en las hembras (Jacob y *col.*, 2001). También se ha reportado que en ratones hembras el coumestrol antagoniza la acción del estradiol mediante la regulación del ARNm para el ER $\beta$  en el núcleo paraventricular (Jacob y *col.*, 2001). De igual manera, se ha observado que a medida que se incrementa la dosis de genisteína y coumestrol, se inducen folículos hemorrágicos, abortos, síndrome estrogénico, y supresión de picos de hormona luteinizante (LH) en las hembras, mientras que en los machos se altera el desarrollo testicular y disminuye el recuento de espermatozoides en animales domésticos (Pérez y *col.*, 2006).

Se ha tratado de aprovechar el efecto de los fitoestrógenos con resultados poco alentadores. La premisa en la cual se basan estos estudios es que a través del uso de los fitoestrógenos es posible aumentar la frecuencia de estros en el ganado vacuno, lo que podría tener un impacto positivo en la producción de productos cárnicos o lácteos. Sin embargo, los resultados son totalmente diferentes. Así, en vacas Holstein que consumieron 25 a 100 mg/kg de zearalenona por 42 días, mostraron genitales externos edematosos, como si fuesen a presentar un estro

fisiológico. Sin embargo, la duración del ciclo estral o el tiempo en el que se presenta permanecieron inalterados (Mirocha y *col.*, 1978).

Los fitoestrógenos tienen efectos opuestos a los del estradiol en la rata, ya que incrementa la expresión del RNAm para ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Whitten y *col.*, 2002). Además, pueden influenciar de manera negativa los ciclos foliculares en los ovarios de los diferentes mamíferos, compitiendo con el estradiol por los ER $\beta$ , presentes de manera abundante en las células de la granulosa, lo que disminuye el efecto de los estrógenos en los folículos debido a la competencia hacia los receptores a estrógenos (ER) (Whitten y Patisaul, 2001).

El impacto de la ingesta de dietas con alto contenido de fitoestrógenos en la agricultura, puede ejemplificarse con lo sucedido en Australia. Rebaños de ovejas que fueron alimentados con pastura que contenían trébol rojo vieron afectadas su capacidad reproductiva de tal forma, que cerca de un millón de ovejas no pudieron procrear, lo que disminuyó entre 5 a 8% las ganancias brutas al considerar las pérdidas en inversión, alimentación, cuidados, e incluso compra de ganado, además de la disminución en la producción de lana y la necesidad de comprar e importar animales (Adams, 1995).

Se sabe que durante muchos años el pastoreo en ciertos campos de trébol causó infertilidad en ovinos y bovinos debido a las altas cantidades de formononetina presente en el trébol que se convierte en daidzeína en el rumen (Bennetts y *col.*, 1946). Recientemente se ha discutido que los fitoestrógenos contenidos en el trébol producen alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario a través de su unión a los

ER en el hipotálamo (Adams y Martin, 1983). Los fitoestrógenos pueden incluso afectar la implantación del blastocisto en ratas debido al efecto que causan en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada por la unión a dichos receptores. (Wu y col., 2004).

En los últimos 50 años, *Leucaena leucocephala* ha sido estudiada profundamente en diversas condiciones edafoclimáticas, generándose tecnologías viables para su manejo desde la siembra en vivero hasta su explotación con animales (García, 2008).

Durante los años setenta y principios de los ochenta, *Leucaena leucocephala* fue conocida como el 'árbol milagroso' debido a su éxito mundial como árbol forrajero de larga vida y altamente nutritivo: así como, su gran variedad de otros usos. Además del forraje, la leucaena puede proveer leña, madera, alimento humano, abono verde, sombra y control de la erosión. Se estima que cubre entre 2 y 5 millones de hectáreas en todo el mundo (Brewbaker y Sorensson 1990). Sin embargo, una mejor comprensión de sus limitaciones, nos ha dado una visión más equilibrada del valor de esta especie.

Como muchas especies de leguminosas, *Leucaena leucocephala* cuenta con una cantidad considerable de proteínas (29.2 %) (Giang y col., 2016), carbohidratos (40.5 %) (Alabi y Alusa, 2006), carotenos, minerales y vitaminas (Machado y col., 1978, Giang y col., 2016); así como la presencia de fitoestrógenos como kaempferol, quercitina, (flavanoles), isorhamnetina y luteolina (flavonas) (Hassan y col., 2014); sin embargo se ha comprobado que tiene efectos negativos en el ganado pues provoca alteraciones en la reproducción; además; tienen un uso antifertilidad en la medicina

tradicional (Burawat y col., 2016). En los bovinos que son alimentados con esta planta, provoca baja tasa de concepción y poca motilidad de los espermatozoides (Akingbade y col., 2002); en cabras y cerdos se han reportado abortos espontáneos (Sastry y Singh, 2008; Panter y Stegelmeier, 2011), en conejos se ha observado un decremento en la motilidad y la concentración de espermatozoides (Herbert y col., 2005) y en ratas macho provoca una disminución del libido e infertilidad, atrofia seminiforme (Burawat y col., 2016), así como, fetos muertos y reabsorción fetal (Joshi, 1968). Los humanos utilizan como anticonceptivo y abortivo (Aderibigbe y col., 2011), por lo que se sugiere que *Leucaena leucocephala* causa un efecto similar al de los fitoestrógenos (Retana-Márquez y col., 2016).

Por lo anterior, es de suma importancia cuantificar los efectos que provoca *Leucaena leucocephala* en el sistema reproductor de animales, debido a su utilización como forraje. De esta manera se podrá evaluar si sus efectos son perjudiciales o no en la reproducción de los organismos que sean alimentados con esta planta.

### **3. Planteamiento del problema**

La actividad reproductiva en algunos animales, como es el caso de los rumiantes, es influenciada en parte por el tipo de dieta que ingieren, debido a la cantidad de fitoestrógenos presentes en las plantas forrajeras y se sabe que la dieta está fuertemente asociada con la reproducción. Con base en estas dos premisas, el tipo de forraje consumido es importante para la fisiología reproductiva de los animales domésticos.

#### **Justificación**

En la actualidad *Leucaena leucocephala* se utiliza como forraje para el ganado a nivel mundial, debido a su alto contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales. Sin embargo, dado que contiene varios fitoestrógenos esta leguminosa genera reacciones que afectan diferentes parámetros reproductivos, lo que la hace importante para estudio en la fisiología reproductiva de los animales.

Luego entonces para poder dar un paso adelante sobre el efecto que genera el extracto de *Leucaena* en parámetros reproductivos, el presente trabajo utilizó a la rata hembra como modelo biológico

#### **4. Pregunta de investigación**

¿Qué efecto tiene la administración del extracto crudo de *Leucaena leucocephala* en la conducta de apareamiento o receptividad sexual y en algunos aspectos de la reproducción de la rata hembra?

#### **5. Hipótesis**

- La administración del extracto crudo de *Leucaena leucocephala* causará en la rata hembra intacta disminución en la receptividad al macho, en el ciclo estral, en el grosor del epitelio uterino y vaginal y en los niveles circulantes de estradiol y progesterona.
- La administración del extracto crudo de *Leucaena leucocephala* en ratas hembras ovariectomizadas tendrá efectos estrogenizantes en la conducta copulatoria, en el ciclo estral, en el grosor del epitelio uterino y vaginal y aumento en los niveles circulantes de estradiol y progesterona.

## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo general

- Determinar los cambios que ocurren en algunos parámetros reproductivos de la rata hembra por efecto del extracto de *Leucaena leucocephala*.

### 6.2. Objetivos específicos

- Evaluar las alteraciones en la conducta sexual de la rata hembra por el efecto del extracto de *Leucaena leucocephala*.
- Evaluar los cambios que ocurren en algunos parámetros reproductivos de la rata hembra por efecto de la daidzeína y del extracto de *Leucaena leucocephala*.
- Comparar los efectos del extracto de *Leucaena leucocephala* con los de la daidzeína y el estradiol provocados sobre algunos aspectos reproductivos de la rata hembra.

## 7. Materiales y Métodos

### 1.1. Materiales

#### 1.1.1. Material biológico

Todos los procedimientos experimentales utilizados en este estudio fueron aprobados por la Comisión de ética de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa de acuerdo con la Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

El efecto biológico del extracto de *Leucaena leucocephala* se analizó en ratas (*Rattus norvegicus*) hembra adultas jóvenes de la cepa Wistar, de dos meses y medio (intactas) y 3 meses y medio (ovariectomizadas) de edad, con peso corporal entre 200 y 250 g. Estas se mantuvieron en cajas de acrílico con dimensiones de 50x30x20 cm, 6 animales por caja. Las ratas se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y se mantuvieron en un cuarto de bioterio con un ciclo invertido de luz-oscuridad (12:12, la luz se apaga a las 10:00 horas) y temperatura controlada ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*.

#### 1.2. Diseño experimental

Los efectos del extracto de *Leucaena leucocephala* y de daidzeína se probaron en dos condiciones fisiológicas: en hembras intactas y en hembras ovariectomizadas (OVX). Para ellos, el grupo de:

animales se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos (n=6 por grupo): 1) Intactas/vehículo (control negativo), con administración de aceite de cártamo (0.5 ml); 2) Intactas/extracto de leucaena, con administración de extracto concentrado de leucaena (4 g/Kg en 0.55 ml de aceite); 3) Intactas/daidzeína, con administración de daidzeína (1.6 mg/Kg, en 0.5 ml de solución); 4) Intactas/estradiol (control positivo), con administración de Estradiol (40 µg/Kg, en 0.5 ml de aceite); 5) OVX/vehículo, con administración de aceite de cártamo (0.5 ml); 6) OVX/extracto de leucaena, con administración de extracto concentrado de leucaena (4 g/Kg en 0.55 ml de aceite); 7) OVX/daidzeína, con administración de daidzeína (1.6 mg/Kg, en 0.5 ml de aceite); 8) OVX/estradiol, con administración de Estradiol (40 µg/Kg, en 0.5 ml de aceite). Las dosis del extracto fueron elegidas comparadas con el consumo de forraje del ganado por kilogramo de peso y las de Estradiol y Daidzeína por las evidencias del efecto que se han tenido en el laboratorio de investigación de este proyecto (ver figura. 4).

Se utilizaron hembras ovariectomizadas para conocer el efecto que los fitoestrógenos tienen en ausencia de hormonas sexuales femeninas endógenas, es decir, el efecto puro del extracto.

Las ratas se habituaron durante 15 días. Los tratamientos fueron administrados por vía subcutánea durante 30 días, al mismo tiempo, se realizaron frotis vaginales diariamente y se evaluó la conducta sexual femenina (proceptividad y receptividad) cada 5 días. Al finalizar los 30 días, las ratas recibieron la eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico e inmediatamente se colectaron 3 mL de sangre

para la cuantificación de estrógenos y progesterona y posteriormente se colectaron los órganos reproductivos para su evaluación histológica.

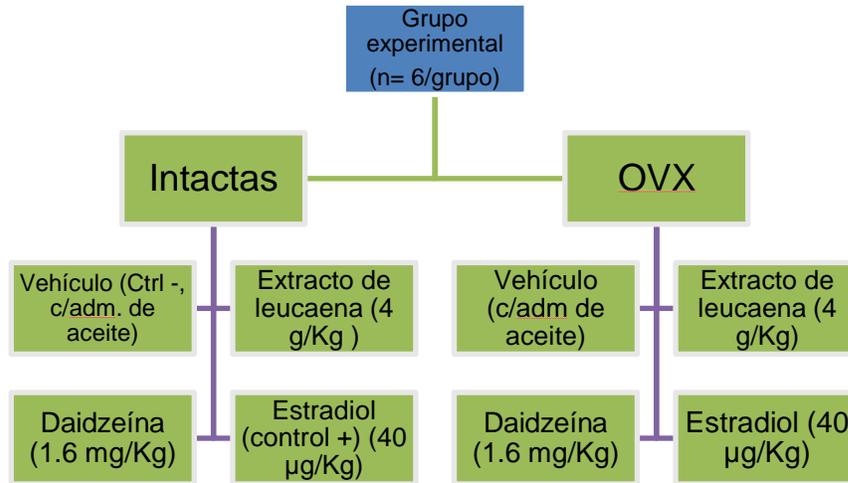


Figura 4.- Diagrama de organización de los grupos experimentales. Se muestran los ocho grupos experimentales con las especificaciones para cada uno de los tratamientos. El número entre paréntesis es el número de grupo, con administración de aceite (c/adm de aceite).

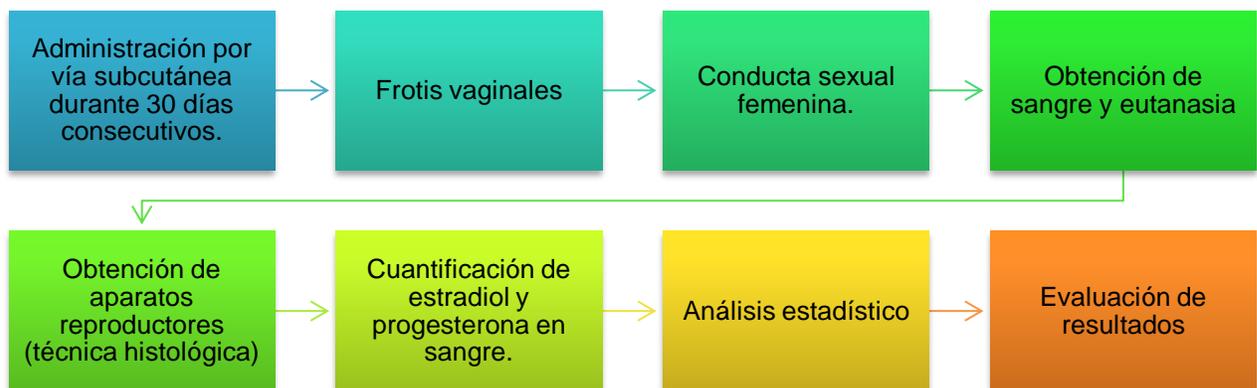


Figura 5.- Desarrollo

### 8.2.1 Extracto de *Leucaena*.

Las hojas de *Leucaena leucocephala* fueron colectadas en la Universidad Autónoma Antonio Narro en Torreón, Coahuila en las coordenadas 25° 33' 16" N, 103° 22' 24" W en el mes de junio, antes de la época de lluvia.

La para la obtención del extracto crudo de *L. leucocephala* las hojas del arbusto fueron secadas en horno a 60°C por un periodo de 24 horas, al finalizar se molieron. Enseguida se preparó un extracto total hasta agotamiento en extractores de tipo Soxhlet marca Kimax con etanol absoluto. El etanol se evaporó por destilación a 78-87°C por medio de un rotavapor. Del peso total húmedo (1354.14 g) se obtuvo un volumen de 945 mL, la relación peso volumen obtenido fue de 1 g de hojas húmedas es igual a 0.697 mL de extracto.

### 8.2.2 Ovariectomía bilateral.

Las ratas fueron ovariectomizadas de acuerdo al método descrito por Retana-Márquez y col, 2012, para ello las ratas fueron anestesiadas con ketamina (0.9 mg/g de peso corporal). Se realizaron incisiones en los costados de las ratas para localizar y extirpar cada uno de los ovarios. Este procedimiento se efectuó a los 2 meses y medio de edad; se les dejó recuperar por dos meses, un periodo suficiente para asegurar que los niveles de hormonas ováricas estuvieran totalmente depletados.

### 8.2.3 Citología vaginal y ciclo estral.

Se realizaron frotis vaginales para evaluar el ciclo estral de las ratas. 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 las hembras para obtener células epiteliales. Las muestras obtenidas se colocaron en un portaobjetos para su tinción en hematoxilina-eosina y posteriormente observados a través de un microscopio óptico (Olympus CX41) para ser evaluados de acuerdo al método descrito por Retana-Márquez y col, 2012. Los frotis vaginales se obtuvieron una hora antes del inicio de la fase oscura. Se identificaron las diferentes etapas del ciclo estral de acuerdo con la citología vaginal observada como proestro (presencia de células nucleadas), estro (presencia de células cornificadas), metaestro (presencia de células cornificadas y leucocitos) y diestro (presencia de leucocitos).

#### 8.2.4 Pruebas de conducta sexual femenina.

La conducta sexual femenina se evaluó mediante la prueba de Lehman y Erskine, 2004 en un redondel (40x40x50cm) utilizando machos sexualmente expertos (n=30). Los machos se alternaron durante los días de prueba. Las pruebas se realizaron durante las primeras tres horas de la fase oscura y con luz roja. En cada prueba se evaluó la proceptividad caracterizada por movimiento rápidos de orejas, saltos y caminatas rápidas, y la receptividad por presencia de dorsiflexión. La receptividad de cada hembra se determinó mediante el cociente lordótico  $[LQ = (\text{número de lordosis} / 10 \text{ montas}) \times 100]$ . La intensidad de la lordosis (grado de dorsiflexión) se basó en el grado de dorsiflexión espinal y el grado en que la cabeza se alinea en un plano vertical, de acuerdo con la siguiente escala: (0) sin dorsiflexión; (1) ligera dorsiflexión y ligero movimiento vertical de la cabeza; (2) dorsiflexión moderada

acoplada con el movimiento vertical de la cabeza; (3) dorsiflexión extrema acoplada al movimiento vertical de la cabeza (figura 5).

La proceptividad en la hembra se evaluó determinando la incidencia de saltos, movimientos rápidos y agitación de las orejas. Se considera que una hembra está receptiva si presenta dos de estas conductas durante el periodo de prueba. La conducta sexual femenina fue evaluada los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 de tratamiento.

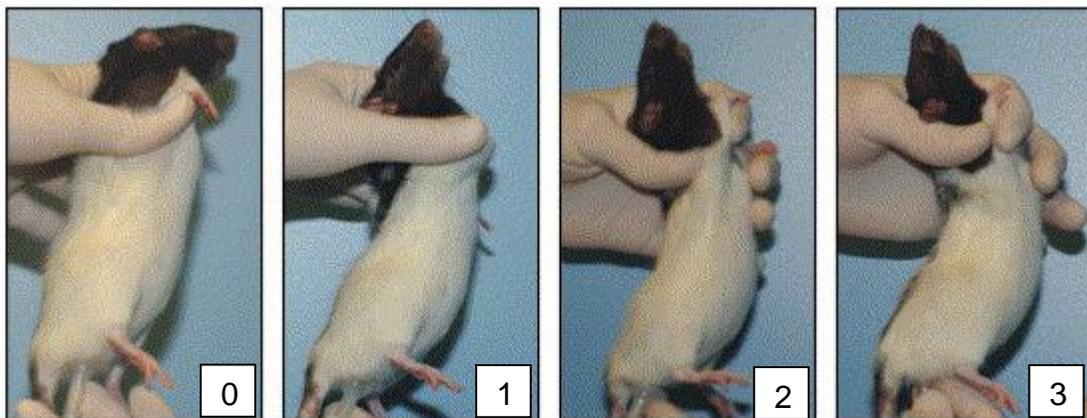


Figura 6.- Representaciones fotográficas de la escala de reflejos de lordosis utilizada en rata Long-Evans. Los números indican intensidad de clasificación de lordosis en una escala de 0-3 (modificado de Lehman y Erskine, 2004)

#### 8.2.5 Pesos ováricos y uterinos.

Al finalizar los 30 días las hembras fueron sometidas a eutanasia mediante una sobredosis letal de pentobarbital sódico (60 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal al final del estudio. Los ovarios y el útero fueron extraídos y el tejido conectivo y la grasa fueron removidos antes del registro del peso húmedo de los órganos.

### 8.2.6 Análisis morfológico

Los ovarios, los úteros y las vaginas de las hembras de cada grupo se fijaron en paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, USA) y se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas, posteriormente se lavaron con buffer de fosfatos 0.1 M (PBS) pH 7.4 por 24 h. para eliminar el fijador, luego se colocaron en alcohol al 70 % durante 24hrs y posteriormente se procedió a la deshidratación de los tejidos donde se colocaron en una serie alcoholes y xilenos en grados ascendentes. Los tejidos fueron deshidratados, procesados e incluidos en parafina Leica utilizando un procesador de tejidos automático (Microtomo Microm HM325). Se obtuvieron cortes transversales, no seriados, de 5 µm de grosor de útero y vagina. Las secciones fueron montadas con Ryuter para inmovilizar y fijar el corte en el portaobjetos, posteriormente se colocaron en una estufa a 38 °C para inmovilizar los tejidos. Los cortes de desparafinaron con xilenos y alcohol para finalmente ser teñidos con hematoxilina eosina (H-E) para su análisis histológico con microscopía de luz. Se evaluarán las glándulas y el epitelio uterino, los folículos y cuerpos lúteos en los ovarios, así como el epitelio vaginal.

Los cortes teñidos con H-E se utilizaron para las mediciones del epitelio vaginal y uterino. Se seleccionaron laminillas de cortes de vagina y útero en proestro y diestro, por grupo experimental. Posteriormente se colocaron las laminillas al microscopio óptico (Microscope Camera) para su medición con el software *AmScope 3.7* en el computador, se seleccionó la altura del epitelio vaginal y uterino de treinta sitios

diferentes por cada corte evaluado. El aumento utilizado en el microscopio para cada análisis fue de 400X.

#### 8.2.7 Evaluación hormonal

Se obtuvieron 3 ml de sangre por punción cardiaca de cada animal antes de someterlo a eutanasia. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 g por 30 minutos para obtener el suero y se mantuvieron a -20 °C hasta su evaluación por ELISA.

Se cuantificó la concentración de estradiol y progesterona en el suero de las hembras en cada etapa del ciclo estral. Para ambas hormonas se utilizó el estuche comercial de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) con un Kit comercial EIA-2693 para estradiol y EIA-1561 para progesterona siguiendo las indicaciones del fabricante. La técnica de ELISA es una técnica inmunológica, que se caracteriza por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección de las reacciones antígeno-anticuerpo. En la técnica uno de los elementos de la reacción antígeno-anticuerpo se fija a una fase sólida generalmente en placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, esta fase sólida permite la adsorción pasiva del antígeno o el anticuerpo según sea el caso, y posteriormente se realiza la eliminación de los compuestos libres mediante lavados. La interacción antígeno-anticuerpo posteriormente se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por una enzima conjugada (al antígeno o al anticuerpo según el caso) al degradar el sustrato correspondiente. La

medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA, permite cuantificar la reacción inmunológica.

Posteriormente se determinó la cantidad de dichas hormonas por medio de un espectrofotómetro Epoch BioTek a una longitud de onda de 450 nm.

#### 8.2.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con la prueba de Levene para evaluar su normalidad. Los epitelios uterino y vaginal, el número de ciclos estrales, el cociente lordótico, la intensidad de la lordosis, los pesos, porcentajes de ciclos normales y anormales, así como el porcentaje de hembras que presenten lordosis se analizaron mediante ANOVA de una vía, con las y los tratamientos como factor; en caso de significancia en la ANOVA se les aplicó la prueba post hoc de Newman Keuls para determinar las diferencias entre grupos. Las concentraciones séricas de estradiol y progesterona se analizaron por una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn. Todos datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism 5.

## 9 Resultados

### 9.1 Hembras intactas

#### 9.1.1 Progresiones de ciclos estrales

Los ciclos estrales los grupos con extracto o daidzeína se observaron alterados en comparación con el grupo control, el cual se mantuvo la ciclicidad estral. Asimismo, las hembras gonado-intactas tratadas con estradiol no mostraron ciclicidad y permanecieron en estro desde los primeros días de tratamiento.

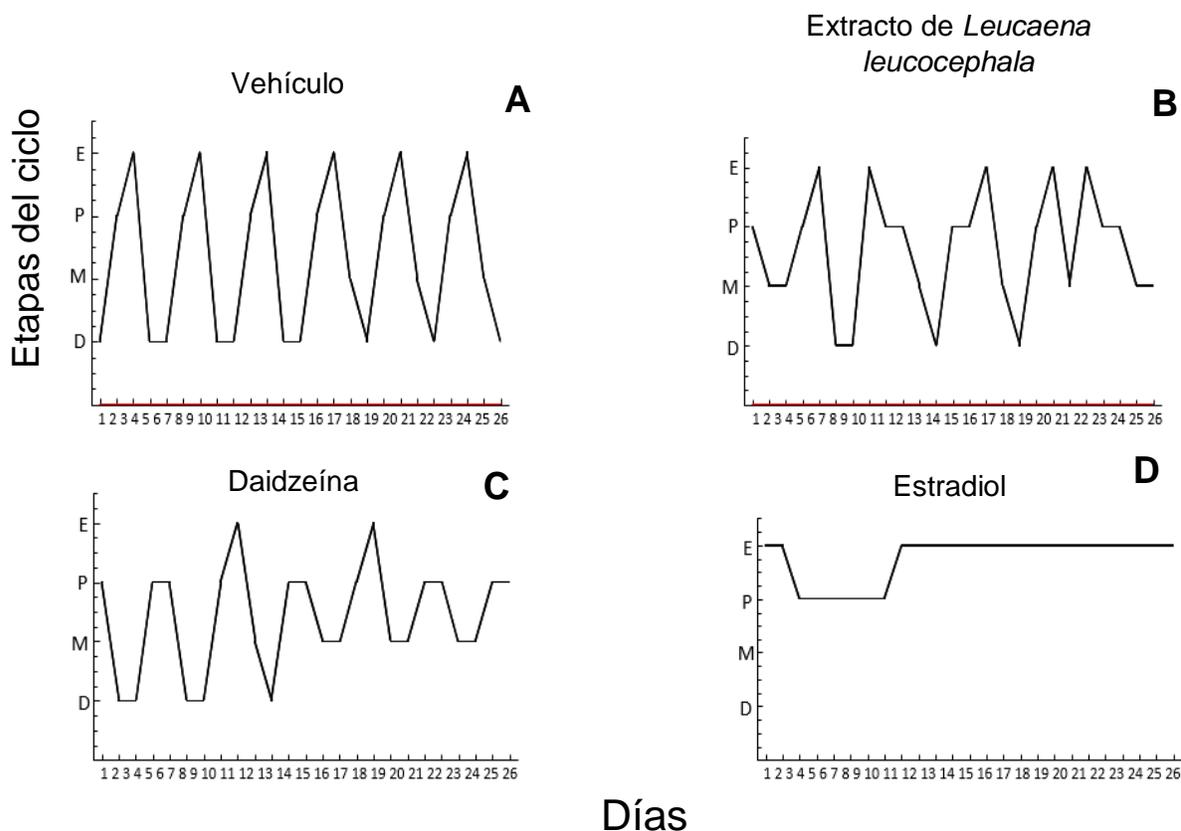


Figura 7.- Ciclos estrales representativos de los diferentes tratamientos en hembras gonado-intactas. A: Vehículo, se observa la progresión de los ciclos normales (proestro, estro, metaestro y diestro), B y C: Extracto de *Leucaena* y Daidzeína,

existen proestros continuos y conforme el tratamiento avanza los diestros desaparecen y D: estradiol, se observa la perdida de la ciclicidad estral.

### 9.1.2 Conducta sexual femenina

En los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 en que se evaluó la conducta sexual, se observó que el extracto de Leucaena y la daidzeína provocaron una disminución significativa en todos los parámetros de la conducta sexual comparados con el grupo control.

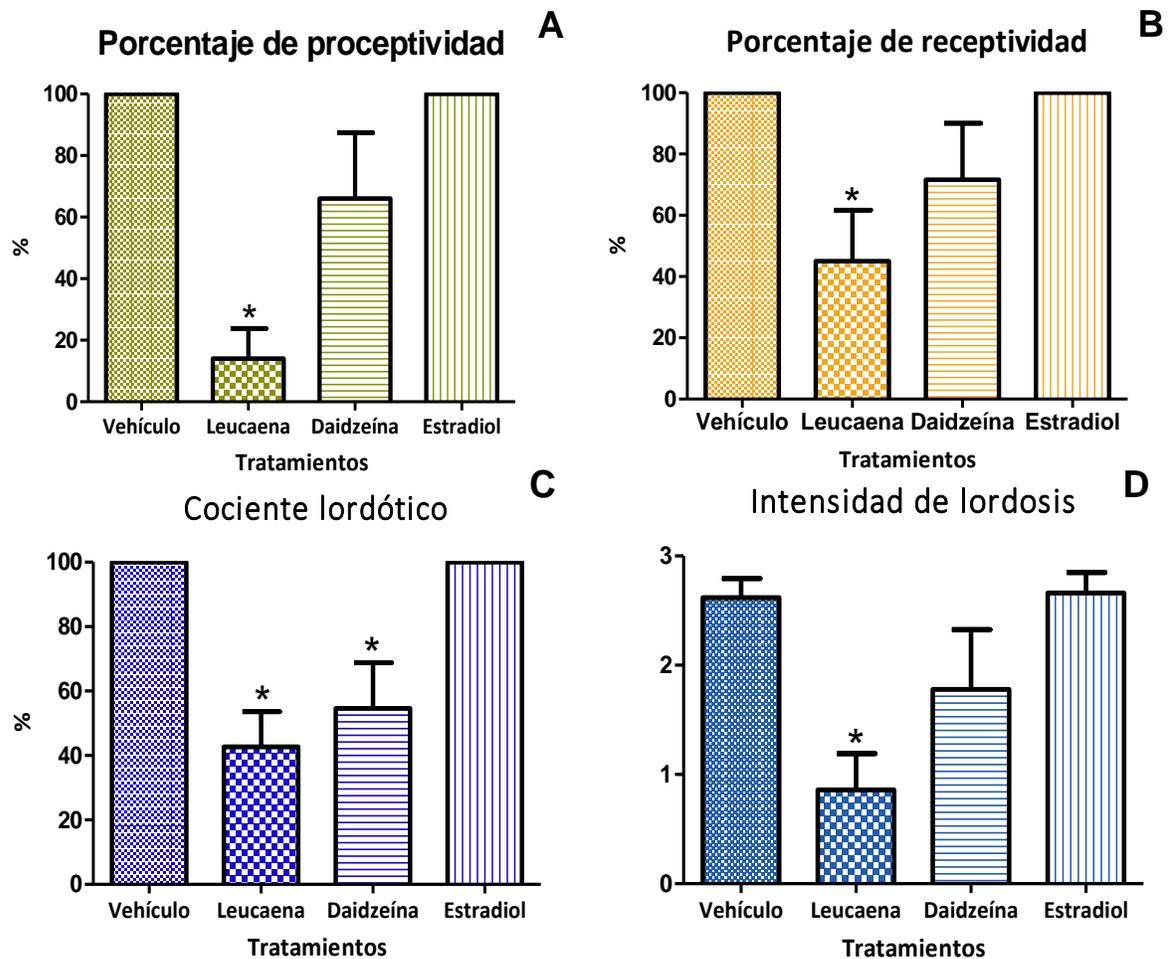


Figura 8.- Conducta sexual en hembras intactas durante los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 de tratamiento. A: porcentaje de proceptividad, B: porcentaje receptividad, C:

cociente lordótico y D: intensidad de lordosis. Se observa disminución de los parámetros conductuales en los grupos del extracto y de daidzeína comparados con el grupo control. Los datos se muestran como media  $\pm$  error estándar ( $X \pm E.E.M$ ),  $n=25$ , por ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

### 9.1.3 Niveles hormonales

Los niveles hormonales de estradiol (figura 9) no presentaron diferencias significativas independientemente de la fase del ciclo estral en la que se encontraban a excepción del grupo estradiol donde esta hormona aumentó. Para los niveles hormonales de progesterona (figura 10) se observó que en la etapa de proestro disminuyó la secreción sérica de esta hormona para los grupos de Leucaena y daidzeína, en el estro solo disminuyó en el grupo de daidzeína y el diestro aumentó para este mismo grupo. Durante el metaestro no se observó ningún cambio en ningún grupo y para el grupo estradiol la hormona se encuentra sumamente disminuida.

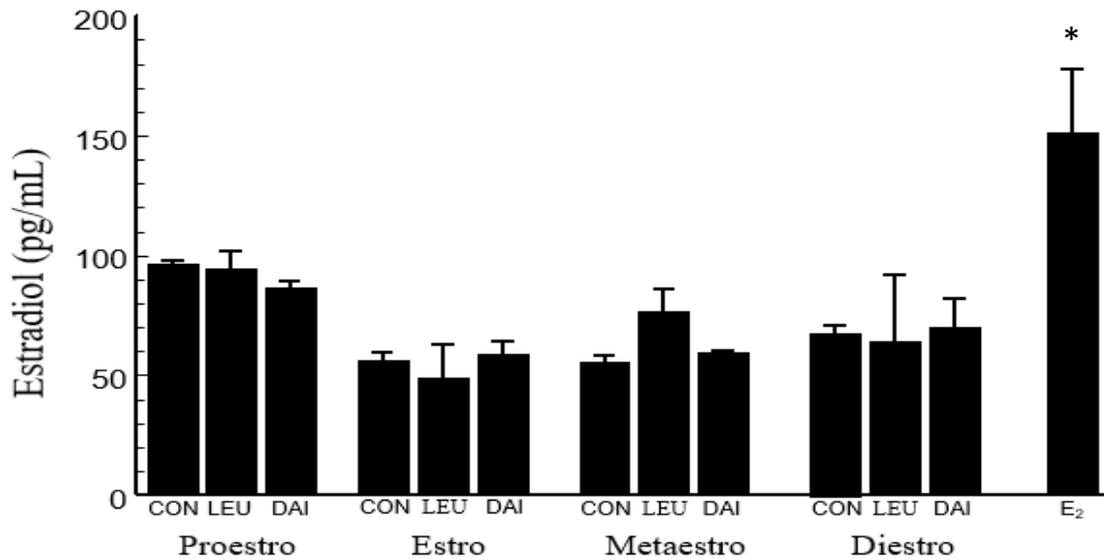


Figura 9.- Concentración sérica de estradiol (pg/mL) en hembras intactas en cada etapa del ciclo estrol. Se observa un aumento de esta hormona únicamente en el grupo estradiol comparados con el grupo control. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M.$   $n= 5$ , prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn, \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

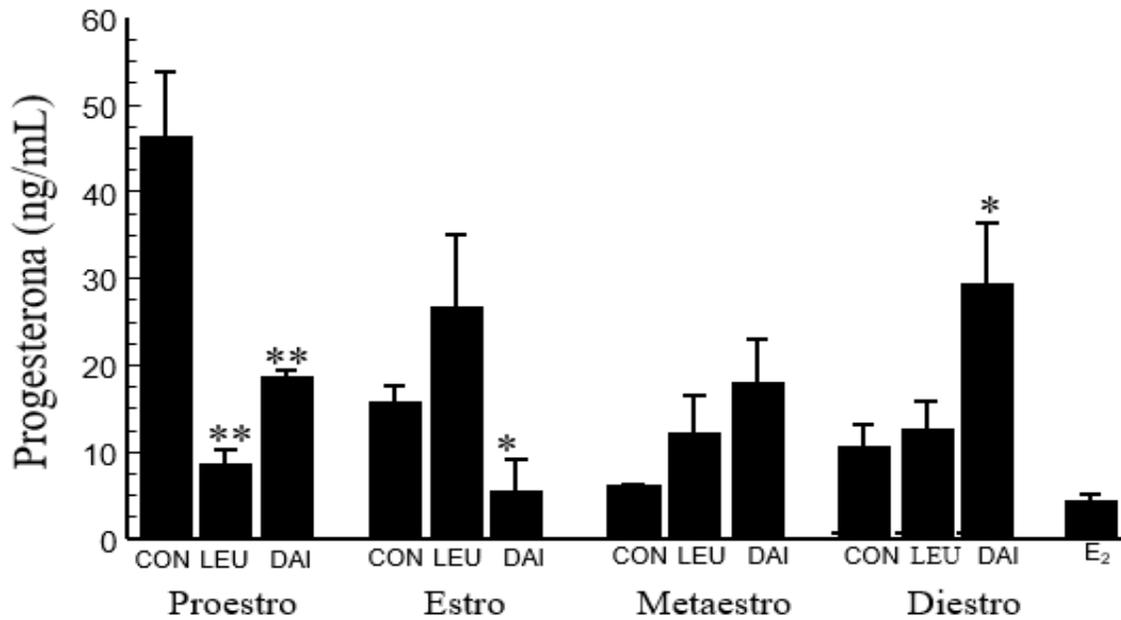


Figura 10.- Concentración sérica de progesterona (ng/mL) en hembras intactas en cada etapa del ciclo estral. En los grupos de Leucaena y daidzeína esta hormona disminuyó en la etapa de proestro, así como en la etapa de estro en el grupo daidzeína y un aumento en la etapa de diestro en el mismo grupo. En la etapa de metaestro no se observaron diferencias significativas en ningún grupo. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M.$   $n= 4$ . Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn, \*, \*\*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

#### 9.1.4 Pesos

Los grupos de Leucaena, daidzeína y estradiol presentaron disminución en el peso corporal comparado con el grupo control durante el proestro y el diestro (figura 11). Los pesos ováricos durante el proestro y diestro no mostraron diferencias entre los grupos; sólo se observó disminución en el peso ovárico del grupo con estradiol (figura 12). Los pesos vaginales fueron mayores en los grupos de daidzeína y de estradiol durante el proestro comparados con el grupo control y ninguna diferencia durante el diestro (figura 13). Los pesos uterinos no presentaron diferencias significativas en ninguna de las dos etapas (figura 14).

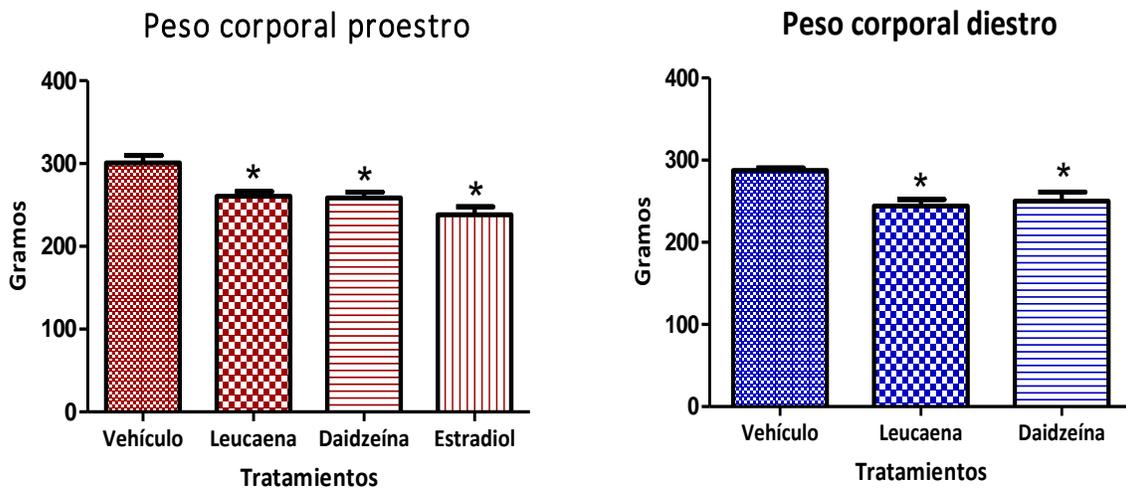


Figura 11.- Pesos corporales de hembras intactas durante el proestro y el diestro. En todos los grupos experimentales los pesos fueron menores en comparación con el control. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n = 25$ , por ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

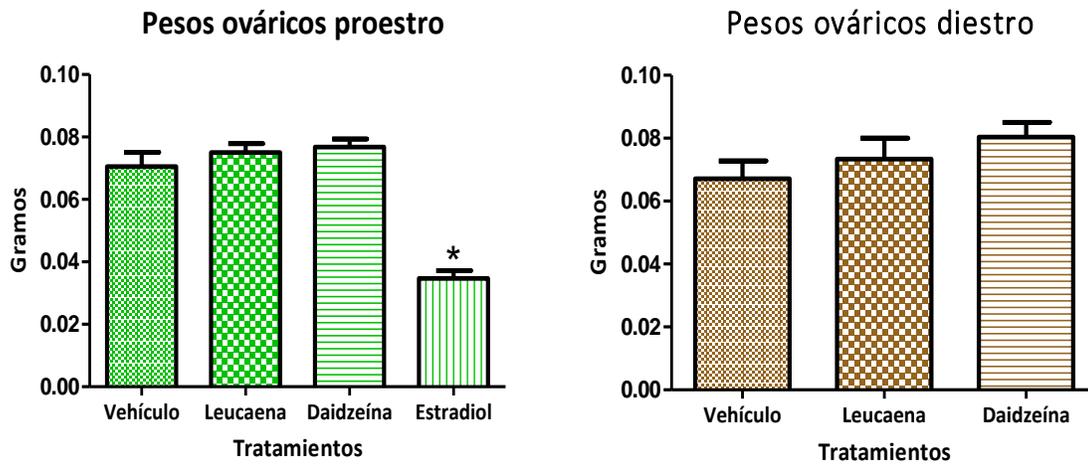


Figura 12.- Pesos ováricos de hembras intactas. El grupo estradiol presentó disminución en el peso ovárico comparado con todos los demás grupos. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n = 25$ , por ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

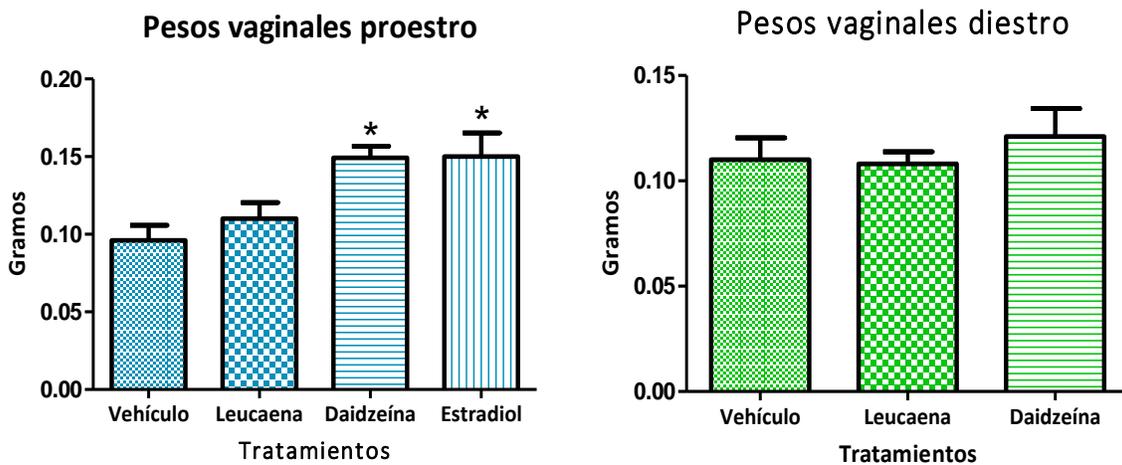


Figura 13.- Pesos vaginales de hembras intactas. Los grupos de daidzeína y de estradiol tuvieron pesos vaginales mayores comparados con el grupo control. Durante el diestro no se observaron diferencias significativas. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n = 25$ , por ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

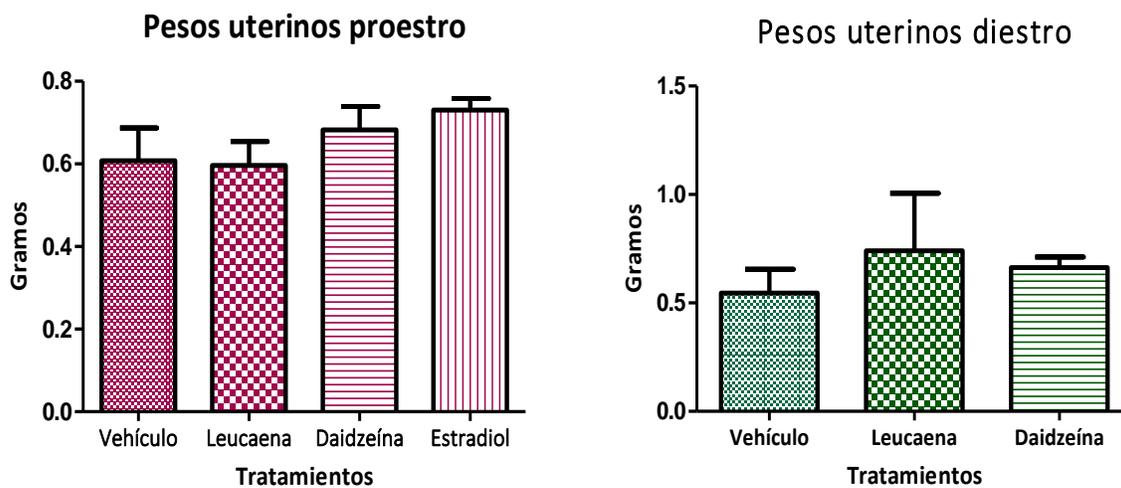


Figura 14.- Pesos uterinos de hembras intactas. No se observan diferencias significativas en ninguna de las dos etapas del ciclo estral. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n= 25$ , por ANOVA de una vía.

#### 9.1.5 Epitelios vaginales

Los epitelios vaginales en hembras intactas presentaron aumentos considerables comparados con el grupo control durante las etapas de proestro y diestro, pero en cuanto a el grupo estradiol. Los epitelios vaginales en los grupos control, Leucaena y daidzeína fueron menores que en las hembras tratadas con estradiol (figura 15). En las fotomicrográficas se observan los epitelios de los tratamientos durante las etapas de proestro y diestro, respectivamente (figuras 16 y 17).

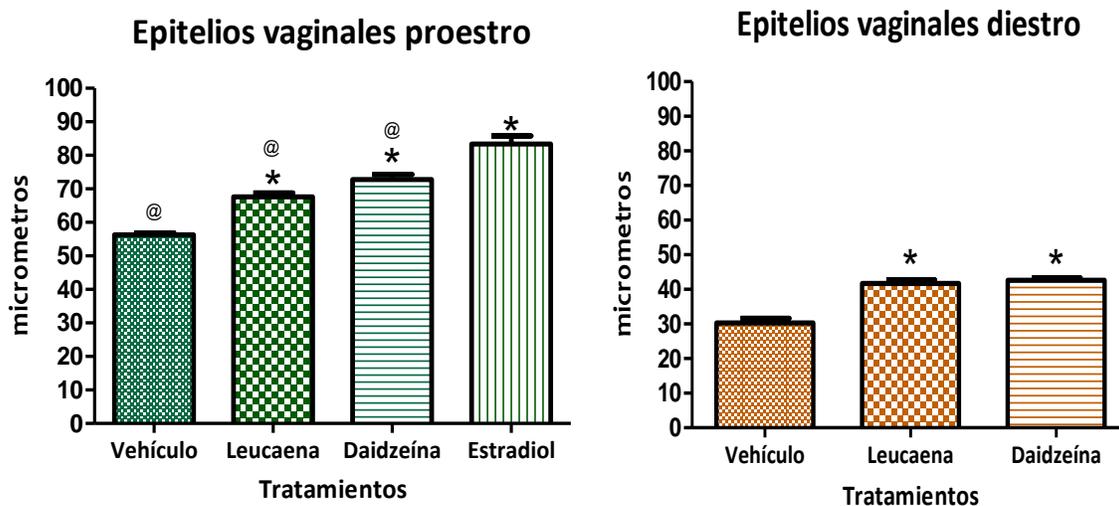


Figura 15.- Grosor de los epitelios vaginales de hembras intactas. Durante la etapa de proestro, los grupos de Leucaena, daidzeína y estradiol aumentaron comparados con el grupo vehículo. Los epitelios vaginales de las ratas con estradiol presentaron el mayor aumento. Durante la etapa de diestro, Leucaena y daidzeína aumentaron comparados con el grupo vehículo. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n= 25$ , por ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control, @  $p < 0.05$  comparados con el grupo estradiol.

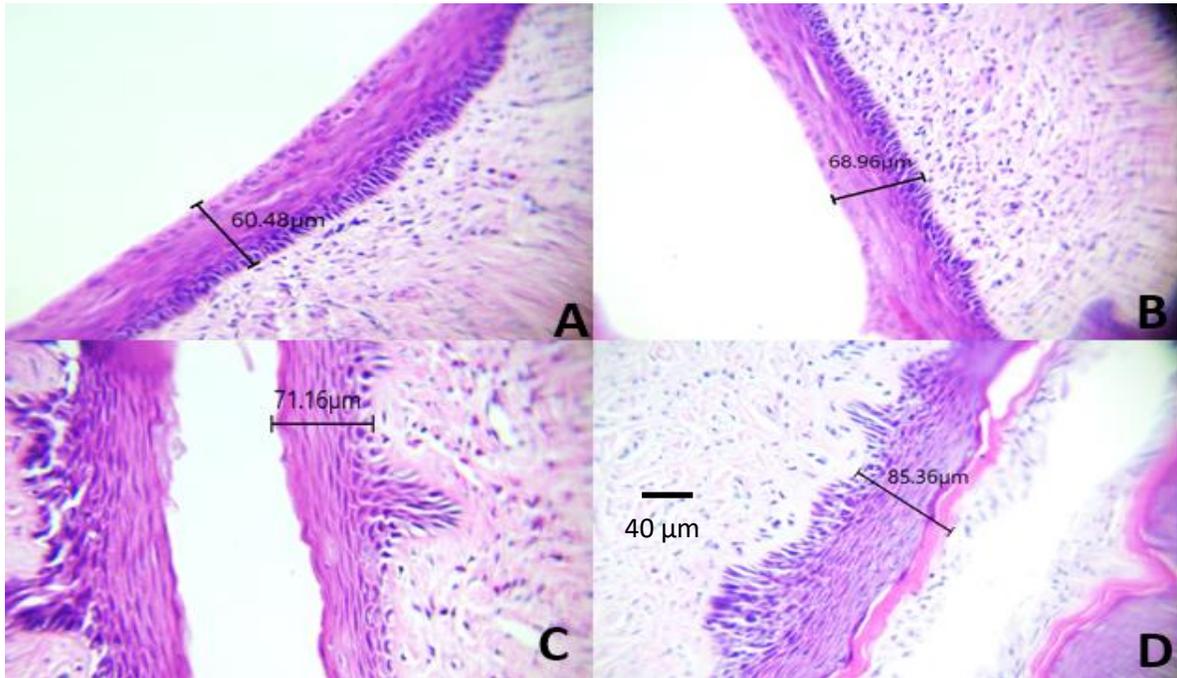


Figura 16.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios vaginales de hembras intactas en proestro, técnica. Hematoxilina-Eosina. 40x. tratadas con A: Vehículo, B: Leucaena, C: Daidzeína y D: Estradiol. La línea acotada muestra el tamaño del epitelio vaginal.

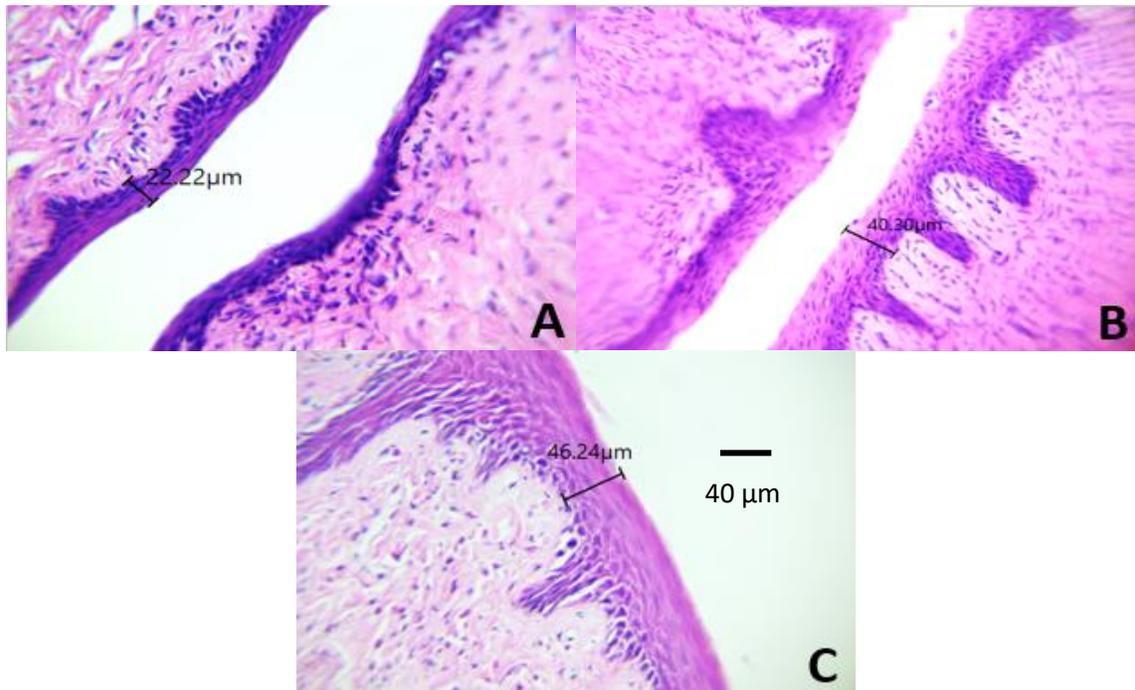


Figura 17.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios vaginales de hembras intactas en diestro, técnica. Hematoxilina-Eosina. 40x. tratadas con A: Vehículo, B: Leucaena y C: Daidzeína. La línea acotada muestra el tamaño del epitelio vaginal.

#### 9.1.6 Epitelios uterinos

Los epitelios uterinos analizados durante las etapas de proestro no presentaron diferencias significativas a excepción del grupo estradiol que aumentó comparado con los demás grupos. Durante la etapa de diestro los epitelios no mostraron cambios significativos en ningún tratamiento. En las fotomicrografías se observan los epitelios de los tratamientos durante las etapas de proestro y diestro, respectivamente (figuras 19 y 20).

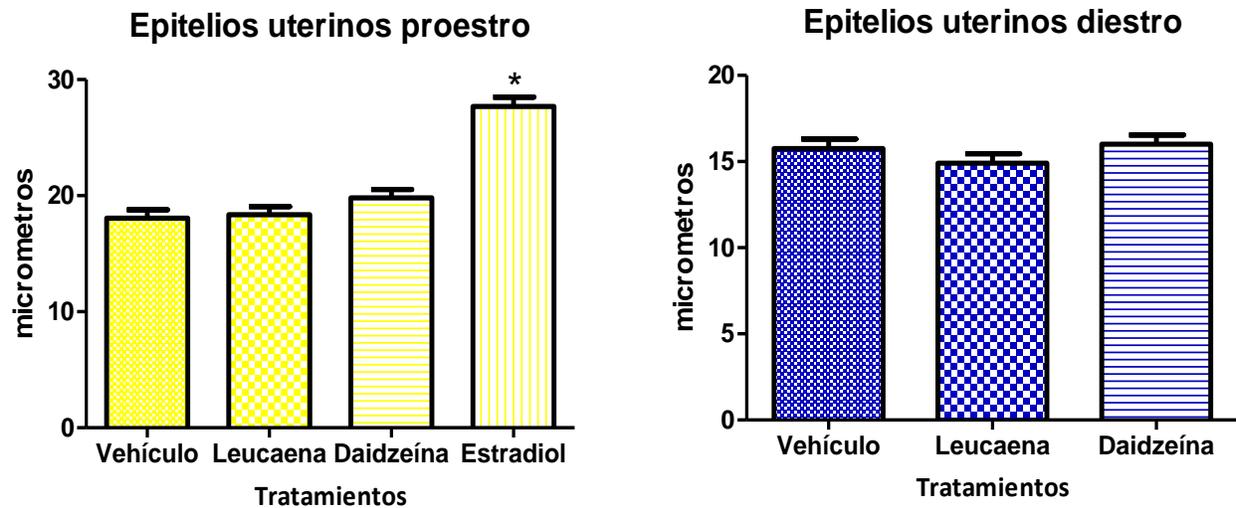


Figura 18.- Espesor de los epitelios uterinos en hembras intactas. Solamente hubo aumento del grosor epitelial uterino en el grupo con estradiol. Durante la etapa de diestro, los grupos no presentaron diferencias significativas. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n= 25$ , por ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

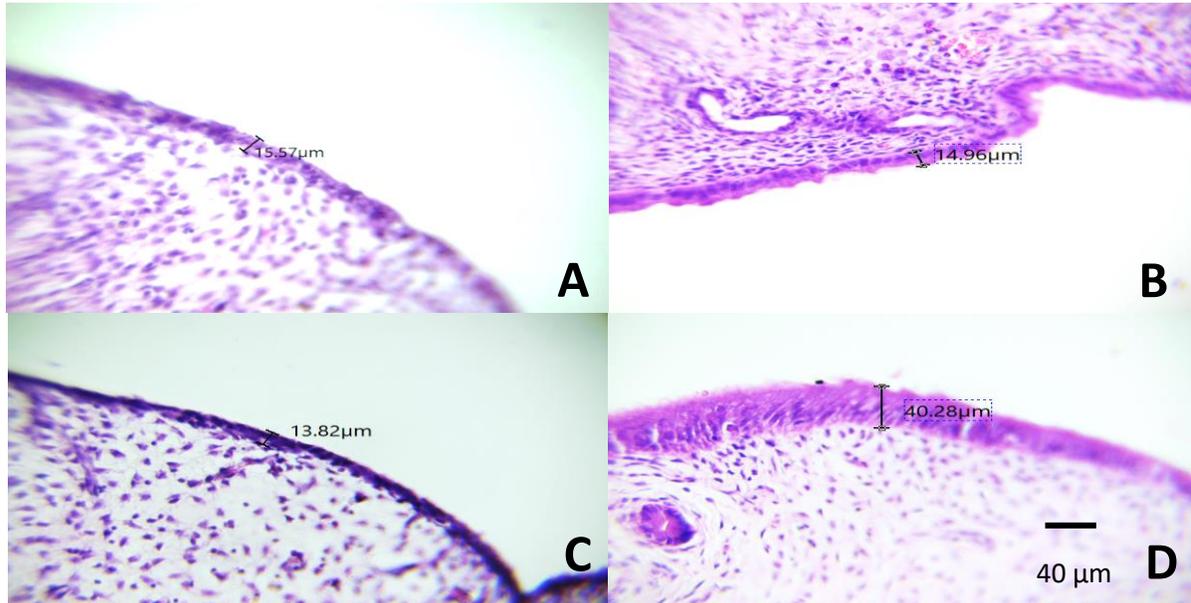


Figura 19.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios y músculos uterinos de hembras intactas en proestro, técnica. Hematoxilina-Eosina. 40x. tratadas con A: Vehículo, B: Leucaena, C: Daidzeína y D: Estradiol. La línea acotada muestra el tamaño del epitelio vaginal.

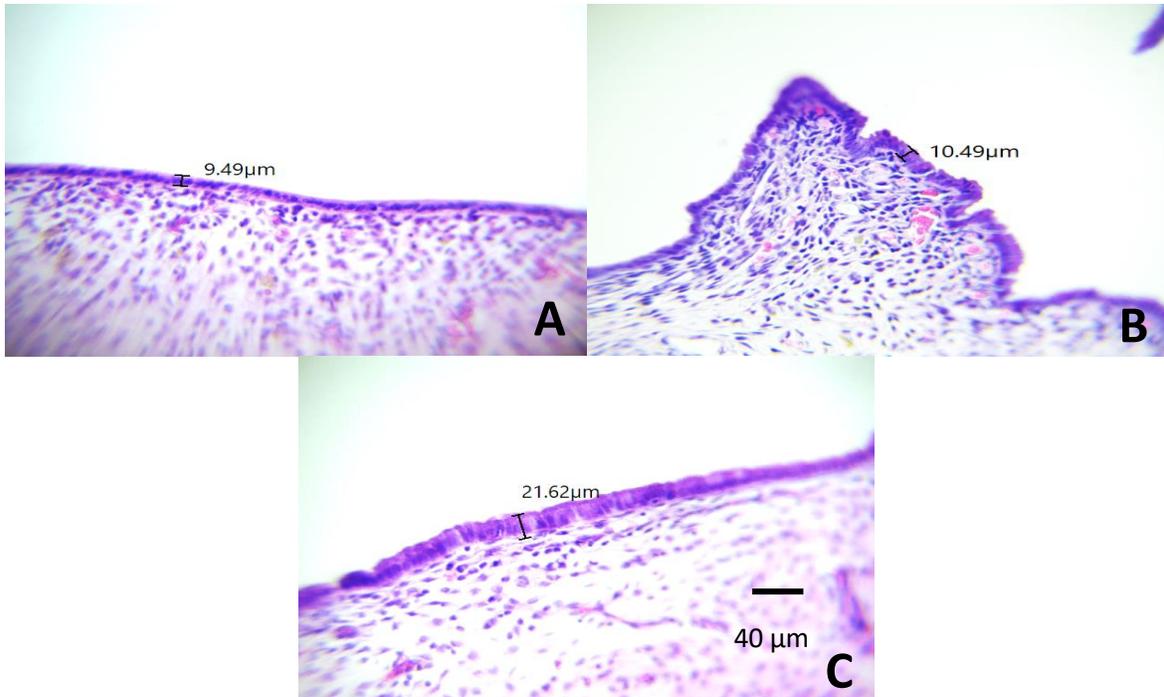


Figura 20.- Fotomicrográficas de cortes histológicos de epitelios y músculos uterinos de hembras intactas en diestro, técnica. Hematoxilina-Eosina. 40x. tratadas con A: Vehículo, B: *Leucaena* y C: Daidzeína. La línea acotada muestra el tamaño del epitelio vaginal.

### 9.3 Hembras ovariectomizadas

#### 9.3.1 Progresiones de los ciclos estrales

El epitelio vaginal de las hembras ovariectomizadas durante 30 días de tratamiento que fueron analizados presentaron: en el grupo vehículo, abundantes leucocitos lo que se podría considerar como un diestro continuo, el grupo tratado con el extracto de *Leucaena leucocephala* y daidzeína, se observaron escasas células cornificadas y leucocitos por lo que se consideró como etapa de metaestro, y el grupo estradiol se

observaron abundantes células cornificadas desde los primeros días de tratamiento, por lo que se consideró como estro continuo (Figura 21).

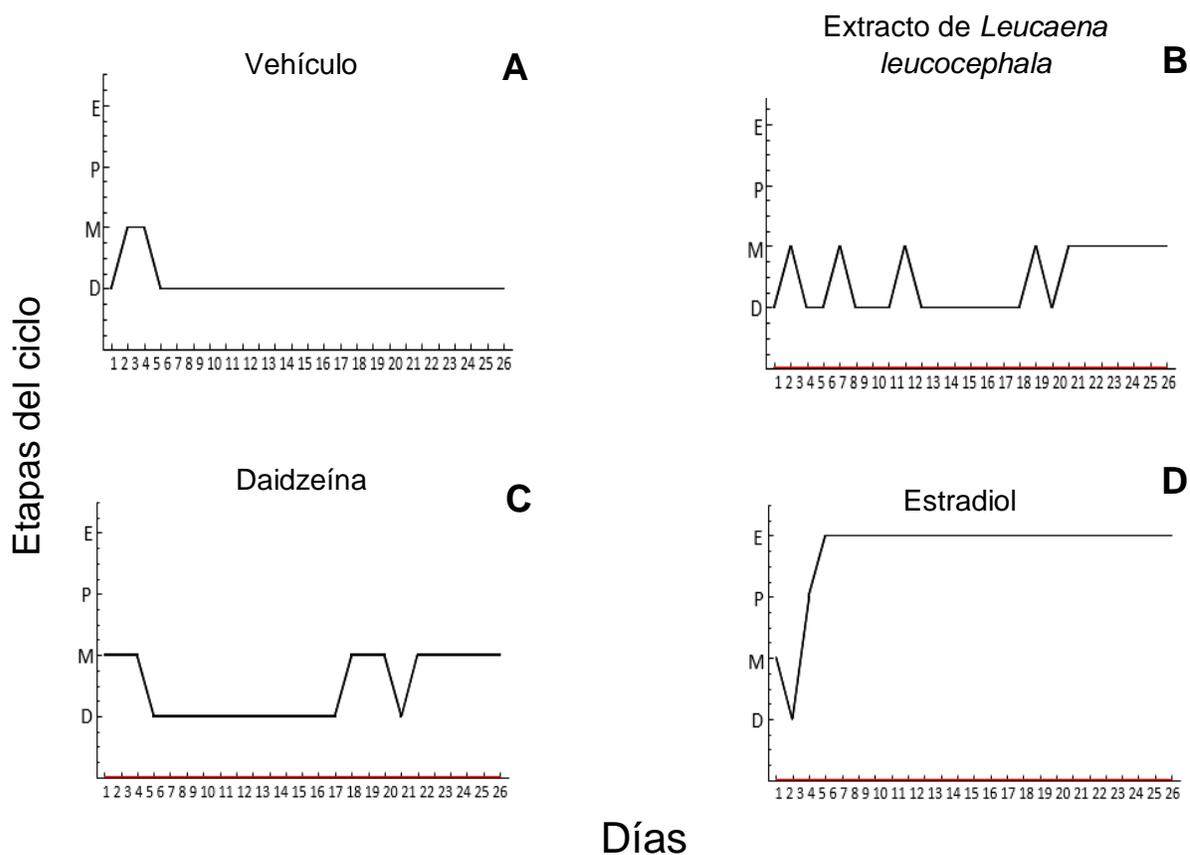
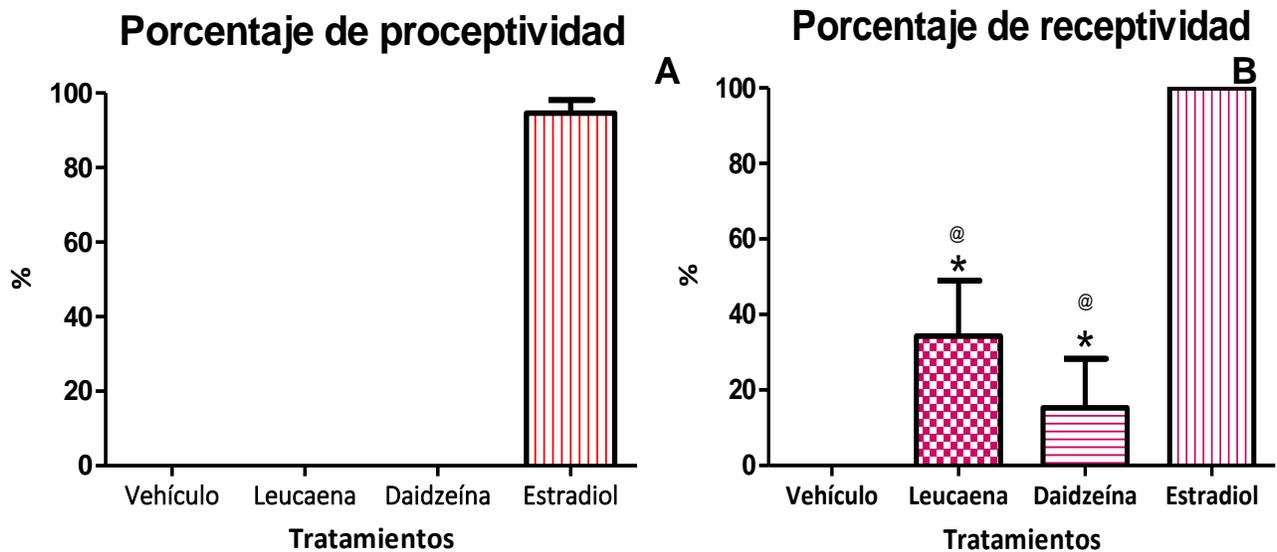


Figura 21.- Progresiones representativas de la citología de los epitelios vaginales para los diferentes grupos de tratamientos en hembras ovariectomizadas. A: Vehículo, se observa un diestro continuo, B y C: Extracto de *Leucaena* y Daidzeína, existen metaestros y D: estradiol, se observa estro continuo.

### 9.3.2 Parámetros de la conducta sexual

Durante los días 5, 10, 15, 25 y 30 en que se evaluó la conducta sexual en hembras ovariectomizadas, se observó que el extracto y la daidzeína generaron la presencia de conducta lordótica, así como cierto grado de intensidad de lordosis. El estradiol provocó un aumento significativo en la receptividad, el cociente lordótico y la intensidad de lordosis comparados con el grupo control que no presentó ninguna evidencia de conducta sexual.



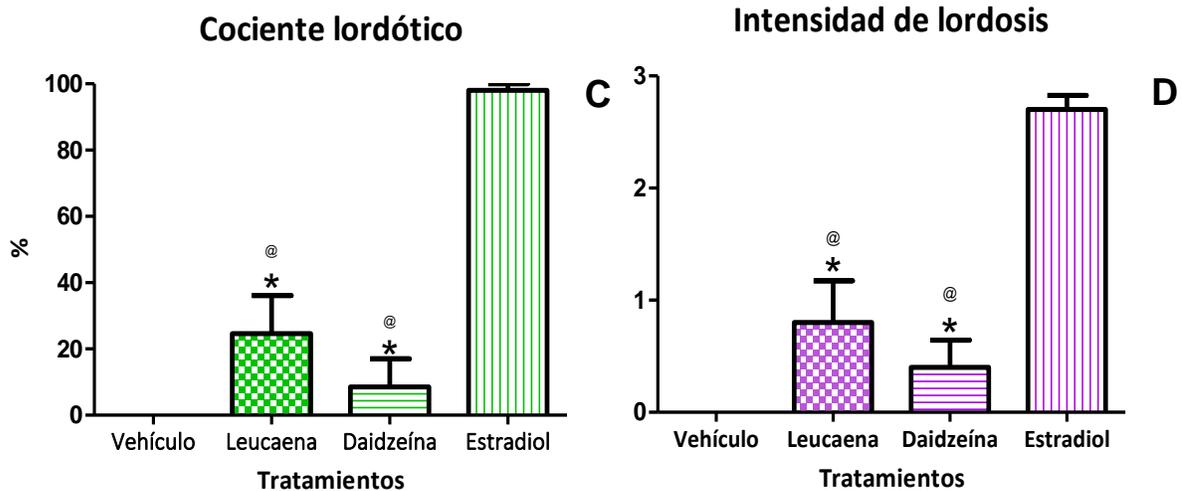


Figura. 22.- Promedio de los parámetros de la conducta sexual en hembras ovariectomizadas durante los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 de tratamiento. A: porcentaje de proceptividad, B: porcentaje receptividad, C: cociente lordótico y D: intensidad de lordosis. Se observan evidencias de conducta sexual en los grupos de Leucaena y daidzeína. Los parámetros conductuales fueron máximos en el grupo estradiol. Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar ( $X \pm E.E.M$ ),  $n= 6$ , por ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control. @  $p < 0.05$  comparados con el grupo estradiol.

### 9.3.3 Niveles hormonales

Los niveles séricos de estradiol que se observaron en los diferentes tratamientos mostraron un aumento en el grupo de Leucaena y daidzeína comparados con el grupo vehículo; el grupo con estradiol presentó los mayores niveles de estradiol comparado con los demás grupos (figura 23).

En el caso de progesterona, no se observaron cambios significativos en ninguno de los tratamientos (figura 24).

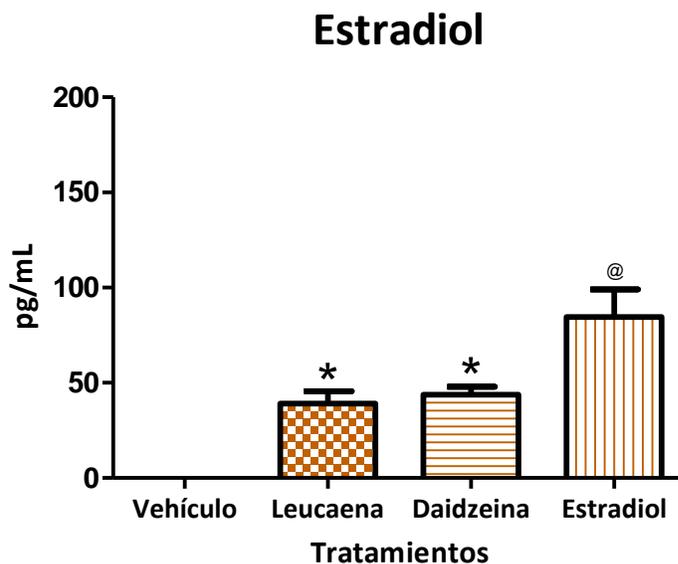


Figura 23.- Concentración sérica de estradiol (pg/mL) en hembras ovariectomizadas. Se observa un aumento en el grupo Leucaena y daidzeína comparados con el grupo control y el grupo estradiol es mayor que todos los demás grupos. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M.$   $n= 25$ . Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn, \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control. @  $p < 0.05$  comparados con todos los grupos.

## Progesterona

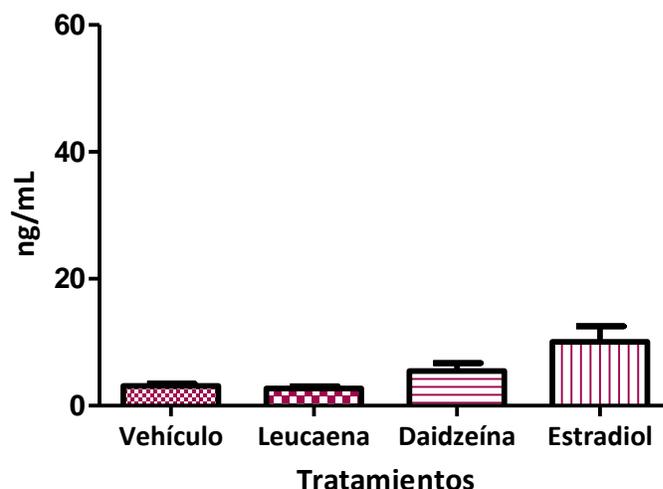


Figura 24.- Concentración sérica de progesterona (ng/mL) en hembras ovariectomizadas. No se observaron niveles elevados ni diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M.$   $n= 25$ . Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

### 9.3.4 Pesos

Los pesos corporales de las hembras ovariectomizadas se vieron disminuidos en los grupos de Leucaena y de estradiol comparados con el grupo control (figura 25). En el caso de los pesos vaginales, los grupos de hembras tratadas con daidzeína o con estradiol mostraron aumentos significativos comparados con el grupo control; el grupo estradiol presentó los mayores pesos vaginales (figura 26). Con respecto a los pesos uterinos, sólo en el grupo estradiol se observó aumento significativo comparado con los demás tratamientos (figura 27).

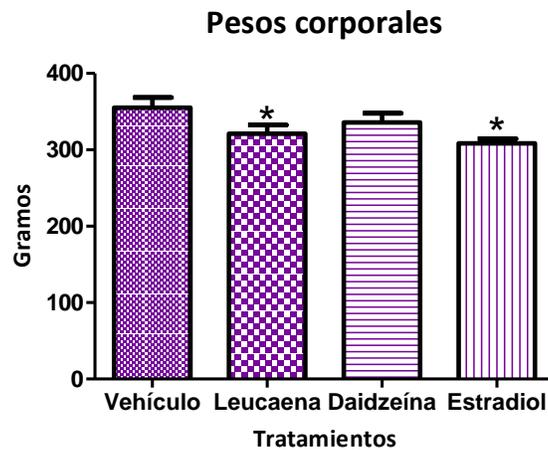


Figura 25.- Pesos corporales de hembras ovariectomizadas. Los grupos Leucaena y estradiol presentaron menores pesos comparados con el grupo control. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n= 25$ . ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls.

\*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

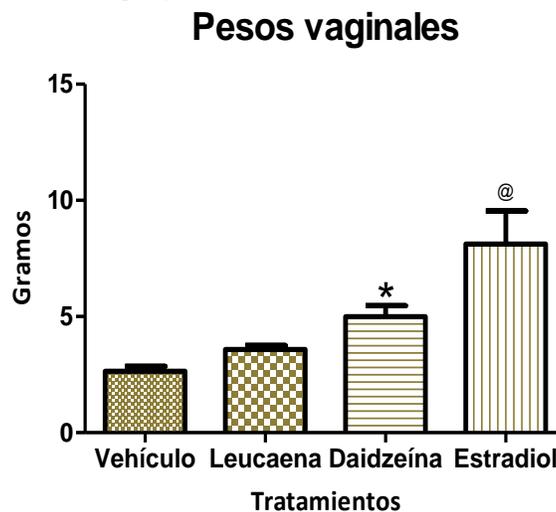


Figura 26.- Pesos vaginales de hembras ovariectomizadas. Los grupos de daidzeína y estradiol mostraron mayores pesos en comparación con el grupo vehículo. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M$ ,  $n= 25$ . ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control.

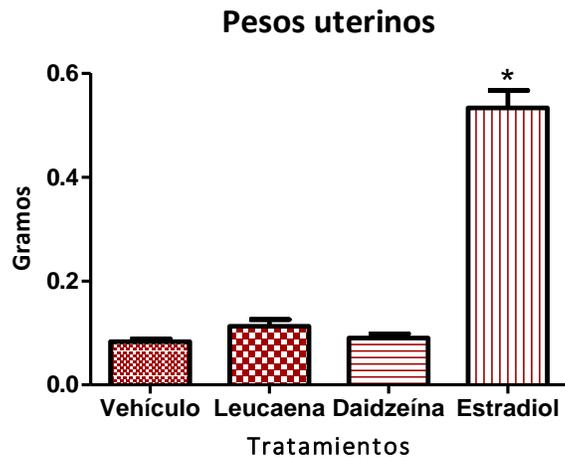


Figura 27.- Pesos uterinos de hembras ovariectomizadas. Solamente las hembras del grupo con estradiol presentaron aumento en el epitelio uterino. Los datos se muestran como media  $\pm$  E.E.M. \*  $p < 0.05$  comparados con todos los demás grupos.

### 9.3.5 Epitelios vaginales

Los epitelios vaginales se observaron sumamente adelgazados en los grupos Vehículo, Leucaena y daidzeína, a diferencia del grupo con estradiol. Sin embargo, en los grupos con Leucaena y con daidzeína se observaron aumentos significativos comparado con el grupo vehículo (figura 28). Las fotomicrografías demuestran los diferentes grosores de los epitelios para los diferentes tratamientos (figura 29).

### Epitelios vaginales

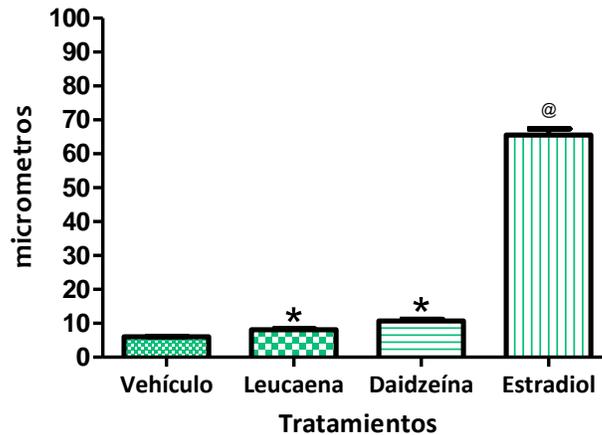


Figura 28.- Espesor de los epitelios vaginales de hembras ovariectomizadas de cada tratamiento. Los epitelios vaginales fueron mayores en las hembras tratadas con Leucaena y con daidzeína, comparados con el grupo vehículo. En el grupo tratado con estradiol, el grosor del epitelio vaginal fue mayor comparado con todos los demás grupos. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M.$   $n= 25$ . ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con el grupo control. @  $p < 0.05$  comparados con todos los grupos

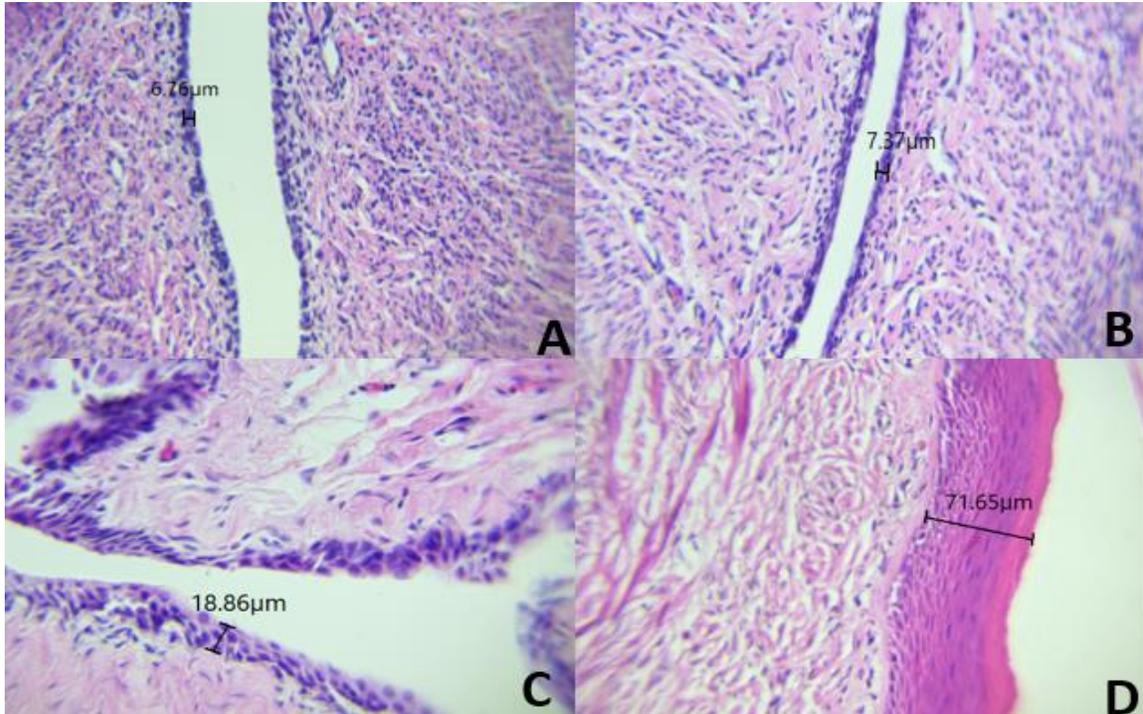


Figura 29.- Fotomicrográficas de cortes histológicos de epitelios vaginales de hembras ovariectomizadas, técnica. Hematoxilina-Eosina. 40x. A: Vehículo, B: Leucaena, C: Daidzeína y D: Estradiol. La línea acotada muestra el tamaño del epitelio vaginal.

### 9.3.6 Epitelios uterinos

Los epitelios uterinos fueron similares en los grupos vehículo, leucaena y daidzeína. Sólo en el grupo con estradiol se observó un considerable aumento en el epitelio uterino. (figura 31). En las fotomicrográficas se demuestran los grosores de los epitelios uterinos de los distintos tratamientos (figura 32).

### Epitelios uterinos OVX

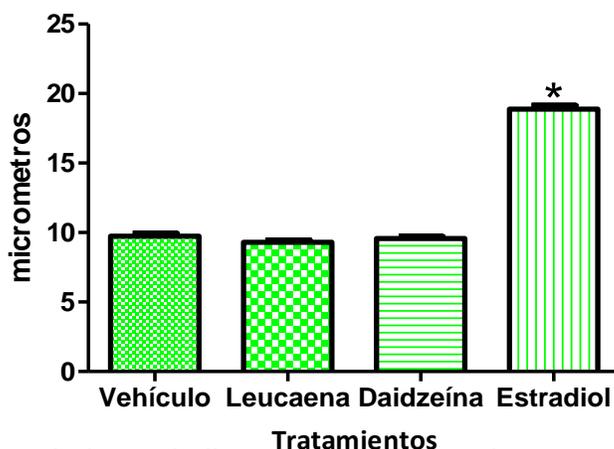


Figura 30.- Espesor de los epitelios uterinos de hembras ovariectomizadas para cada tratamiento. El tratamiento con estradiol mostró el mayor aumento en el epitelio uterino. Los datos se muestran como  $X \pm E.E.M.$   $n = 25$ . ANOVA de una vía y post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0.05$  comparados con todos los grupos.

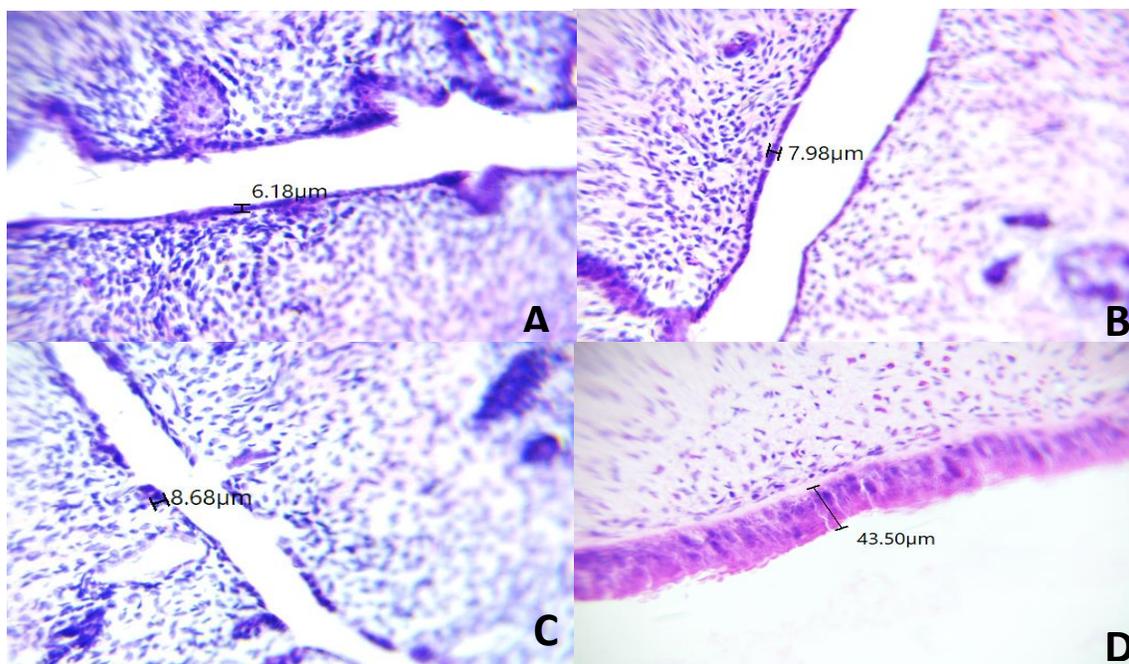


Figura 31.- Fotomicrografías de cortes histológicos de epitelios uterinos de hembras ovariectomizadas, técnica. Hematoxilina-Eosina. 40x. tratadas con A: Vehículo, B: Leucaena, C: Daidzeína y D: Estradiol. La línea acotada muestra el tamaño del epitelio vaginal.

## 10 Discusión

Los resultados del presente trabajo muestran que el extracto de *Leucaena leucocephala* es capaz de modificar la conducta sexual y los parámetros reproductivos en ratas hembra intactas y ovariectomizadas de forma similar a los efectos reportados por el fitoestrógeno daidzeína.

### 10.1 Hembras intactas

#### 10.1.1 Progresión del ciclo estral

El extracto de *Leucaena leucocephala* causó proestros repetidos, lo que alteró la progresión del ciclo estral y disminuyó el número de ciclos en el mismo periodo de tiempo. Estos efectos pueden atribuirse a los fitoestrógenos presentes en el extracto, ya que la daidzeína causó el mismo efecto, de manera similar a lo reportado anteriormente para los fitoestrógenos (Kouki y col., 2003; Henry y Wit, 2002). Estos datos indican el efecto estrogénico que el extracto tiene en el epitelio vaginal.

Los compuestos con alto contenido en fitoestrógenos pueden provocar alteraciones sobre el eje reproductivo tales como disminuir el control de las neuronas Kisspeptinérgicas y de las neuronas GnRH, ejerciendo una retroalimentación negativa a nivel hipotalámico, causando así menor secreción de GnRH y con ello la disminución en la secreción de gonadotropinas (Whitten y col., 2002), alterando así la ciclicidad estral (Retana-Márquez y col., 2016). Los fitoestrógenos pueden causar menor liberación de gonadotropinas (Whitten y col., 2002), lo que puede llevar a la disminución de la esteroidogénesis. Además, los fitoestrógenos inhibir a las enzimas

esteroidogénicas y provoca disminución en los niveles circulantes de estradiol lo que causaría una retroalimentación negativa en lugar de la retroalimentación positiva en el hipotálamo (Retana-Márquez y col., 2016). Sin embargo; en este estudio no se evaluaron los niveles séricos de FSH, LH por lo que no se puede confirmar que dichas alteraciones sean provocadas por los fitoestrógenos.

El efecto del extracto de *Leucaena* en la vagina fue similar al generado tanto por la daidzeína como por el estradiol, lo que indica un efecto estrogénico del extracto. La vagina presenta receptores para estrógenos tipo alfa y beta, y los fitoestrógenos pueden unirse a ambos tipos de receptores, aunque con una afinidad 30 veces mayor para los beta que por los alfa (Goldberg y col., 1996, Navarro, 2005). La unión a estos receptores puede explicar los efectos estrogénicos observados en el epitelio vaginal de las hembras tratadas con el extracto o la daidzeína. En el caso de las ratas tratadas con estradiol, dado que esta hormona es la responsable de la proliferación y queratinización del epitelio vaginal (Bertin y col., 2014), la administración de la hormona exógena, la cual se une a ambos tipos de receptores, provocó estro continuo, con la pérdida de la ciclicidad

Las alteraciones que provocaron los tratamientos del extracto de *Leucaena* y de daidzeína no solo fueron visibles en el epitelio vaginal, sino también en la conducta sexual, la cual se vio disminuida.

### 10.1.2 Conducta sexual

La conducta sexual femenina en la rata, medida por el porcentaje de hembras proceptivas, el porcentaje de hembras receptivas, el cociente lordótico y la intensidad de lordosis, así como la ovulación dependen directamente de las secreciones de los esteroides sexuales estradiol y progesterona (Mani y Portillo, 2010).

La conducta sexual femenina está regulada por los receptores alfa para estrógenos y por los receptores para progesterona, localizados en el núcleo ventromedial del hipotálamo (Krege y col., 1998). De esta manera, tanto el estradiol como la progesterona son los responsables de la regulación del comportamiento sexual femenino, principalmente a través de los receptores beta (Goldberg y col, 1996, Navarro, 2005). Los fitoestrógenos son capaces de inhibir la expresión de genes que codifican para los receptores para estrógenos alfa y beta en el hipotálamo, generando así un efecto antiestrogénico que inhibe la conducta femenina dependiente de estrógenos (Patisaul et al, 2001). Es posible que el extracto de *Leucaena* tenga un efecto antiestrogénico en la expresión de RNAm para el receptor beta para estrógenos, lo que explicaría la disminución en la receptividad sexual en la hembra.

Los fitoestrógenos también pueden alterar la concentración de estrógenos y progestágenos endógenos mediante la unión o inactivación de algunas enzimas esteroidogénicas, tales como la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Ohno y col., 2003), la aromatasa p450, la  $5\alpha$ -reductasa, la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatasa (Johnston, 2003), las cuales son responsables de la síntesis de las

hormonas sexuales, provocando así que la conducta sea vea reducida por la baja producción de dichas hormonas que causó el extracto de la *Leucaena* y la daidzeína.

El pico de progesterona en el proestro en ratas es el necesario para que se despliegue la conducta sexual, específicamente la intensidad de la lordosis (Retana-Márquez, y col., 2016). En el presente trabajo se observó que dicha hormona disminuyó en esta etapa, lo que indica que la disminución en los grupos tratados con el extracto de la planta y con daidzeína pudieron ser causados por la disminución de esta hormona.

#### 10.1.3 Niveles hormonales

A pesar de la disminución de la conducta sexual femenina los niveles de estradiol en hembras gonado-intactas no se observaron modificados, lo que significa que ni el extracto de *Leucaena* ni la daidzeína disminuyeron la actividad de las enzimas esteroidogénicas ováricas. Por lo tanto, los efectos del extracto en la conducta pueden deberse a efectos antiestrogénicos debidos a la inhibición de la expresión de los receptores para estrógenos.

La disminución de la concentración de progesterona podría deberse a la inhibición de enzimas esteroidogénicas como la  $3\beta$ -hidroxiesteroideshidrogenasa (Johnston, 2003, Ohno, y col., 2003) encargada de sintetizar progesterona a partir de pregnenolona (Ghosh y col, 2009) en las células foliculares, como se ha demostrado previamente.

#### 10.1.4 Pesos

El estradiol inhibe a las hormonas orexigénicas (Neuropéptido Y, Grehlina) las cuales inducen el apetito en los mamíferos (Michopoulos y Wilson, 2011) disminuyendo así el peso corporal en los grupos tratados con el extracto, la daidzeína y el estradiol tanto en el proestro como en el diestro.

Los pesos ováricos, uterinos y vaginales no presentaron cambios significativos, debido posiblemente a que la cantidad de fitoestrógenos en el extracto y la dosis de daidzeína utilizada es baja, a diferencia de otros estudios donde se han utilizado dosis altas (1 mg/Kg) de daidzeína en los que se observa disminución en el peso ovárico en ratas (Koiki y col., 2003). El tiempo de administración también es un factor que debe considerarse, pues la administración prolongada, aunado a dosis demasiado altas causan disminución del peso ovárico (Rimoldi y col., 2007).

El extracto y la daidzeína, sin embargo, causaron aumentos discretos en el peso vaginal.

#### 10.1.5 Grosor de epitelios vaginales y uterinos

La Leucaena y la daidzeína generaron un importante incremento en el epitelio vaginal en comparación con el grupo vehículo. Dicho incremento muestra el efecto estrogenizante del extracto de Leucaena, debido probablemente a la unión de los fitoestrógenos con los receptores para estrógenos en dicho órgano, lo que explicaría también las alteraciones en el ciclo estral en estas ratas

El epitelio uterino tiene mayor cantidad de receptores tipo alfa que beta (Zhu, y col., 2006). Si se considera que los fitoestrógenos tienen mayor afinidad por los receptores beta que por los alfa, lo que explicaría (Sepúlveda y col., 2011) el por qué no hubo cambios en la altura del epitelio de este órgano en ninguna etapa del ciclo estral. Sin embargo, habría que evaluar el efecto estrogénico del extracto a nivel de expresión de genes para receptores de progesterona, lo cual demostraría un claro efecto estrogénico (Cotroneo et al, 2001).

## 10.2 Hembras ovariectomizadas

Con respecto a las hembras ovariectomizadas, los efectos provocados por el extracto de *Leucaena leucocephala* fueron similares a los provocados por el fitoestrógeno daidzeína y mucho más suaves comparados con el efecto del estradiol.

Cabe mencionar que la utilización de hembras ovariectomizadas es para ejemplificar el efecto que los fitoestrógenos tienen sin la presencia endógena de las hormonas sexuales femeninas en la vagina, útero y ovarios.

### 10.2.1 Epitelio vaginal

Al extirparlos ovarios, la ciclicidad estral se pierde debido a que se elimina la fuente de hormonas sexuales secretadas por estas glándulas, por lo cual el epitelio vaginal se adelgaza y no muestra las características que definen a cada una de las etapas que comprenden el ciclo, permaneciendo continuamente en un estado que se parece al diestro.

Los frotis de los grupos tratados con el extracto de la planta y con daidzeína evidenciaron un ligero engrosamiento y cornificación del epitelio vaginal, respaldando la idea de la sensibilidad de este órgano a los fitoestrógenos (Rimoldi y col., 2007).

En el caso de las hembras ovariectomizadas tratadas con estradiol, éstas presentan un estro continuo debido al suministro constante de la hormona exógena, la cual provoca una clara proliferación y cornificación del epitelio vaginal (Gómez-Chang y col., 2012).

#### 10.2.2 Conducta sexual

En algunas ratas tratadas con el extracto de la planta o con daidzeína se observó cierto grado de lordosis, lo que significa que, a pesar de su mayor afinidad por los receptores beta para estradiol, los fitoestrógenos pueden actuar a través de ambos tipos de receptores, favoreciendo la expresión de la conducta femenina (Whitten et al, 2002). Esto significa que, en ausencia de estradiol endógeno, los fitoestrógenos se comportan como agonistas débiles y que en presencia de estrógenos endógenos se comportan como antagonistas estrogénicos por los receptores en los órganos diana (Navarro, 2005). Estos resultados son similares a los obtenidos en el laboratorio, donde se trataron ratas ovariectomizadas con las mismas dosis de daidzeína (1.6 mg/Kg) y con la leguminosa *Prosopis sp.* y también se observaron conductas receptivas.

### 10.2.3 Pesos

Como ya se mencionó, el estradiol tiene un efecto inhibitor de los péptidos orexigénicos. Este efecto es similar en el caso de los fitoestrógenos, ya que, los pesos corporales en las hembras ovariectomizadas que fueron tratados con extracto de *Leucaena* y con daidzeína presentaron menores pesos corporales que las hembras ovariectomizadas tratadas con el vehículo.

Los pesos vaginales y uterinos de las hembras tratadas con extracto y con daidzeína aumentaron, pero solo la daidzeína tuvo un efecto estadísticamente significativo en vagina. El extracto causó un aumento significativo a nivel uterino comparado con el grupo vehículo, lo que demuestra que los fitoestrógenos actúan como agonistas y tienen un efecto estrogénico en estos órganos en ausencia de estradiol (Navarro, 2005).

### 10.2.4 Niveles hormonales

Las células de la granulosa de los ovarios son las responsables de la síntesis de estradiol (Gómez-Chang y col., 2012) y al analizar los niveles séricos de estradiol en las hembras ovariectomizadas tratadas con el extracto y la daidzeína, el kit para ELISA detectó niveles bajos de esta hormona, a pesar de la ausencia total de la hormona. Esto se explica porque el Kit ELISA EIA-2693 de estradiol es policlonal, lo causa el reconocimiento de alguna zona del fitoestrógeno similar a la del estradiol como podría ser el anillo fenólico que presentan todos los fitoestrógenos. En

contraste, dicha hormona no fue detectada en las hembras ovariectomizadas a las que solo se les administró el vehículo.

En el caso de la progesterona, dado que la corteza de la glándula suprarrenal produce progesterona en una cantidad pequeña (McKay y Cidlowski, 2003) por lo pudo ser detectada por el kit ELISA en todos los grupos experimentales.

#### 10.2.5 Grosor de epitelios vaginales y uterinos

De la misma manera que en las hembras gonado-intactas los fitoestrógenos tuvieron un efecto estrogénico claro en el epitelio vaginal provocando un ligero engrosamiento en comparación con el grupo con vehículo. En ausencia del estradiol, los fitoestrógenos se unen a los receptores para estrógenos, lo que facilita sus efectos agonistas.

En el epitelio uterino, aunque existen ambos tipos de receptores para estradiol, predominan los alfa (Navarro, 2005), por lo que el efecto del extracto y de la daidzeína no fue significativo. En este caso, sin embargo, también habría que evaluar si se induce la expresión de los genes que codifican para los receptores alfa y beta. También se debe tomar en cuenta tiempo de exposición y dosis administrada de los tratamientos.

El efecto del estradiol es evidente, tanto en la vagina como en el útero, ya que esta hormona en la dosis administrada causa grandes efectos en el grosor del epitelio, comparado con los demás grupos, lo que comprueba que los receptores alfa y beta tiene una mayor afinidad por su hormona.

Por último, es necesario que se realicen mayores investigaciones con respecto al efecto que los extractos con alto contenido de fitoestrógenos provocan en la reproducción de los mamíferos, para tener mayores y mejores bases para una dieta balanceada en animales de corral y en humanos que no tengan un efecto secundario en la reproducción.

## 11 Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajos muestran que el extracto de hojas de *Leucaena leucocephala* es capaz de interferir con la fisiología reproductiva y la conducta sexual de la rata hembra intacta, reduciendo la conducta sexual y alterando la progresión del ciclo estral.

En las hembras ovariectomizadas, el extracto de hojas de *Leucaena leucocephala* tiene efecto estrogenizante, tanto en la conducta sexual como en el epitelio vaginal.

Los efectos del extracto son similares a los provocados por la daidzeína, pero mucho menores que los del estradiol.

## 12 Referencias

Adams, N.R., 1995. Detection of the effects of phytoestrogens in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 1509–1515.

Adams, N.R. and Martin, G.B., 1983. Effects of oestradiol on plasma concentrations of luteinizing hormone in ovariectomized ewes with clover disease. *Australia Journal of Biological Science* 30, 223–230.

Aderibigbe, S.A., Adetunji, O.A., Odeniyi, M.A., 2011. Antimicrobial and pharmaceutical properties of the seed oil of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Leguminosae). *ResearchGate* 14.

Akingbade, A. A., Nsahlai I. V. y Morris C. D. 2002. The effects of *Leucaena leucocephala* on semen quality, fertility and reproductive performance of dihydroxy pyridine-adapted South Africa Nguni goats. *Journal of Agricultura Science.* 139:205-211.

Alabi, D.A., Alausa, A.A., 2006. Evaluation of the Mineral Nutrients and Organic Food Contents of the Seeds of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala* and *Mucuna utilis* for Domestic Consumption and Industrial Utilization. *World Journal of Agricultural Sciences.*

Angulo, M.T.S., López, M.S., Castro, E.D., Villavicencio, L.L.F., Emiliano, J.R., Ortíz, M.S.S., 2012. Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado [WWW Document]. *Acta Universitaria.* URL <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41623191001> (accessed 3.27.17).

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.

Barnes S. 2004. Soy Isoflavones– Phytoestrogens and What Else? *J. Nutr.* 134: 1225S-1228S.

Benavides, F.J., Guénet, J.L., n.d. 2003. *Manual de Genética de Ratones de Laboratorio. Principios Básicos y Aplicaciones.* Universidad de Alcalá., España.

Bennetts, H.W., Underwood y E.J., Shier, F.L., 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Journal of Agricultural Research* 22, 131–138.

Bertin, J., Ouellet, J., Dury, A.Y., Pelletier, G., Labrie, F., 2014. Expression of the estrogen receptors and steroidogenic enzymes involved in estradiol formation in the monkey vagina. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 211, 499.e1-499.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.06.017>

Branca F. 2003. Dietary phyto-oestrogens and bone health. *Proc Nutr Soc.* 62 (4): 877-87.

Brewbaker, J.L., Hegde, N., Hutton, E.M., Jones, R.J., Lowry, J.B., Moog, F., van den Beldt, R., 1985. *Leucaena - Forage Production and Use.* NFTA, Hawaii, USA.

Brewbaker, J.L., Sorensson, C.T., 1990. New tree crops from interspecific *Leucaena* hybrids. Timber Press, Portland.

Burawat, J., Uabandit, N., Sripanidkulchai, B., Nualkaew, S., Iamsaard, S., 2016. Antioxidant Capacity and Acute Testicular Toxicity of *Leucaena leucocephala* Aqueous Shoot Tips Plus Young Leaves Extracts. *International Journal of Morphology* 34, 514–521. doi:10.4067/S0717-95022016000200018

Caligioni, C.S., 2009. Assessing Reproductive Status/Stage in Mice. *Protocols in Neuroscience* 4, 199–204.

Carr, B.R., 1998. *William's Textbook of Endocrinology*. Hartcourt & Brace, Philadelphia.

Chin, E.C., Abayasekara, D.R.E., 2004. Progesterone secretion by luteinizing human granulosa cells: a possible cAMP-dependent but PKA-independent mechanism involved in its regulation. *J. Endocrinol.* 183, 51–60. doi:10.1677/joe.1.05550

Chen, C. Y. y Y. D. Wang. 2011. Secondary metabolites from *Leucaena leucocephala*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 47, No. 1

CONABIO:

[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/44-legum26m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/44-legum26m.pdf)

Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COT). 2003. *Phytoestrogens and Health*. The Food Standards Agency,

Reino Unido

(<http://tna.europarchive.org/20110116113217/cot.food.gov.uk/pdfs/phytoreport0503>)

Folman, Y., Pope, G.S., 1966. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other uterovaginitrophic compounds of low potency. *J. Endocrinol.* 34, 215–225.

García M., H. Wencomo, M. Gonzáles, M. Medina y L. Cova. 2008. Caracterización de diez cultivares forrajeros de *Leucaena leucocephala* basada en la composición química y la degradabilidad ruminal. *Revista MVZ [Medicina Veterinaria y Zootecnia]* 13(2): 1294-1303.

Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. 2009. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457 (7226): 219-23. PMID 19129847

Giang, N.T.T., Wanapat, M., Phesatcha, K., Kang, S., 2016. Level of *Leucaena leucocephala* silage feeding on intake, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy steers. *Trop Anim Health Prod* 48, 1057–1064. doi:10.1007/s11250-016-1060-3

Goldberg, D., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E., Soleas, G., Ng, E., 1996. Methods to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal. Chem.* 68, 1688–1694.

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 Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 80, 84–97. doi:10.1002/bdrb.20106

Gómez-Chang, E., Larrea, F., Martínez-Montes, F., 2012. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* 15, 24–36.

Gorostizaga, A., Cornejo Maciel, F., Brion, L., Maloberti, P., Podestá, E.J., Paz, C., 2007. Tyrosine phosphatases in steroidogenic cells: Regulation and function. *Molecular and Cellular Endocrinology, Adrenal/Molecular Steroidogenesis Conference 2006* 265–266, 131–137. doi:10.1016/j.mce.2006.12.009

Granot, Z., Geiss-Friedlander, R., Melamed-Book, N., Eimerl, S., Timberg, R., Weiss, A.M., Hales, K.H., Hales, D.B., Stocco, D.M., Orly, J., 2003. Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins. *Mol. Endocrinol.* 17, 2461–2476. doi:10.1210/me.2003-0074

Hassan, R.A., Tawfik, W.A., Abou-Setta, L.M. 2014. The flavonoid constituents of *leucaena leucocephala*. growing in egypt, and their biological activity. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 11, 67-72.

Havelock, J.C., Rainey, W.E., Carr, B.R., 2004. Ovarian granulosa cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 228, 67–78. doi:10.1016/j.mce.2004.04.018

Henry, L.A., Witt, D.M., 2002. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. *Horm Behav* 41, 220–228. doi:10.1006/hbeh.2001.1754

Herbert, U., Ozoje, M.O., Adejumo, D.O., 2005. Effect of leucaena and gliricidia leaf meals on the seminal characteristics, testis weights and seminiferous tubule diameters of rabbits. *Animal Research* 54, 173–178. doi:10.1051/animres:2005017

Hernández-Elizondo, J., M. Mariscal-Arcas, A. Rivas, B. Feriche, J. Velasco y F. Olea-Serrano. 2009. Estimación de la ingesta de fitoestrógenos en población femenina. *Nutr. Hosp.* 24(4):445-451.

Holmes, J. H. G., Humphrey, J. D., Walton, E.A. y O'shea, J. D. 1981. Cataracts, goitre and infertility in cattle grazed on an exclusive diet of *Leucaena leucocephala*. *Australian Veterinary Journal* 57, 257–260.

<http://herbario.ual.es/portfolio-items/leucaena-leucocephala-lam-de-wit/>

Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.-J., Azhar, S., 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)* 7, 47. doi:10.1186/1743-7075-7-47

Jacob, D.A., J.L. Temple, H.B. Patisaul, L.J. Young, y E.F. Rissman. 2001. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor  $\alpha$ . *Exp. Biol. Med.* 226:301-306.

Johnston, I., 2003. *Phytochem Functional Foods*, 1st ed. CRC Press Incorporated.

Joshi, H., 1968. The effect of feeding on *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. on reproduction in rats. *Australian Journal of Agricultural Research* 19, 341. doi:10.1071/AR9680341

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15677–15682.

Lehmann, M.L., Erskine, M.S., 2004. Induction of pseudopregnancy using artificial VCS: importance of lordosis intensity and prestimulus estrous cycle length. *Hormones and Behavior* 45, 75–83. doi:10.1016/j.yhbeh.2003.09.011

López-Luengo, M. T. 2002. Fitoestrógenos. *Fitoterapia OFFARM*. Vol. (8): 136-140.

Ludueña, B., C. Mastandrea, C. Chichizola y M. Franconi. 2007. Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica *Bioquímica y Patología Clínica*. 71: 54-66.

Mani, S., y Portillo, W. 2010. Activation of Progesterone Receptors in Female Reproductive Behavior: Interactions with Neurotransmitters. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(2), 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.002>

Manna, P.R., Dyson, M.T., Stocco, D.M., 2009. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 321–333. doi:10.1093/molehr/gap025

Mazur, W. 1998. Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, vol 12, pp: 729-742.

McKay LI, Cidlowski JA. Hormones of the Adrenal Cortex. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, y col., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12994/>

Michopoulos, V., Wilson, M.E., 2011. Body weight decreases induced by estradiol in female rhesus monkeys are dependent upon social status. *Physiol Behav* 102, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.031>

Mirocha, C.J., G.Weaver, B. Gustafsson, M. Chi, S.V. Pathre, T.S., Robinson, y F. Bates. 1978. Pharmacological and toxicological studies on zearalenone in food producing animals. 125 p. Quarterly Report 11. FDA, Washington DC, USA.

Navarro, M.C., 2005. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y Obstetricia Clínica* 83, 297–303.

Ohno, S., Nakajima, Y., Inoue, K., Nakazawa, H., Nakajin, S., 2003. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. *Life Sci*. 74, 733–742.

Pérez-Rivero, J., A. Aguilar-Setién, J. Martínez-Maya, M. Pérez-Martínez y H. Serrano. 2006. Los fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. *Agricultura Técnica*. 67:325-331.

Pike, A.C.W., M. Brzozowski, A.E. Hubbard, R.T. Bonn, A. Thorsell, O. Engström, y col. 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.* 18:4608-4618.

Retana-Márquez, S., Juárez-Rojas, L., Hernández, A., Romero, C., López, G., Miranda, L., Guerrero-Aguilera, A., Solano, F., Hernández, E., Chemineau, P., Keller, M., 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, 1–10. doi:10.1016/j.physbeh.2016.05.004

Richard, J. E., López-Ferreras, L., Anderberg, R. H., Olandersson, K., & Skibicka, K. P. (2017). Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 78, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.01.014>

Rosselli, M., K. Reinhart, B. Imthurn, P.J. Keller, y R.K. Dubey. 2000. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum. Reprod. Update* 6:332-350.

Pallarés, G.M., 2009. Valoración No Invasiva de la Gestación y Embriogénesis en Ratón Mediante Técnicas de imagen Ultrasonográficas (Doctorado). Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Panter, K.E., Stegelmeier, B.L., 2011. Effects of Xenobiotics and Phytotoxins on Reproduction in Food Animals. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27, 429–446. doi:10.1016/j.cvfa.2011.02.010

Parrota, J. A. 1992. *Leucanea leucocephala* (Lam.) de Wit. *Leucanea*, tantan. Leguminosea (Mimosoidaea) Legume family. New Orleans, LA, USA:USDA Forest Service, Southern Forest Experiment Station, Institute of Tropical Forestry.

Patisaul, H.B., Adewale, H.B., 2009. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 3, 1–18.

Rimoldi, G., Christoffel, J., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W., 2007. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environ. Health Perspect.* 115 (Suppl. 1), 62–68.

Rodríguez de la C. R. M. y Pásaro D. R. 1998. Control endocrino del ciclo reproductor de la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico.

Santos, E.T., Dutra Sampaio, M.D., Cecon, P.R., Simões, M.J., Ferreira Sartori, M.G., Castello Girão, M.J.B., 2010. Effects of soy isoflavones on the uterus and urethra of ovariectomized rats. *Int. Urogynecol. J.* 21, 111–116.

Scandroglio, R., Spitali, R., 1968. Histochemical aspects of the vaginal epithelium of the mouse during the estral cycle. *Minerva Ginecol* 30, 1766–1767.

Sastry, M.S., Singh, R., 2008. Toxic effects of subabul (*Leucaena Leucocephala*) on the thyroid and reproduction of female goats. *ResearchGate* 78, 251–253.

Sethi, P. y Kulkarni, P. R. 1995. *Leucaena leucocephala*: A nutrition profile. *Food and Nutrition Bulletin* 16, 224–237.

Weihua, Z., S. Andersson, G. Cheng, E.R. Simpson, M. Warner, y J.A. Gustafsson. 2003. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett.* 546:17-24.

Whitten P.L., y H.B. Patisaul. 2001. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ. Health Perspect.* 109:5-20.

Whitten, P.L., H.B. Patisaul, y L.J. Young. 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol. Teratol.* 24:47-54.

Windaus, A., 1932. The Chemistry of the Sterols, Bile Acids, and Other Cyclic Constituents of Natural Fats and Oils. *Annu. Rev. Biochem.* 1, 109–134. doi:10.1146/annurev.bi.01.070132.000545

Wu Z., Y. Yang, Y. Chen, G. Xia, y R. Zhang. 2004. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. *Food and Chemical Toxicology.* Vol. 43, 1:167-172.

Zhao E y Mu Q. 2010. Phytoestrogen Biological Actions on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. *Scientia Pharmaceutica.* 79: 1-20.44

Zhu, B.T., Han, G.Z., Shim, J.Y., Wen, Y., Jiang, X.R., 2006. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: insight into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology* 147, 4132–4150.