

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud



**Aspectos moleculares de la estimulación con
fitoestrógenos en células de Leydig y Sertoli de ratones
CD-1**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

Presenta:

Biólogo Experimental Guillermo Mora Ramiro

Comité tutorial:

Director:

Dr. Héctor Fernando Serrano

Asesores:

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Dra. Iris Angélica Feria Romero

México, DF.

Diciembre 2013

Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionada por el CONACYT a través de la beca con número de registro 266030.

Miembros del Jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **Aspectos moleculares de la estimulación con fitoestrógenos en células de Leydig y Sertoli de ratones CD-1**, que presentó el **Biólogo Experimental Guillermo Mora Ramiro**. El día 02 de Diciembre de 2013.

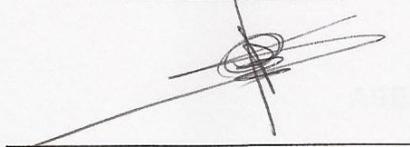
Sinodales

Presidente

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Profesor titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Email: asam@xanum.uam.mx



Secretaria

Dra. Iris Angélica Feria Romero

Investigador Asociado "B"

Unidad de Investigación en Enfermedades
Neurológicas
Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Email: irisferi@yahoo.com.mx

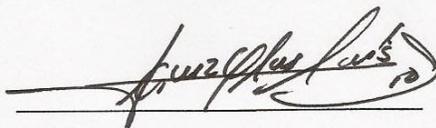


Vocal

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor titular "C"

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
gool@xanum.uam.mx

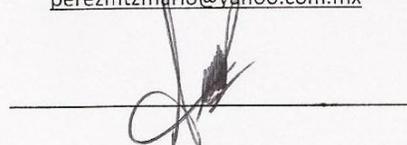


Vocal

Dr. Mario Pérez Martínez

Profesor titular "C"

Departamento de Morfología. Sección de Biología
Celular y Tisular
Universidad Nacional Autónoma Metropolitana
perezmtmario@yahoo.com.mx



Comité Tutorial

DIRECTOR

Dr. Héctor Fernando Serrano

Profesor titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: hser@xanum.uam.mx

ASESOR INTERNO

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Profesor titular

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: asam@xanum.uam.mx

ASESOR EXTERNO

Dra. Iris Angélica Feria Romero

Investigador Asociado "B"

Unidad de investigación en Enfermedades Neurológicas
Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Email: irisferi@yahoo.com.mx

Resumen

Introducción

Los fitoestrógenos son un grupo de moléculas polifenólicas muy similares a los estrógenos. Sus efectos son en órganos y tejidos cuya función es dependiente de estrógeno. La síntesis y algunos efectos del estradiol en el macho, se lleva a cabo en el testículo de manera local, por lo que los fitoestrógenos tienen su efecto en el testículo mediante su unión a ER, tanto α como β de forma similar a la que lo hacen los estrógenos endógenos. En los últimos años se ha observado que el uso de tales moléculas induce trastornos de la reproducción en un gran número de mamíferos, incluido el hombre. Es importante comprender los mecanismos moleculares asociados con el consumo de fitoestrógenos.

Material y métodos

En un modelo de ratón macho CD - 1, se probaron tres diferentes fitoestrógenos (coumestrol, genisteína y zearalonona) a diferentes concentraciones. Los animales fueron tratados durante 28 días. Después del tratamiento, los animales fueron sacrificados, y el análisis histológico se realizó en un testículo mientras que el otro fue utilizado para estudios de expresión génica relativa particularmente de CYP19A1, ER α y ER β , que responden a los estrógenos.

Resultados

El tratamiento oral de los tres diferentes fitoestrógenos genera una disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos. A nivel molecular, la transcripción de los productos génicos de CYP19A1 gen de la aromatasa del ratón aumentó en los animales tratados con coumestrol, mientras que los del gen de ER α disminuye de manera significativa, en particular en dosis bajas y altas. Los tratamientos con zearalonona inducen transcripción del gen ER β en las concentraciones probadas más altas y bajas.

Discusión y conclusión

A nivel general, los fitoestrógenos inducen alteraciones en el histo-arquitectura de los testículos, así como alteraciones en la expresión de los genes blanco, especialmente en los que tienen papeles importantes en la fisiología de la reproducción como es el caso de CYP19A1 y ambos ER.

Abstract

Introduction

Phytoestrogens are a group of polyphenolic molecules very similar to estrogens. Their effects are on organ and tissue whose function is estrogen dependent. The synthesis and some effects of estradiol are local in the male testis, are performed in the testis locally, and phytoestrogens have their effects in the testis by binding to both ER α and ER β , as endogenous estrogens do. In the past few years it has been observed that the use of such molecules induces reproductive disorders in a large number of mammals, including man. It is important to understand the molecular mechanisms associated with the consumption of phytoestrogens.

Material and methods

In a CD-1 male mouse model, were tested three different phytoestrogens (coumestrol, genistein and zearalonone) at different concentrations. Animals were treated during 28 days. After treatment, animals were sacrificed, and histological analysis performed in one testis whereas the other was used for relative gene expression studies particularly of CYP19A1, ER α and ER β , responsive to estrogen.

Results

Oral treatment of all three different phytoestrogens generates a decrease in the diameter of seminiferous tubules. At the molecular level, transcription of the gene products of CYP19A1 aromatase gene mouse increased in coumestrol treated animals, whereas those from ER α gene decreases significantly, particularly in low and high doses. Zearalonone treatments induce transcription of the ER β gene at the higher and lower concentrations tested.

Discussion and conclusion

At the general level, Phytoestrogens induce alterations in the histoarchitecture of the testis, as well as alterations in the expression of target genes, especially those having important roles in reproductive physiology as is the case the CYP19A1 and both ER.

Índice

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Mecanismo de acción de los fitoestrógenos	3
1.2 Clasificación de los fitoestrógenos y algunas de sus fuentes biológicas	6
1.3 Estructura y respuesta de los receptores a estrógenos	8
1.4 Fitoestrógenos en la alimentación	11
1.5 Fitoestrógenos en el desarrollo.....	12
1.6 Acción de los fitoestrógenos en la reproducción masculina.....	14
2 ANTECEDENTES	16
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	19
6 HIPÓTESIS	19
7 OBJETIVO GENERAL.....	20
8 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
9 MATERIAL Y MÉTODOS	21
9.1 Modelo animal	21
9.1.1 Animales	21
9.1.2 Tratamiento	21
9.2 Obtención de la muestra.....	22
9.2.1 Disección de los testículos	22
9.2.2 Obtención de fracciones enriquecidas	23
9.3 Procesamiento de la muestra	25
9.3.1 Análisis de la histo-arquitectura testicular	25

9.3.2 Extracción de ARN.....	26
9.3.3 Diseño de oligonucleótidos iniciadores	28
9.3.4 Retro-transcripción del ARN.....	29
9.3.5 Amplificación por PCR	29
9.4 Análisis estadístico	31
10 RESULTADOS	31
10.1 Peso corporal.....	31
10.2 Relación peso testicular /peso corporal	32
10.3 Histo-arquitectura testicular	36
10.4 Obtención de fracciones enriquecidas	44
10.5 Extracción de ARN y retro-transcripción	47
10.6 Amplificación por PCR y densitometría.....	49
10.7 Expresión relativa	51
11 DISCUSIÓN	57
Dosis de los tratamientos.....	57
Tamaño testicular e histo-arquitectura.....	59
Obtención de fracciones enriquecidas	62
Extracción de ARN.....	63
Expresión relativa	64
12 CONCLUSIONES.....	69
13 PERSPECTIVAS	70
13 BIBLIOGRAFÍA	70

1 INTRODUCCIÓN

Los fitoestrógenos son un grupo de moléculas polifenólicas no esteroideas presentes en plantas con actividad natural bactericida y fungicida de patógenos vegetales. La familia incluye varios miembros (figura 1) como: las flavonas (kaempferol y quercitina), isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina y equol), lignanos (enterolactona, enterodiol y ácido nordihidroguaiarético), coumestanos (coumestrol), micotoxinas (zearalonona) y stilbenos (resveratrol) (Zhao y Mu, 2010).

Estos han sido considerados como sustancias que presentan efectos benéficos en diferentes patologías como son la acción terapéutica y preventiva en carcinogénesis, aterosclerosis y osteoporosis. Aunque, también han sido considerados como sustancias tóxicas que tienen efectos perjudiciales sobre la fisiología de los mamíferos, generando alteraciones en la función reproductiva e incrementando la infertilidad (Patisaul, 2005). Otra definición de este tipo de moléculas es el de disruptores endocrinos (DE); considerados como sustancias exógenas o compuestos que causan efectos adversos en los organismos por la interrupción de la función endocrina (Ünüvar y Büyükgebiz, 2012). Como se puede ver en la figura 1, una característica que presentan es su sorprendente similitud en estructura a los estrógenos naturales, como el estradiol (Pérez Rivero *et al.*, 2007, Retana Márquez *et al.*, 2012), esto sugiere que estos compuestos ejercen su efecto fisiológico en tejidos específicos que responden a estrógenos. No obstante que algunos autores han propuesto que su efecto no solo se debe a la similitud estructural, si no que a su

vez, estos compuestos sufren modificaciones en su estructura durante su recorrido desde su ingesta hasta el órgano blanco (Kiriata *et al.*, 2011, Pérez-Rivero *et al.*, 2007), un ejemplo de este proceso lo describe Woclawek- Potocka y col. (2013) para el caso de las isoflavonas: daidzeina y genisteína (Woclawek-Potocka *et al.*, 2013).

En los últimos años estas moléculas han cobrado importancia debido a que las investigaciones realizadas sobre estos compuestos muestran que la exposición a los DE repercute negativamente en la fertilidad tanto en animales como en humanos (Jefferson *et al.*, 2012, Lenis *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 2012). Además, se ha reportado la capacidad que presentan estas sustancias para actuar como agonistas o antagonistas de los estrógenos naturales y ejercer su influencia en tejidos que presentan receptores a estrógenos (ER por sus siglas en inglés) tanto en el macho como en la hembra de diferentes especies (Pérez-Rivero *et al.*, 2007).

1.1 Mecanismo de acción de los fitoestrógenos

El mecanismo principal por el cual los fitoestrógenos influyen en los sistemas sensibles a estrógenos es mediante su unión con los ER's clásicos o vía genómica (figura 2). Se han descrito dos subtipos de receptores, los ER α , y ER β , con 95% de homología en la región de unión a ADN y 55% de homología en el dominio de unión a estrógenos (Whitten *et al.*, 2001). Los ER se encuentran distribuidos de manera diferente en los tejidos dependiendo la etapa del desarrollo (Patisaul, 2005) cumpliendo diferentes funciones de regulación y expresión génica mediante la vía

clásica o genómica (Jefferson *et al.*, 2012). En tejido adulto se ha reportado que los ER α tienen una mayor prevalencia en glándula mamaria, placenta, hígado, algunas regiones del cerebro y en hueso. Por su parte, los ER β son abundantes en tejido glandular, regiones del cerebro como el hipotálamo, hipófisis, cerebelo, lóbulo olfatorio y en tejido reproductivo como ovarios y testículo (Lenis *et al.*, 2010, Pérez-Rivero *et al.*, 2008, Serrano y Pérez-Rivero, 2010).

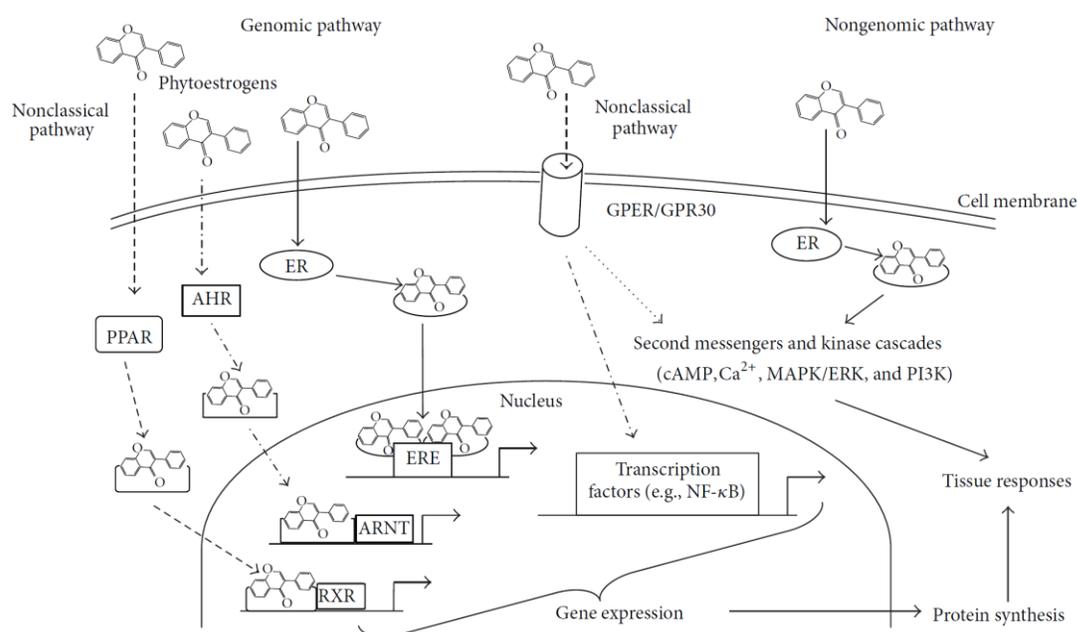


Figura 2. Posibles mecanismos de los fitoestrógenos. Modelo esquemático que ilustra los posibles mecanismos de acción de los fitoestrógenos, (las abreviaturas en la figura significan: AHR-Receptor de aril hidrocarburos; ARNT-translocador nuclear de AHR; ER-Receptor a estrógenos; ERE-Elemento de respuesta a estrógeno; cAMP-Adenosin mono fosfato cíclico; Ca²⁺ iones de calcio; GPER/GPR30-Receptor de estrógenos acoplado a proteína G; MAPK/ERK-Proteína cinasa activada por mitógenos/Cinasas reguladas por señalización extracelular; NF- κ B-factor nuclear kappa B; PI3K-Fosfatidilinositol 3 cinasa; PPAR-Receptor activado por proliferación de peroxisomas; RXR-Receptor X de retinoides (Woclawek-Potocka *et al.*, 2013).

La afinidad de los fitoestrógenos con los ER α y ER β son relativamente menores en comparación con estradiol (Wu *et al.*, 2012) y como ya se ha mencionado, pueden tener actividad agonista o antagonista (Pérez-Rivero *et al.*, 2007) en función de la dosis y de la presencia en el medio de estradiol (Shanle y Xu, 2011). Varios fitoestrógenos han sido considerados como moduladores selectivos de receptores de estrógenos o SERMs por sus siglas en inglés (Whitten *et al.*, 2001) ya que presentan (Tabla 1), una mayor afinidad para ER β que para ER α (Lorand *et al.*, 2010, Patisaul, 2005).

Tabla 1.

Afinidad de unión relativa de los ER α y ER β a compuestos Disruptores endocrinos. El 17 β -estradiol es el valor considerado como 100 para los dos receptores. La fitoestrógenos (coumestrol, daidzeina y genisteína) presentan una mayor afinidad por los ER β que por los ER α (Basado en Patisaul, 2005).

Compuesto	ER alfa	ER Beta
17β-estradiol	100	100
17α-estradiol	7	7
Dietilstilbestrol (DES)	236	221
4-OH-Tamoxifen	257	232
Coumestrol	20	40
Daidzeina	0,1	0,5
Genisteína	4	87
Bisfenol A	0,01	0,01
Metoxicloro	0,01	0,01
Testosterona	>0,01	>0.01
Progesterona	>0,01	>0.01

Otros mecanismos de acción que se han descrito para los fitoestrógenos se llevan a cabo mediante la vía no clásica o vía no genómica (figura 2). Este tipo de acción

evoca diferentes vías de señalización, como es el caso de las vías de estrés oxidativo, cinasas de tirosina, el factor nuclear kappa B y cinasas reguladas por señales extracelulares (Watson *et al.*, 2007). También se han descrito que pueden alterar las marcas epigenéticas mediante la alteración de las actividades de la DNA metiltransferasas y desacetilasas de histonas (Wilson *et al.*, 2008). Por último, también se han visto involucrados en alteraciones de la aromatización de los andrógenos a estrógenos por efecto de la aromatasa (Kao *et al.*, 1998, Shanle y Xu, 2011).

1.2 Clasificación de los fitoestrógenos y algunas de sus fuentes biológicas

Flavonoides. En este grupo está la naringenina, Zierau y col. (2008) la caracterizaron como un fitoestrógeno potente al utilizarlo en un modelo de rata ovariectomizada. Este flavonoide que se encuentra en algunos árboles africanos como el *Monotes engleri*, presentan una mayor afinidad por los receptores a estrogénos tipo α (Zierau *et al.*, 2008).

Isoflavonoides o isoflavonas. En este grupo encontramos a la genisteína y a la daidseína, que actualmente son los fitoestrógenos más estudiados. Estos pueden existir como derivados glucosilados o en forma de agliconas. En su forma glucosilada son tres veces más potentes que el estradiol; sin embargo, son las agliconas las que más fácilmente son transportados y absorbidos a través del epitelio intestinal (Bonilla,

2004). La principal fuente de estas sustancias son bayas, vinos, cereales, frutas secas, leguminosas y las semillas de soya (Patisaul *et al.*, 2010).

*Lignan*os. Este término se asigna a varias clases de fenilpropanoides con estructuras químicas dimericas u oligomericas. Para su absorción son transformados en enterodiol o enterolactona por la flora microbiana del intestino en los mamíferos; los alimentos ricos en lignanos son las frutas, semillas de linaza, granos y nueces (Glitsso *et al.*, 2000).

*Coumest*anos. Muy pocos de estos compuestos muestran actividad estrogénica, a excepción del coumestrol, el cual se ingiere en su forma inactiva de 4´metoxi coumestrol, estructura que se encuentra principalmente en el germen de la soya (Pérez-Rivero *et al.*, 2007).

Micotoxinas. Uno de los principales representantes de este grupo es la zearalonona, molécula presente en el maíz en diferentes cantidades. Aunque existen poca información bibliográfica de los efectos producidos por su consumo, se sabe que su consumo accidental altera la función reproductiva; esto demostrado en cerdos alimentados con maíz contaminado con hongos que producen altas consentraciones de estos compuestos (Malekinejad *et al.*, 2005, 2007).

1.3 Estructura y respuesta de los receptores a estrógenos

Como se mencionó anteriormente, los fitoestrógenos inducen diferentes respuestas mediante diferentes mecanismos. Estudios previos han reportado que el mayor efecto de estas moléculas está dado mediante la vía clásica o genómica de los ER; principalmente mediado por los ER β . El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta respuesta, ya sea mediante estrógenos endógenos y DE está elucidado a diferentes niveles (Lenis *et al.*, 2010).

Los ER pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares y presentan cinco dominios diferentes. El primero de ellos (A/B) forma el extremo amino terminal de la proteína, con una serie de aminoácidos colocados en posiciones específicas a cada receptor que permiten la interacción del receptor con la maquinaria de transcripción. El dominio C, también conocido como dominio de unión al ADN (DBD), está formado por dos sitios de unión de Zinc, los cuales son coordinados por dos pares de cisteínas separadas por 10-15 aminoácidos que permiten exponer en sus regiones de interacción con secuencias de nucleótidos específicas, aminoácidos de características básicas; esta estructura clásica de los factores de transcripción se denomina dedos de zinc. El dominio D es una región que actúa como bisagra entre el DBD y el dominio de unión al ligando; en esta región se encuentra una secuencia de aminoácidos con características ácidas que es reconocida por proteínas transportadoras que le permiten ser transportada hacia el núcleo de la célula por lo que se denomina secuencia de localización nuclear (NLS). Las proteínas

transportadoras permiten la interacción entre el receptor y los componentes del complejo de poro; en ausencia de ligando, la NLS no se encuentra expuesta y el ER se mantiene en el citoplasma. El dominio E es el punto de regulación más importante de la proteína. En esta región se encuentran los residuos de aminoácidos responsables de la unión con el ligando (LBD) y presenta funciones muy importantes que permiten la regulación de la actividad del receptor. La activación de la transcripción y la interacción de algunos residuos de aminoácidos para la dimerización del receptor son funciones complementarias de este dominio, además de ser responsable de la asociación con proteínas de carácter represoras o co-activadoras. El último dominio es el F; éste se encuentra en el extremo carboxilo terminal, está formado por una cadena de residuos de aminoácidos que coadyuva a la estructura del receptor para mantener la estabilidad de la región LBD y su interacción proteínica, además de que se encarga de diferenciar el efecto agonista o antagonista cuando se une el ligando (Pérez-Rivero *et al.*, 2007, Serrano y Pérez-Rivero, 2010).

Hasta ahora se han identificado dos isoformas de receptores estrogénicos, los ER α y los ER β . Estos representan dos herramientas diferentes para la señalización estrogénica con propiedades funcionales específicas (Simoncini, 2010).

En su forma inactiva los receptores se encuentran en el citoplasma unidos a un complejo formado por proteínas de choque térmico como hsp90, hsp70, hsp56 y

hsp59, quienes evitan así su translocación al núcleo (Noriega *et al.*, 2008, Simoncini, 2010, Serrano y Pérez-Rivero, 2010).

La unión del ligando al ER induce la modificación en su conformación y entonces promueve la liberación de las proteínas “chaperonas”. A diferencia de los receptores localizados en las membranas que requieren de una cascada de modificaciones covalente como la fosforilación en diferentes proteínas para dar inicio y mantener la serie de reacciones que le permiten a la célula responder al estímulo, los receptores estrogénicos se “activan” con la unión del ligando.

Una vez que el ligando ha inducido el cambio conformacional que libera a las chaperonas, se forman homodímeros (alfa-alfa, beta-beta) o heterodímeros (alfa-beta) y en este estado dimerizado, se translocan al núcleo y se unen a secuencias del ADN conocidos como elementos de respuesta a estrógenos (EREs) que se encuentran en la región promotora de los genes blanco, regulando así su expresión mediante la interacción con la maquinaria molecular de transcripción (Simoncini, 2010).

Los genes que responden a estrógenos se ha visto que presentan secuencias imperfectas no palindrómicas y se han localizado EREs funcionales en promotores de genes humanos como pS2, oxitocina, c-fos, c-myc, TGF- α , lactoferrina, prolactina, catepsina D, complemento 3, stat3, Cox-2 y Cyp450 (aromatasa); además de los mismos receptores a estrogénos (Noriega *et al.*, 2008).

1.4 Fitoestrógenos en la alimentación

En los últimos años el cambio en los hábitos alimenticios, ha generado la incorporación a la dieta de compuestos *bioactivos* que generan respuestas fisiológicas estrogénicas en los mamíferos, como es el caso de los flavonoides, isoflavonas, lignanos y coumestanos. Aunque algunos estudios han generado resultados preliminares del mecanismo de los fitoestrógenos contenidos en las dietas ricas en estos compuestos y sus efectos en la reproducción, falta mucho por saber con respecto a la respuesta moleculares de estas sustancias (Bacciottini *et al.*, 2007).

Los fitoestrógenos se encuentran presentes en muchos alimentos de consumo humano, incluyendo frutas como la ciruela, pera, manzana, uva; en verduras como la col, las espinacas, el ajo, la cebolla, en leguminosas como la alfalfa y la soya (Kuhnle *et al.*, 2009, Lenis *et al.*, 2010, Minervini y Dell'Aquila 2008, Pérez-Rivero *et al.*, 2007) y en cereales, vinos y tés. Actualmente se han identificado en suplementos dietéticos con sustancias de origen vegetal.

La concentración y el tipo de fitoestrógenos presentes en una planta determinada, varía dependiendo de las condiciones de crecimiento de ellas, el tipo de suelo, las condiciones climáticas, tipo de abono y la propia edad de la planta (Bacciottini *et al.*, 2007). En algunos casos, la producción de fitoestrógenos en las plantas se encuentra asociada a una respuesta natural a la infección ocasionada por hongos. Si bien el trébol rojo presenta una cantidad importante de DE en forma natural, cuando la

planta se encuentra infestada con el hongo *Glomus mosseae*, presenta un incremento en la concentración de biochanina A como respuesta a la infección (Lenis *et al.*, 2010). La exposición de embriones y ovocitos de cerdo a zearalenona causan aneuploidía y desarrollo embrionario anormal (Malekinejad *et al.*, 2007)

Los lignanos son componentes de la pared celular de las células vegetales, como se mencionó anteriormente se encuentran principalmente en los alimentos ricos en fibra como frutas, semillas de linaza, granos y nueces. Este tipo de fitoestrógenos es quizás el menos caracterizado debido a su amplia gama de componentes derivados. Sin embargo, se ha encontrado que estos componentes afectan la producción de gametos (Ogborn *et al.*, 1998). De todos los fitoestrógenos, los grupos más estudiados son las isoflavonas y los coumestanos por su asociación en las alteraciones reproductivas de algunos animales de granja debido a su consumo (Pérez-Rivero *et al.*, 2007).

1.5 Fitoestrógenos en el desarrollo

La cantidad de fitoestrógenos que se consumen en la dieta son muy variables y dependen principalmente del consumo de soya por lo que sus niveles en suero también son altamente variables (Verkasalo *et al.*, 2001). En poblaciones asiáticas, la cocina tradicional incorpora un alto contenido de soya, presentando niveles de 500 nM de fitoestrógenos en circulación, mientras que en países Europeos y de América

del norte con un consumo bajo de soya, el promedio oscila en los 148 nM (Morton *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo en el útero, los fetos de humano están expuestos a los DE que se ingieren en la dieta materna, a pesar de la barrera feto-placentaria que “protege” al feto de la exposición de productos químicos exógenos. En el caso particular de los fitoestrógenos, la mayor parte entra en la circulación fetal ya sea por difusión pasiva o transporte activo (Jefferson *et al.*, 2012). Un ejemplo de esto es la genisteína que es detectada en el líquido amniótico al segundo trimestre de embarazo en niveles similares presentes en el suero de adultos, con una relación 10-20 veces mayor que los niveles promedio de estradiol presente en el líquido amniótico en ese momento del embarazo (Foster *et al.*, 2002).

Aunque los bebés pueden estar expuestos a los fitoestrógenos a través de la leche materna, la más alta exposición se produce en los lactantes alimentados con fórmula a base de soya. Estos presentan niveles séricos de 1-10 mM algunas horas después de la alimentación (Cao *et al.*, 2009). La actividad estrogénica de fórmula a base de soya en humanos lactantes se encuentra ampliamente documentada. En un estudio transversal con bebés alimentados con leche materna, leche de soya y leche de vaca o fórmula durante los primeros tres meses de edad, dos niñas alimentadas con fórmula de soya mostraron un aumento en los niveles de estrógenos, incluso tres meses después de realizado el estudio (Jefferson *et al.*, 2012).

La permanencia de los fitoestrógenos y sus efectos se han mostrado en diferentes etapas del desarrollo humano. Por ejemplo, se ha correlacionado una dieta rica en fitoestrógenos de madres cuyos hijos varones muestran una menor incidencia de hipospadias. En mujeres menopáusicas o posmenopáusicas, la ingesta de fitoestrógenos disminuye la incidencia y severidad de osteoporosis, sobre todo en aquellas sometidas a terapia de reemplazo hormonal. Sin embargo, en etapas tempranas también se presentan con efectos negativos como ocurre con la retención placentaria y el aumento de ovario poliquístico (Pérez-Rivero *et al.*, 2007).

1.6 Acción de los fitoestrógenos en la reproducción masculina

En los últimos años, la salud reproductiva masculina se ha deteriorado considerablemente (Prakash *et al.*, 2011). Hace dos décadas el índice de infertilidad era de una de cada quince parejas, pero para el 2008 se estimó que la infertilidad afectaba a una de cada seis parejas, siendo el hombre el responsable de casi la mitad de los casos (Brugo-Olmedo *et al.*, 2008). Como responsables de este problema se han señalado a factores como el estilo de vida, el medio ambiente, el estrés y a los hábitos alimenticios. Prakash y colaboradores en 2011 propusieron que el deterioro considerable de la salud reproductiva masculina en términos de número de espermatozoides y la calidad espermática observada en los últimos años, se debe al consumo de fitoestrógenos a través de la comida; esta aseveración se fundamentó en los efectos que los fitoestrógenos producen en los animales de granja y animales de compañía al consumirlos (Prakash *et al.*, 2011).

Se ha visto que los fitoestrógenos afectan la actividad en el testículo, aparentemente mediada por la presencia de ER β en regiones como conductos eferentes, epidídimo, conductos deferentes, y próstata (Saunders *et al.*, 2005). Este mismo tipo de receptores han sido descritos en las células de Sertoli y Leydig además de espermatogonias y espermatocitos (Pérez-Rivero *et al.*, 2007). En células de Sertoli estarían interviniendo a nivel de la espermatogénesis mientras que en las células de Leydig, lo harían en la esteroidogénesis (Prakash *et al.*, 2011).

En el testículo de los mamíferos se llevan a cabo dos funciones principales, la síntesis de esteroides y la producción de espermatozoides. Estas funciones son controladas principalmente por dos gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), así como la testosterona, y numerosos factores que son producidos localmente en el testículo, entre los que se encuentran los estrógenos (Carreau *et al.*, 2011). Por tanto, uno de los genes clave en la función reproductiva masculina es el gen CYP19A1 (aromatasa) de la súper familia de citocromo p450, no solo por su participación en la vía de síntesis de estrógenos a partir de andrógenos (androstenediona en estrona y la testosterona en estradiol) que se realiza en las células de Leydig (Carreau *et al.*, 2006) y en células de Sertoli (Carreau *et al.*, 1996, 2002, 2011), si también, por ser un gen que es regulado mediante la vía de receptores estrogénicos en estas células.

2 ANTECEDENTES

A partir del descubrimiento de los efectos de los fitoestrógenos en la producción de gametos, retención de placenta e inducción de síndromes estrogénicos en la década de los 40's (Lenis *et al.*, 2010, Patisaul *et al.*, 2010), muchos estudios se han llevado a cabo y demostrado que es un aspecto que requiere su estudio detallado en diferentes especies. En 1987, se observó que guepardos sometidos a una dieta alta en soya presentaban infertilidad que se revertía una vez que se retiraba la soya en la dieta (Setchell *et al.*, 1987). Este mismo efecto de los fitoestrógenos ha sido estudiado en otros animales sometidos a cautiverio, pero principalmente en animales de granja, debido a la importancia comercial que representan. Por ejemplo, se ha visto que la ingesta de coumestrol en bovinos macho ocasiona un aumento en el número de espermatozoides inmaduros y una disminución en la movilidad (Romero *et al.*, 1997). En cerdos la ingesta de 25-50 mg/kg de zearalonona promueve una disminución en el número de lechones nacidos, así como también del tamaño de las crías (Lenis *et al.*, 2010).

En ratas machos de 2 días de nacidos a los cuales se les inyectaron 4 mg/kg de genisteína por vía subcutánea durante 16 días, se inhibió el desarrollo testicular a corto y a largo plazo (Atanassova *et al.*, 2000). Por otro lado ratas macho adultas expuestas a dosis de 500 mg/kg/día de genisteína durante 52 semanas, dieron como resultado un aumento en el peso de los testículos en comparación con las ratas control (McClain *et al.*, 2006 y 2007).

El efecto de la administración de 150-500 mg/kg/día de genisteína en perros macho de raza Beagle por un periodo de cuatro semanas, presentan una reducción del tamaño del parénquima testicular, atrofia prostática y ausencia de espermatozoides en el epidídimo. (Lenis *et al.*, 2010). En otro experimento también con perros en situación de calle a los cuales se les administraron 300 µg/kg de coumestrol por vía oral una vez por semana durante cuatro semanas, se presentaron alteraciones en la conducta de exploración olfatoria, y la espermatobioscopía mostraba que los animales bajo tratamiento tenían una clasificación como oligospermicos y teratospermicos (Pérez-Rivero *et al.*, 2007).

En suma, los fitoestrógenos inducen una amplia gama de alteraciones y efectos en la función reproductiva de los machos expuestos experimental o accidentalmente a ellos. Estas alteraciones varían desde la conducta exploratoria, la disminución en la producción de espermatozoides viables y un aumento en la cantidad de espermatozoides inmaduros, la disminución en la movilidad espermática y la atrofia testicular, inhibiendo el desarrollo funcional a corto y largo plazo de la gónada. Nuestro grupo de investigación y otros han demostrado los efectos fisiológicos de los fitoestrógenos; sin embargo faltan estudios que permitan un avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que se alteran en respuesta a estas sustancias, y que puedan explicar las alteraciones fisiológicas ya descritas. Una aproximación es utilizar el modelo de ratón para analizar la expresión de algunos de los genes que son regulados por los receptores nucleares a los cuales se unen los fitoestrógenos.

3 JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones en la capacidad reproductiva masculina de la población humana han aumentado tanto por cambios en el estilo de vida, el estrés y/o aspectos básicos como la alimentación. En este sentido, la dieta particular de los individuos que se había mantenido dentro de una variación restringida por la disponibilidad de recursos principalmente locales, a raíz de la globalización se ha modificado, como ocurre con la población mexicana que cada vez es más frecuente que incorpore componentes típicos de la comida asiática como germen de soya, aceites diferentes a los de cártamo, grasas vegetales solidificadas como el Tofu entre muchos otros. De la misma forma, la agricultura orgánica ha favorecido que los alimentos contengan una mayor cantidad de metabolitos secundarios como los fitoestrógenos, que al ser consumidos alteran de forma directa o a través de sus metabolitos, procesos de la reproducción masculina como la esteroidogénesis y la espermatogénesis.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ingesta de Fitoestrógenos es un fenómeno asociado a las alteraciones en la capacidad reproductiva de diferentes animales tanto de vida silvestre, como de compañía. El mecanismo por el cual los fitoestrógenos afectan la función reproductiva, desde la gametogénesis hasta el desarrollo de la conducta de apareamiento, está bien documentado desde el enfoque fisiológico. Sin embargo, son escasos y poco concluyentes los estudios que tratan de analizar las alteraciones

a nivel de la transcripción de genes que regulan los diversos aspectos de la formación de gametos, conducta de apareamiento, por mencionar algunos de sus efectos.

La presencia de receptores beta en el testículo, específicamente en las células de Leydig y Sertoli, permite proponer un modelo de estudio que explique las alteraciones en la estructura testicular y funcionamiento de la reproducción masculina. Este estudio pretende conocer la respuesta a nivel molecular mediante el análisis de genes blanco a los ER como CYP19A1, ER α y ER β en células de Leydig y Sertoli expuestas a fitoestrógenos.

5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto sobre la expresión de los genes de CYP19A1, ER α y ER β en células de Leydig y Sertoli de ratones CD-1 en respuesta a la administración oral de fitoestrógenos en diferentes concentraciones?

6 HIPÓTESIS

Las células de Leydig y de Sertoli de ratones CD-1 presentan ER por lo que al administrar oralmente fitoestrógenos se observará una variación en la cantidad de ARNm en los genes CYP19A1, ER α y ER β en comparación con los animales no tratados.

7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las alteraciones en la expresión de los genes CYP19A1, ER α y ER β en células de Leydig y Sertoli de ratones CD-1 adultos, en respuesta a la administración oral de diferentes concentraciones de coumestrol, genisteína y zearalonona.

8 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el contenido relativo de ARNm de los genes CYP19A1, ER α y Er β en fracciones enriquecidas de células de Leydig y Sertoli.
- Evaluar las variaciones en el contenido relativo de ARNm de fracciones enriquecidas de células de Leydig y Sertoli, bajo condiciones de estimulación con fitoestrógenos.
- Evaluar las alteraciones testiculares en respuesta a la administración oral de fitoestrógenos.

9 MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Modelo animal

9.1.1 Animales

Se utilizaron 50 ratones macho CD-1 de 2 meses de edad, alojados en jaula de acrílico con cama de aserrín, los cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura, luz-oscuridad (12 x 12 hrs) y con un acceso *ad libitum* de agua.

9.1.2 Tratamiento

Después de pesar a los animales provenientes de diferentes camadas, se distribuyeron al azar en cada uno de los 10 grupos que se formaron con 5 ratones en cada grupo. Durante siete días se registró el consumo diario de alimento de cada grupo (Pellet's *teklad global diets*, mca. TEKLAD, USA. 18% proteína cruda, 5% grasa cruda y 5% fibra cruda) y al final se obtuvo el promedio de consumo diario por grupo (Tabla 2).

Utilizando el peso promedio y el consumo promedio de cada uno de los 10 grupos se determinó la cantidad de fitoestrógenos necesarios para los diferentes tratamientos (control, Cou 10, 20 y 30, Gen 20, 40 y 80, Zea 10, 20 y 40), como se muestra en la tabla 2. La dieta diaria de cada uno de los ratones fue preparada adicionando la cantidad de fitoestrógeno requerido por tratamiento disuelto en 100 µl de Dimetil

sulfoxido (DMSO, Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo,USA) utilizado como vehículo. Al grupo control solo se le administró la dieta más DMSO. Los diferentes tratamientos fueron administrados durante 28 días.

Tabla 2.

Consumo diario de fitoestrógenos por tratamiento Se formaron 10 grupos y se determinó la cantidad para cada uno de los diferentes fitoestrógenos y dosis requerida en la dieta para cada uno de los grupos.

	Grupo	Promedio de peso inicio del tratamiento	Consumo diario de alimento por ratón en gramos	µg de FE administrados en la dieta diariamente por ratón
1	Control	29,67 ±3,06	4,75	0,0000
2	Cou 10 µg/kg por día	33,2 ±3,19	5,52	0,3320
3	Cou 20 µg/kg por día	35,4 ±2,19	4,97	0,7080
4	Cou 40 µg/kg por día	37,2 ±3,11	5,42	1,4880
5	Gen 20 µg/kg por día	35,4 ±2,70	5,52	0,7080
6	Gen 40 µg/kg por día	37 ±4,18	5,35	1,4800
7	Gen 80 µg/kg por día	35,2 ±2,86	5,37	2,8160
8	Zea 10 µg/kg por día	38,40 ±1,52	5,25	0,3840
9	Zea 20 µg/kg por día	37,8 ±6,30	4,65	0,7560
10	Zea 40 µg/kg por día	42 ±3,87	5,35	1,6800

9.2 Obtención de la muestra

9.2.1 Disección de los testículos

Los ratones previamente pesados fueron sacrificados por dislocación cervical, colocados en decúbito dorsal y se esterilizó la región abdominal con etanol al 70%. Los testículos fueron extraídos mediante una incisión en la línea media ventral que

abarco piel, músculo y peritoneo, para exponer el contenido visceral y ser extirpados asépticamente y lavados en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) pH 7.4 sin suplementos. Finalmente los testículos extraídos fueron pesados y procesados ya sea para el aislamiento de las fracciones enriquecidas en células testiculares o para el estudio histológico.

9.2.2 Obtención de fracciones enriquecidas

Las células de Leydig y Sertoli se separaron según la metodología de Subeer y colaboradores (1995), modificada. Brevemente, el testículo fue des-encapsulado mecánicamente en una caja de Petri con medio DMEM y lavado con 10 ml de amortiguador de fosfatos (PBS, pH 8) dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente, el tejido se agitó durante 1 minuto a 37⁰C (80 osc/min) en baño María (BLUE M ELECTRIC, USA), posteriormente se colocó en hielo por 5 minutos, y se descartó el sobrenadante.

Al tejido des-encapsulado y limpio de sangre se le agregaron 7 ml de una solución de colagenasa tipo I (1 mg/ml. SIGMA, USA), incubándose a 37⁰C durante 18 minutos con agitación constante. Para la inactivación de la colagenasa, la muestra fue incubada posteriormente en hielo durante 5 minutos. Se transfirieron los 7 ml a dos tubos cónicos Falcon de 15 ml (3.5 ml de la muestra por tubo) para la separación de las fracciones “crudas” (intersticial y tubular) mediante un gradiente de Ficoll: 2 ml de Ficoll (Ficoll 400, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) al 10% al fondo del tubo y

en la parte superior 3 ml de Ficoll al 5%. La muestra se dejó sedimentar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Se recolectaron los 5.5 ml de la fracción superior y se transfirieron a un nuevo tubo cónico (fracción inicial de células intersticiales). Los siguientes 2 ml de la muestra se recolectaron en otro tubo de igual forma (Fracción inicial tubular), de esta manera se obtuvieron las dos fracciones crudas iniciales, intersticial y tubular.

Los 5.5 ml de la fracción intersticial se centrifugaron a 1500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fue decantado el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica de Krebs-Ringer (125 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO₄, 35 mM de tris, 1 mM de NaH₂PO₄, pH 7.4) adicionado con glucosa al 0.2% (KRBG) y se colocó en un tubo cónico con 10 ml de solución KRBG-Ficoll al 13% a pH 6.5. Se dejó sedimentar durante 15 min a temperatura ambiente antes de ser centrifugada durante 10 min a 1 x g. Se retiró el sobrenadante por decantación y el sedimento obtenido correspondió a la fracción enriquecida de células de Leydig.

La segunda fracción o fracción tubular con los 2 ml fue vertida en una caja de Petri estéril para el fraccionamiento mecánica de los túbulos. El macerado se transfirió a un matraz estéril con 10 ml de una solución de KRBG y pancreatina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a una concentración de 0.2 mg/ml durante 20 minutos a 28^oC, con agitación constante. Para la inactivación de la pancreatina, la muestra fue incubada en hielo durante 5 minutos. La suspensión celular se sedimentó durante 30

minutos en 2 tubos cónicos en un gradiente discontinuo de sacarosa (Baker Analyzed, USA) en KRBG del 6 al 2 % con intervalos simétricos de volúmenes de 1.5 ml cada uno. Las fracción entre 4 y 5% fueron recuperadas y centrifugadas a 500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento obtenido correspondió a la fracción enriquecida de células de Sertoli.

9.3 Procesamiento de la muestra

9.3.1 Análisis de la histo-arquitectura testicular

Después de haber sido obtenidos y lavados los testículos como se describió en el apartado respectivo, uno de los testículos fue utilizado para la obtención de las fracciones enriquecidas de células de Leydig y Sertoli mientras que el otro fue utilizado para el análisis de la histo-arquitectura.

El testículo fue fijado en formalina amortiguada (10%, pH 7.0), posteriormente fue deshidratado antes de ser incluido en parafina y seccionado a 5 μ m. Las muestras fueron tratadas con la metodología de Tinción Tricrómica de Masson modificada (Heffess y Mullick, 1995). Brevemente, el tejido fue des-parafinado y rehidratado hasta llegar a agua destilada; posteriormente fue teñido con hematoxilina férrica durante 10 minutos y se lavó con agua corriente durante otros 5 minutos. El tejido fue lavado con agua destilada de dos a tres veces más. Se tiñó con solución de Fucsina ácida- escarlata de Biebrich durante 10 minutos y se lavó con agua destilada por dos ocasiones. Se tiñó durante 4 minutos con los ácidos de Masson (fosfotungstico

acuoso y fosfomolibdico acuoso) y posteriormente con Azul de Anilina por 10 minutos para retirar el exceso de colorante. Se lavó con agua destilada dos veces, y la diferenciación se llevó a cabo con ácido acético al 1% durante 1 minuto. Por último, la muestra fue deshidratada, y montada en un porta objetos con resina sintética.

Las muestras fueron analizadas en microscopio óptico equipado con lentes apoplanacromáticos y cámara digital (Motic, Co.) con el que se capturaron imágenes representativas de cada preparación y se analizaron mediante el programa Motic images plus 2.0. Los parámetros analizados fueron área del túbulo seminífero, área de la luz y la relación que existe entre ellos.

9.3.2 Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total se utilizó el kit RNeasy Microarray Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA) y las muestras fueron mantenidas en hielo. Las muestras utilizadas fueron las fracciones enriquecidas de células de Leydig y Sertoli previamente obtenidas de los diferentes tratamientos.

Las fracciones enriquecidas fueron colocadas en tubos Eppendorff de 1.5 ml y se adicionó 1 ml de reactivo de lisis de Qiazol (Qiagen, Valencia, CA, USA), posteriormente fueron homogenizadas en vortex durante 20 segundos. Las muestras homogenizadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitó en vortex durante 15 segundos para dejarse a temperatura ambiente durante otros 2 o 3 minutos.

Después, se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos a 4 °C (Hettich Mikro200R, Tubingen, Alemania), y al terminar se elevó la temperatura de la centrifuga hasta llegar a 20°C. La fase superior acuosa conteniendo el ARN se transfirió a un nuevo tubo. A este nuevo tubo se le adicionó un volumen equivalente de etanol al 70% (aprox. 600 µl) y se agitó por inversión. De la mezcla obtenida se transfirieron 700 µl a la columna RNeasy mini-espin (Qiagen, Valencia, CA, USA), para filtrar y se centrifugó a 8,000 x g por 15 segundos a temperatura ambiente. Se repitió el paso anterior usando el resto de la muestra. Para lavar la columna, se le adicionaron 700 µl de amortiguador RW1 (Qiagen, Valencia, CA, USA) y se centrifugó durante 15 segundos a 8,000 x g. Posteriormente a la columna se le adicionaron 500 µl de amortiguador RPE (Qiagen, Valencia, CA, USA) y se centrifugó durante 15 segundos a 8,000 x g para lavar la membrana; este último paso se repitió dos veces, sólo que la segunda vez se centrifugó durante 2 minutos. Para secar la columna se centrifugó a 11,000 x g, por 2 minutos y el filtrado se desechó. Para la recolección del ARN, la columna se transfirió a un tubo recolector de 1.5 ml y se le adicionaron 50 µl de agua libre de RNAsas para ser centrifugada durante 1 minuto a 8,000 x g.

La integridad del ARN se determinó mediante el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2%, la concentración y pureza del mismo se determinó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a A_{260} y A_{280} (Lambda2, Perkin-Elmer, México). La concentración del ARN fue determinada utilizando la fórmula:

$$[\text{ARN } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{260}) * (\text{factor de dilución}) * (40)$$

9.3.3 Diseño de oligonucleótidos iniciadores

El diseño de los iniciadores se realizó en línea utilizando el programa Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) tomando las secuencias de los diferentes ARN's depositadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Posteriormente, fueron revisados mediante el uso del programa MFEprimer-2.0 (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/>). Las secuencias de los iniciadores que fueron utilizados, así como sus características (Tm de cada uno de los pares y el tamaño del amplificado que se obtuvo), se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.

Oligonucleótidos iniciadores. Características de los oligonucleótidos utilizados en la obtención del ADN complementario (cADN) y amplificación de los diferentes genes estudiados.

		Secuencia	Tm	Tamaño del amplificado
B-Actina	Forward	CCACCATGTACCCAGGCATT	60.6	253 pb
	Reverse	AGGGTGTAACGCAGCTCA	60.5	
Cyp19A1	Forward	TGGATGGGGATTGGAAGTGC	60.6	367 pb
	Reverse	TCAACACATCCACGTAGCCC	60.6	
ERα	Forward	AATGCAAGAACGTTGTGCC	60.5	181 pb
	Reverse	TCTGCTTCCGGGGTATGTA	60.6	
ERβ	Forward	AATGTGCTAGTGAGCCGTCC	60.7	265 pb
	Reverse	CCTCATCCCTGTCCAGAACG	60.4	

9.3.4 Retro-transcripción del ARN

De acuerdo a la concentración de ARN obtenida en cada una de las muestras, se determinó el volumen necesario para tomar 1.0 µg para utilizarlo en la retro-transcripción.

La reacción de retro-transcripción se realizó con el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Glen Burnie, MD, USA). En una reacción con 2 µl de MgCl₂, 1.0 µl de amortiguador de retro-transcripción 5X, 4 µl de 5 mM dNTP's, 0.5 µl de Inhibidor de RNAsa y 0.5 µl de Enzima Mo-MuLV RT. Posteriormente, fue colocada en un tubo de reacción con 0.5 µl de oligonucleótidos y 1.0 µl de ARN.. La reacción fue incubada en un termociclador Techne TC-512 (Techne, Grands Rapids, MI, USA) a 42°C por una hora y posteriormente a 90°C por diez minutos para ser llevada finalmente a 4°C por una hora.

9.3.5 Amplificación por PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el cADN obtenido a partir de la reacción anterior de cada una de las muestras. Para la PCR se utilizó una mezcla de todos los componentes en un tubo de PCR a un volumen final de 50 µl como se indica en la tabla 4.

Tabla 4.

Componentes de la PRC. Concentraciones iniciales de los reactivos y concentraciones finales a la hora de realizarse, así como las cantidades necesarias para 50 μ l de reacción.

	Concentración inicial de los reactivos	Concentración final para la reacción	Cantidad por tubo de reacción (50μl)
dNTP's	8 mM	0.2 mM	1.25 μ l
Magnesio	25 mM	1.5 mM	3 μ l
Oligo Forward	10 μ M	1.0 μ M	5 μ l
Oligo reverse	10 μ M	1.0 μ M	5 μ l
Tag polimerasa	5 U/ μ l	1 U	0.2 μ l
Buffer de reacción	10 X	1 X	5 μ l
Agua			20.55 μ l
ADNc	0.1 μ g/ μ l	0.02 μ g/ μ l	10 μ l

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación, para esto las muestras fueron colocadas en el termociclador Techne TC-512 (Techne, Grand Rapids, MI, USA) con el siguiente programa:

	Temperatura en $^{\circ}$C	Tiempo	Numero de ciclos
Des. inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	
Alineamiento	60.5	30 seg	35
Elongación	72	30 seg	
Elongación final	72	5 min	1

Al terminar la amplificación, los fragmentos de ADN amplificados se corrieron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio. Como alternativa, la reacción de amplificación puede almacenarse a 4⁰C por 16 horas o a -20⁰C hasta que se decida correr.

9.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de estadística NCSS 2007, mediante la prueba de Kruskal-Wallis, las diferencias significativas se estimaron con una $p < 0.05$ tomando como referencia el grupo control. Los resultados de variables continuas se analizaron mediante pruebas de t de Student en donde el nivel de significancia utilizado fue $p < 0.05$.

10 RESULTADOS

10.1 Peso corporal

Los ratones presentaron un aumento en el peso corporal con respecto al peso inicial del tratamiento en todos los grupos, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, en comparación con los ratones control (figura 3). Este aumento en el peso es consistente con el crecimiento de esta cepa.

Registro de peso

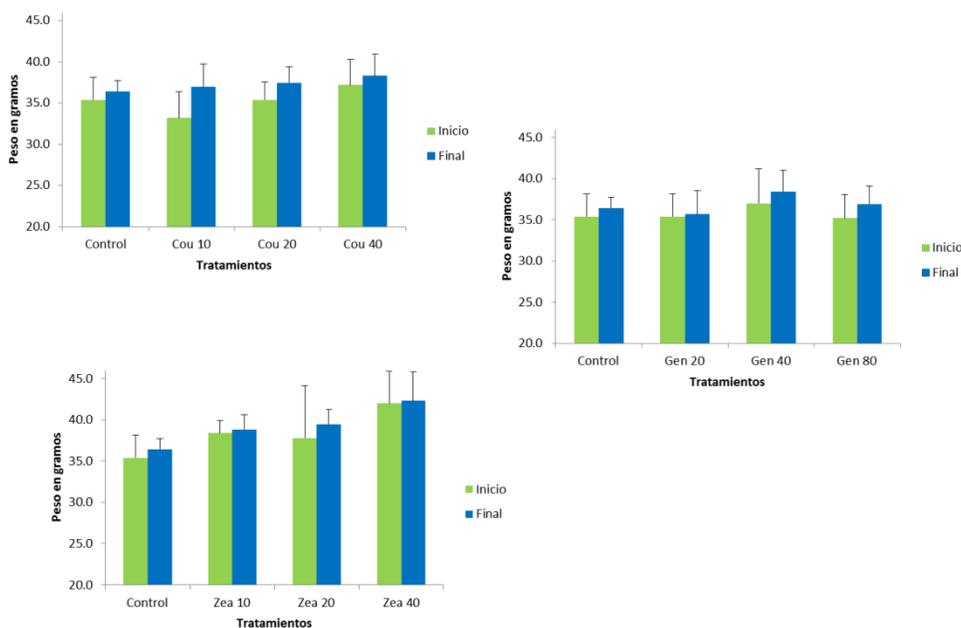


Figura 3. Registro del peso al Inicio y final del tratamiento. En color verde se representa el peso promedio de los diferentes grupos al inicio del tratamiento. En color azul se representa el peso antes de ser sacrificados. No existen diferencias significativas en el aumento de peso debido al consumo durante 28 días de fitoestrógenos en comparación con el grupo control ($P < 0.05$).

10.2 Relación peso testicular /peso corporal

Después de realizar la disección se pesaron los testículos, ya que algunos autores han reportado que el consumo de fitoestrógenos genera alteraciones en el tamaño testicular. Para poder evaluar las variaciones en el peso testicular sin la intervención del desarrollo del animal en los diferentes grupos, se calculó la relación peso testicular/peso corporal (PT/PC esto de manera individual). Se observó que todos los

animales del estudio presentaron un testículo con mayor tamaño que el otro (figura 6). Sin embargo, al realizar las comparaciones entre los diferentes grupos, no se obtuvieron diferencias significativas entre el tamaño de los diferentes tratamientos en comparación con el grupo control. La comparación se realizó entre los testículos derechos e izquierdos (figura 4).

Tamaño testicular

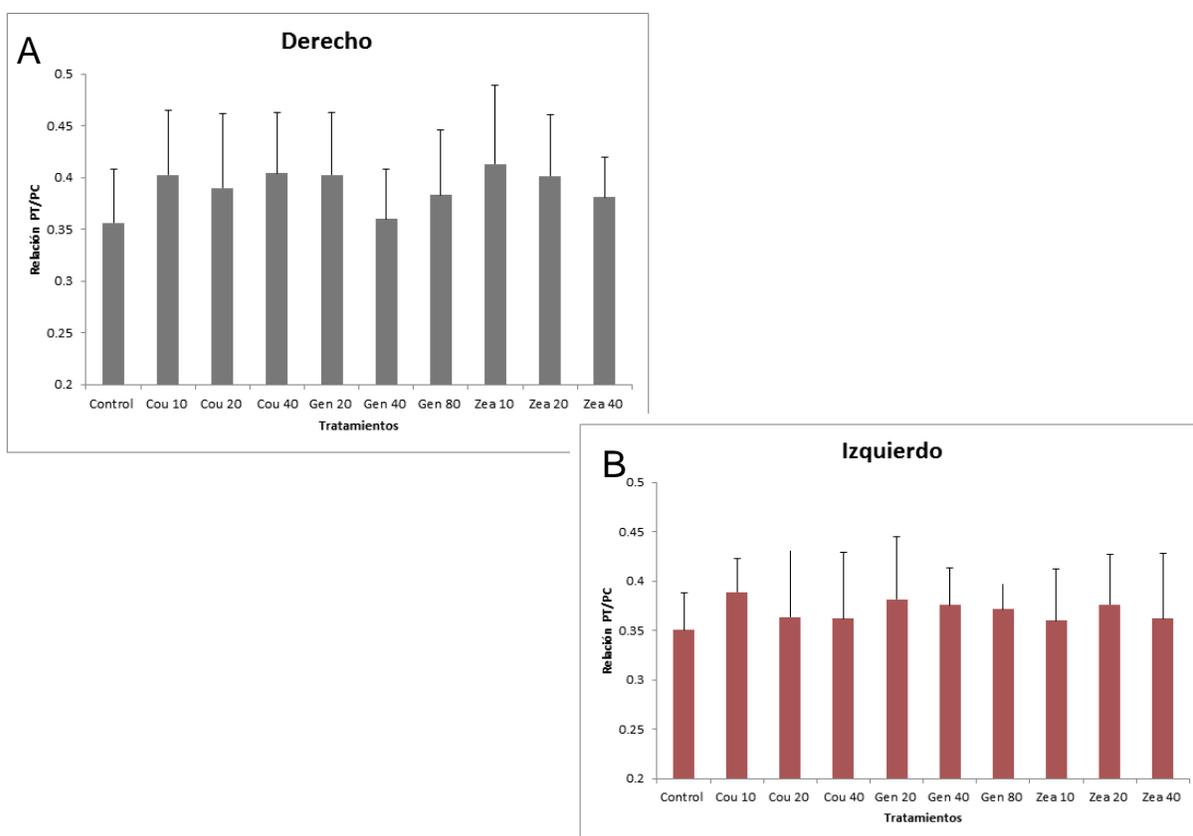


Figura 4. Tamaño testicular en los diferentes tratamientos. Después de ser sacrificados los ratones se pesaron sus testículos. A) Se representa la relación peso testicular/peso corporal promedio del testículo derecho. B) Se representa la relación peso testicular/peso corporal promedio del testículo izquierdo. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en comparación con el control ($P < 0.05$).

Al comparar las variaciones de esta relación (PT/PC) utilizando la suma de ambos testículos para los diferentes grupos y el control, no se observaron diferencias significativas entre la relación PT/PC el grupo control y los diferentes fitoestrógenos probados con las diferentes dosis (figura 5).

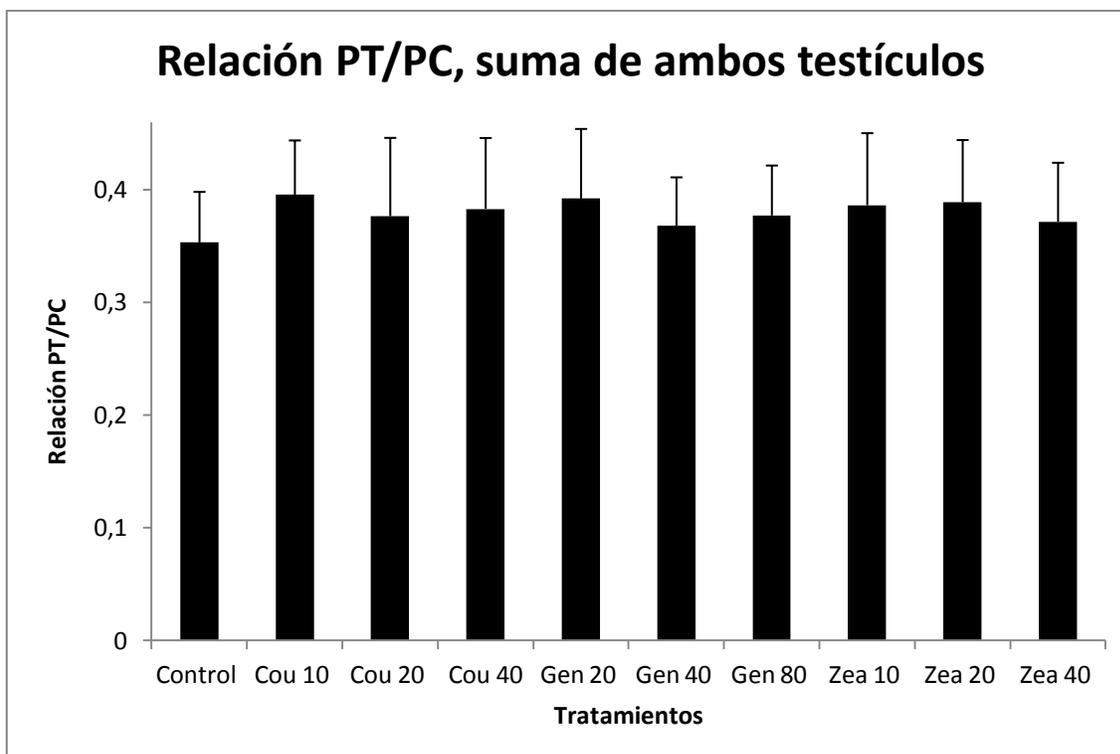


Figura 5. Relación PT/PC de ambos testículos. En la gráfica se observa la relación PC/PT existente entre los diferentes tratamientos y las diferentes dosis sumando los valores de los dos testículos. No existen diferencias significativas de los diferentes tratamientos con respecto al control ($P>0.05$).

También se observó que el testículo derecho de manera general presenta una mayor relación PT/PC que el izquierdo (figura 6), excepto en el grupo Gen 20 en donde el testículo izquierdo es más pesado que el derecho. Esta diferencia en el peso de los

testículos no es significativa en comparación con el grupo control, Este fenómeno se presentó en todos los tratamientos y es un fenómeno muy común en un gran número de mamíferos.

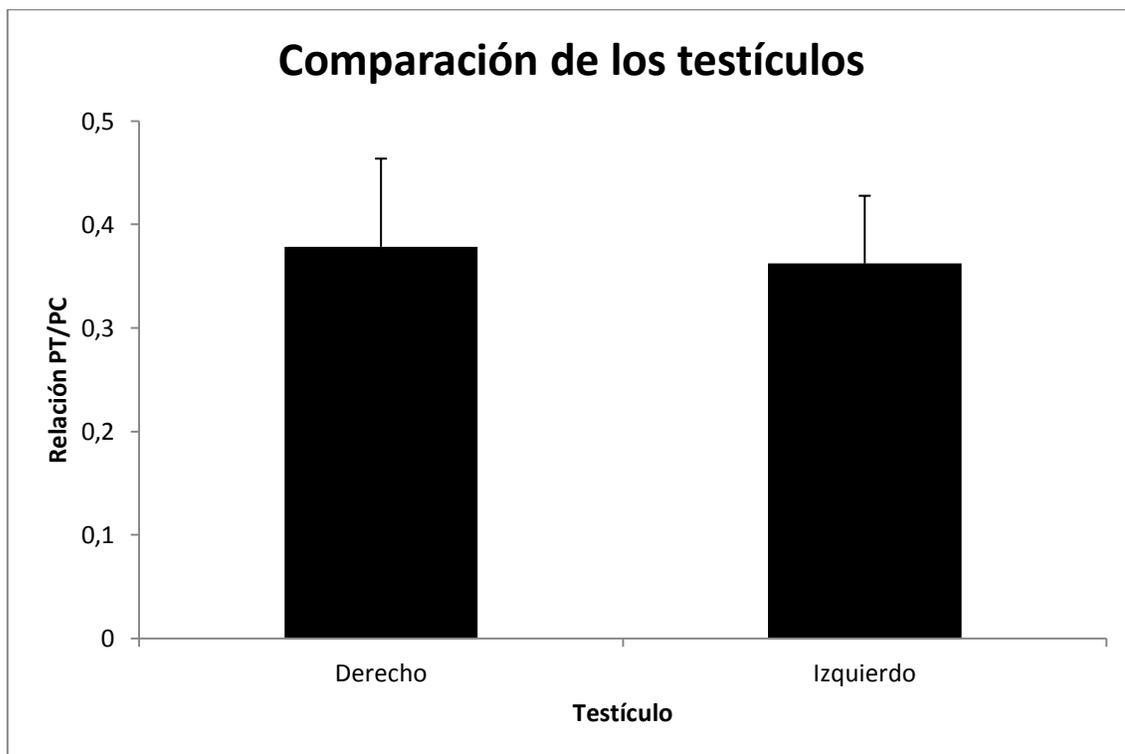


Figura 6. Comparación de la relación PT/PC testículo derecho e izquierdo. Se realizó la comparación de las relaciones entre testículo derecho e izquierdo, se encontró que el testículo derecho presenta un mayor peso en comparación con el izquierdo, aunque esta diferencia en el peso no es significativa ($P < 0.05$). Este fenómeno se presentó en todos los tratamientos a acepción de Gen 20 en donde el izquierdo es más pesado el testículo izquierdo que el derecho.

10.3 Histo-arquitectura testicular

Como se describió en materiales y métodos, uno de los testículos fue utilizado en el estudio histológico. El tratamiento con coumestrol a las diferentes dosis induce alteraciones en la histo-arquitectura de los túbulos ($P < 0.05$) a excepción del tratamiento Cou 10 en donde no se observan variaciones significativas tanto en el perímetro como en el área que ocupan los túbulos seminíferos (figura 7 y figura 10). Los tratamientos con genistéina (figura 8 y figura 10) y zearalonona (figura 9 y figura 10) inducen variaciones en el tamaño y área ocupada por los túbulos seminíferos ($P < 0.5$) con la excepción de los tratamientos con Gen 40 y Zea 20 respectivamente en donde no hay alteraciones en el área. Sin embargo, el área cubierta por los espacios intersticiales es mayor en los testículos de los grupos tratados con genistéina y zearalonona.

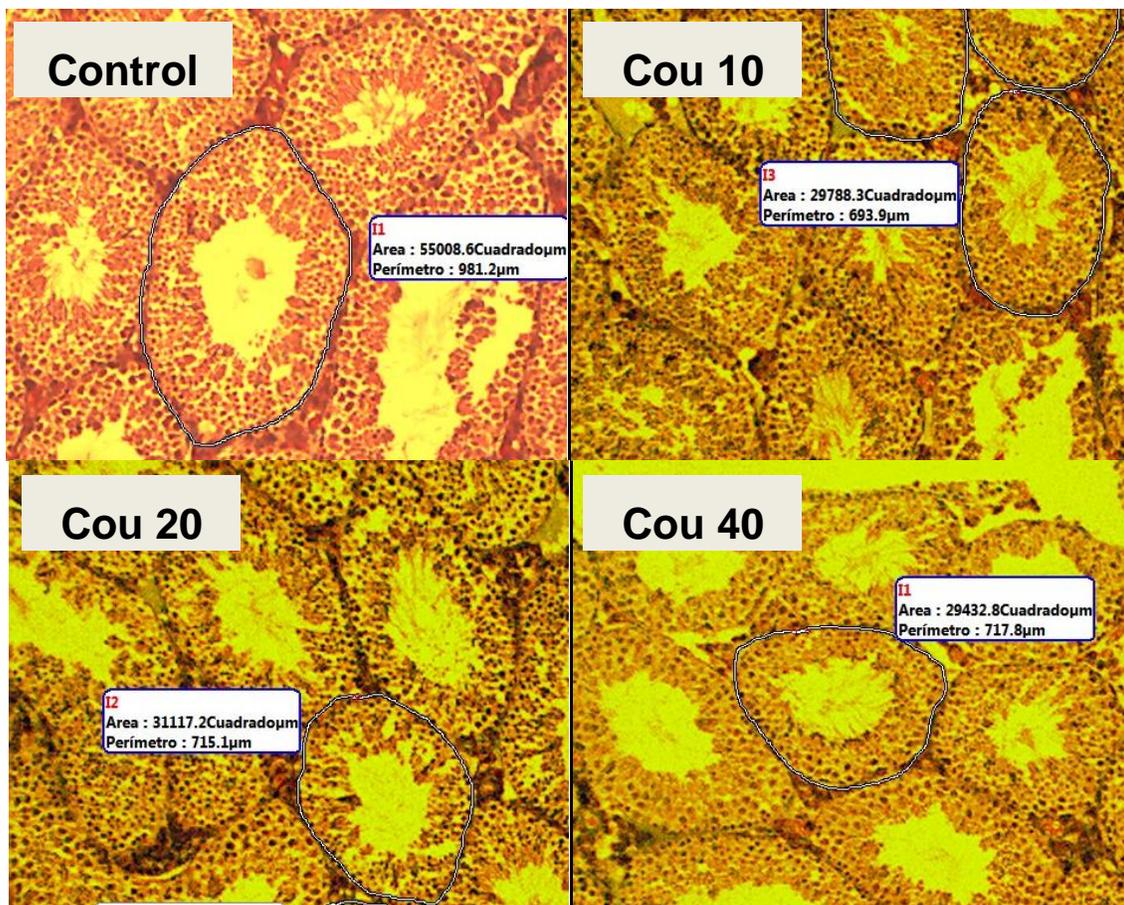


Figura 7. Fotomicrografía representativa del área de los túbulos seminíferos tratamiento con coumestrol. Un testículo de cada animal tratado con las diferentes dosis de coumestrol se procesó para hacer el estudio histológico como se indica en materiales y métodos. Se muestran los parámetros evaluados. Tinción Tricrómica de Mason (40X).

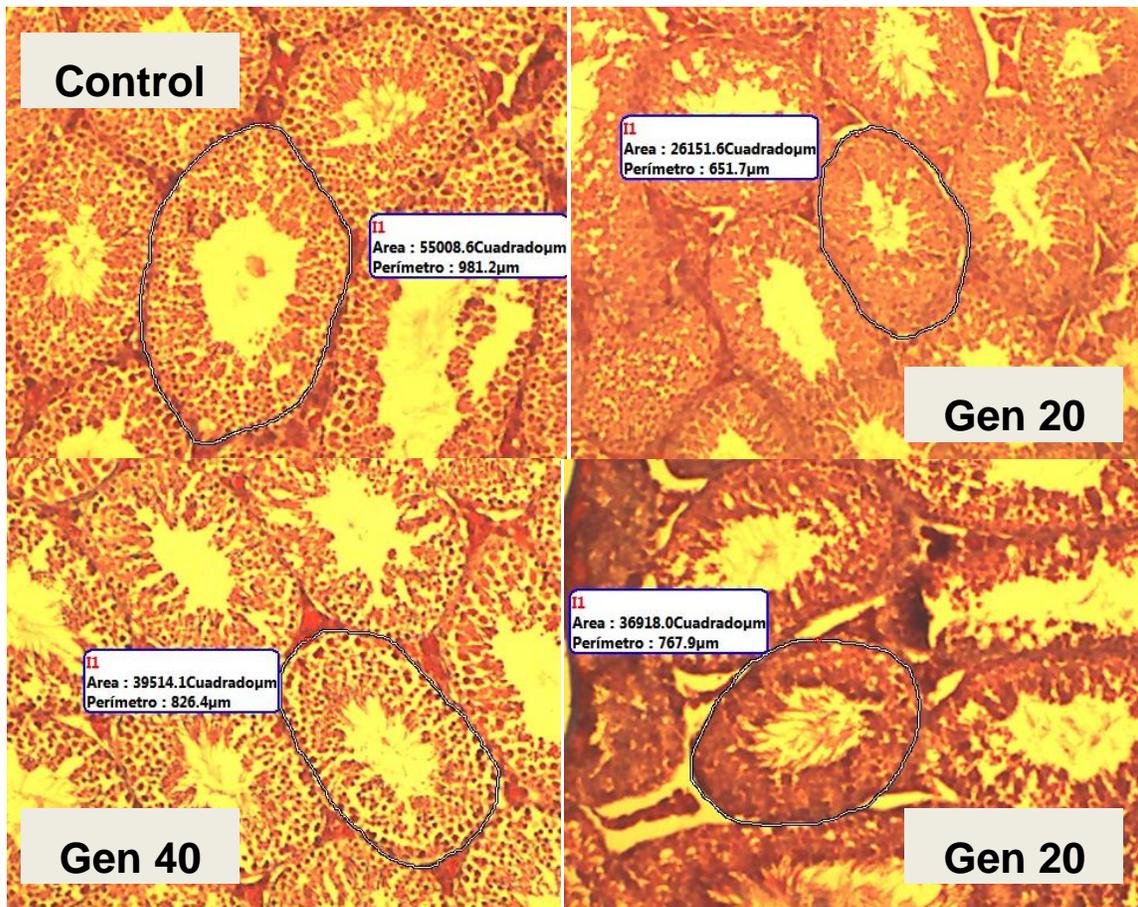


Figura 8. Fotomicrografía representativa del área de los túbulos seminíferos **tratamiento con genisteína**. Un testículo de cada animal tratado con las diferentes dosis de genisteína se procesó para hacer el estudio histológico como se indica en materiales y métodos. Se muestran los parámetros evaluados. Tinción Tricrómica de Mason (40X).

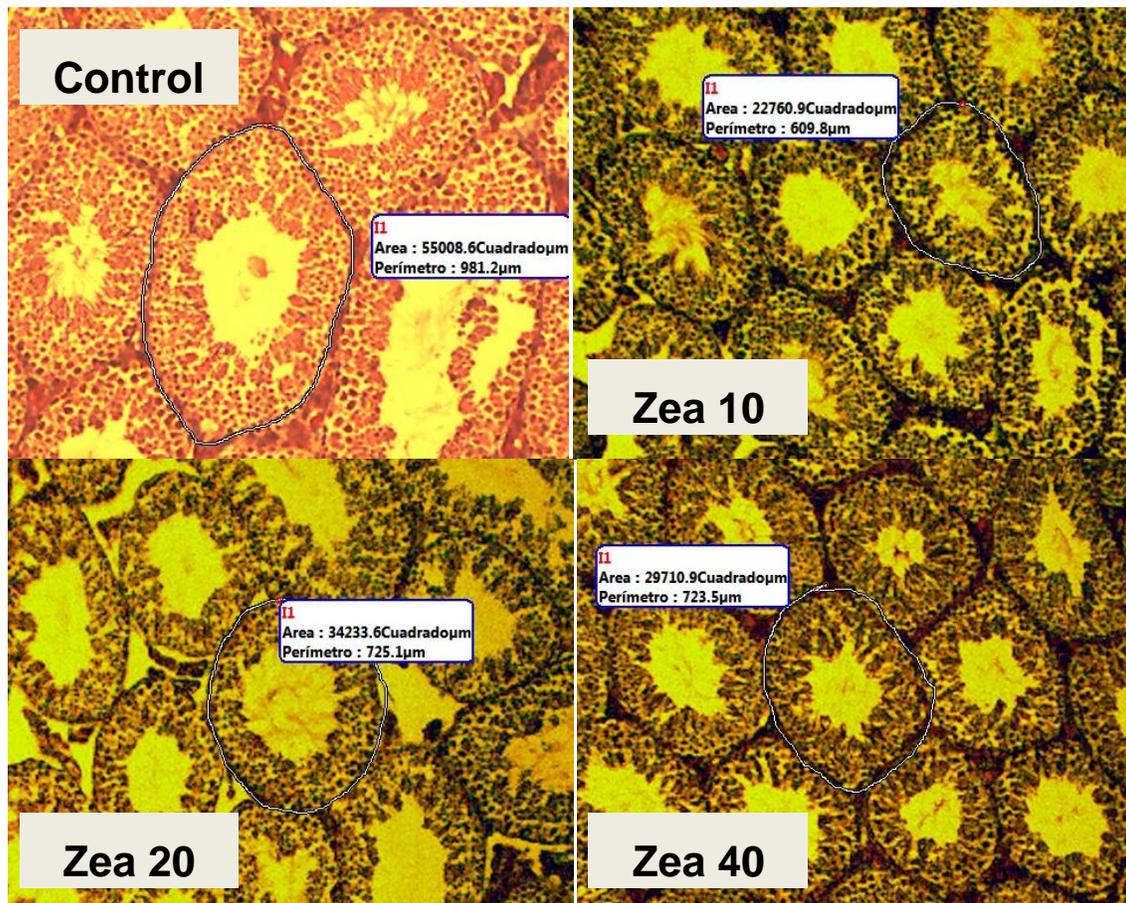


Figura 9. Fotomicrografía representativa del área de los túbulos seminíferos tratamiento con zearalonona. Un testículo de cada animal tratado con las diferentes dosis de zearalonona se procesó para hacer el estudio histológico como se indica en materiales y métodos. Se muestran los parámetros evaluados. Tinción Tricrómica de Mason (40X).

Al hacer la comparación de las alteraciones en la hito-arquitectura de lo túbulos, los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el área de los túbulos seminíferos, con excepción de los grupos tratados con 10 μ g/kg de coumestrol, 40 μ g/kg de genisteína y 20 μ g/kg de zearalonona (figura 10).

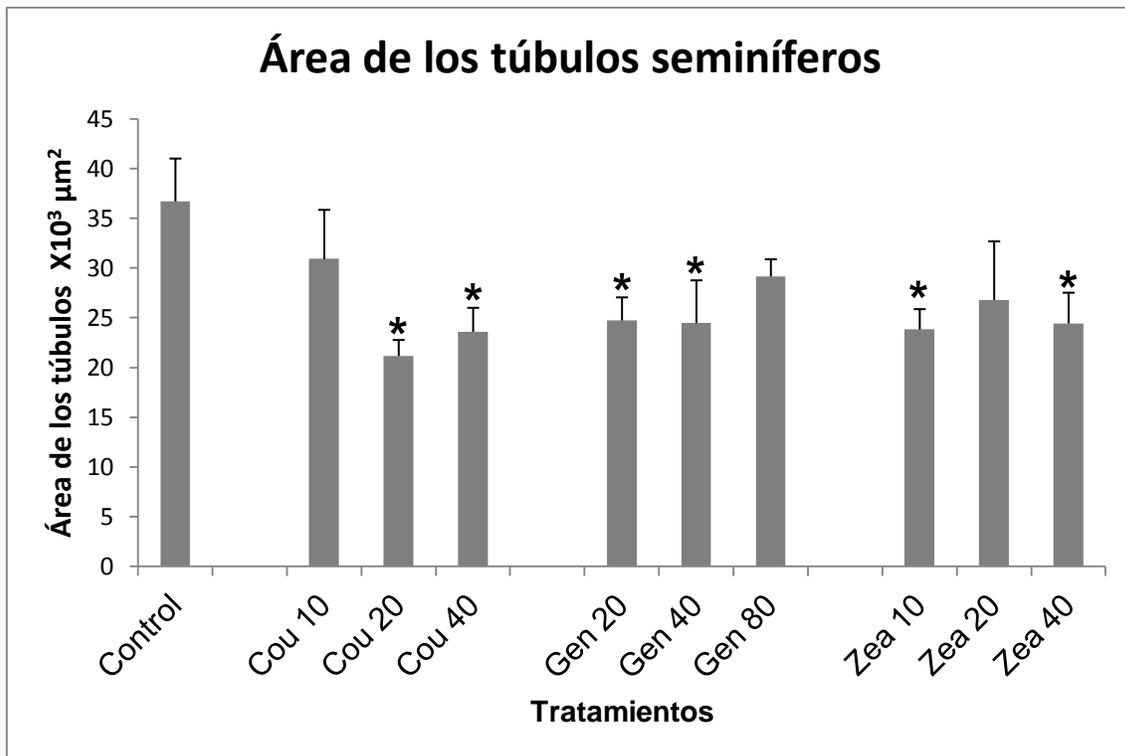
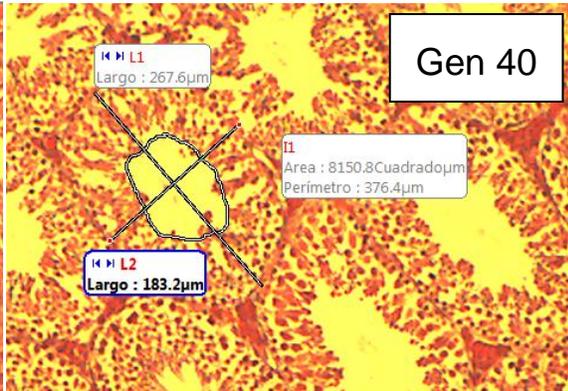
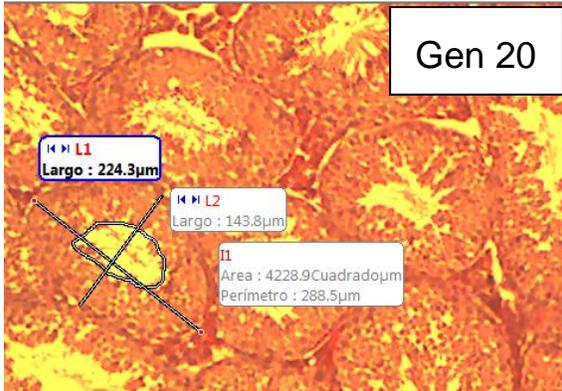
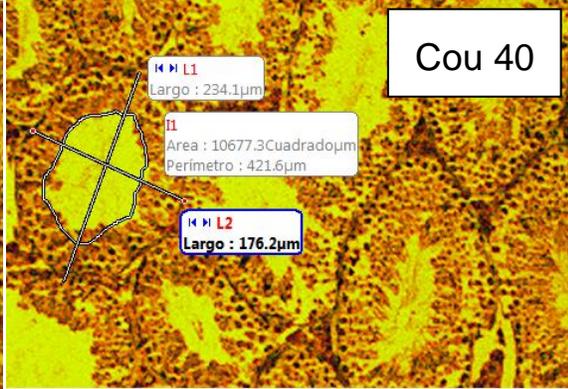
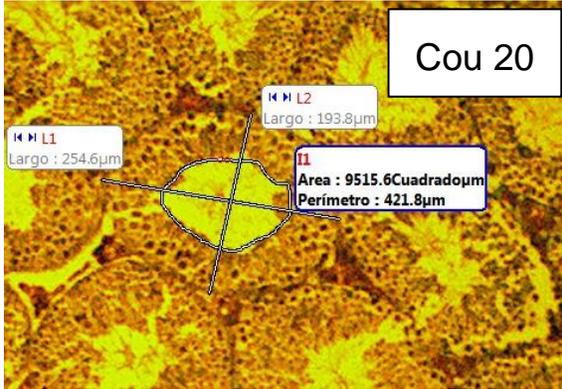
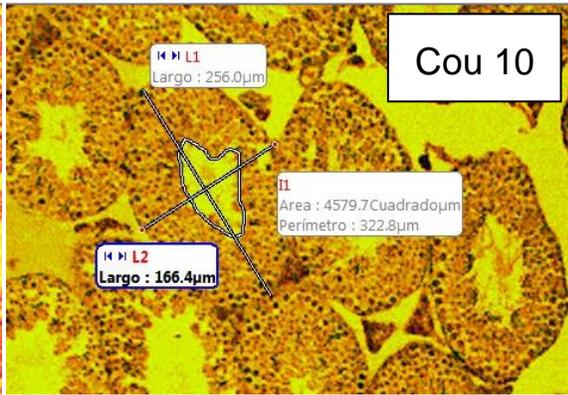
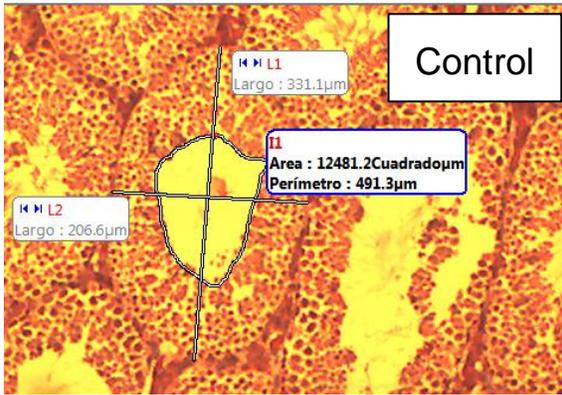


Figura 10. Evaluación del área de los túbulos seminíferos. Utilizando las imágenes digitalizadas de las preparaciones histológicas se determinó el área ocupada por los túbulos seminíferos. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a la determinación del grupo tratado con DMSO (control).



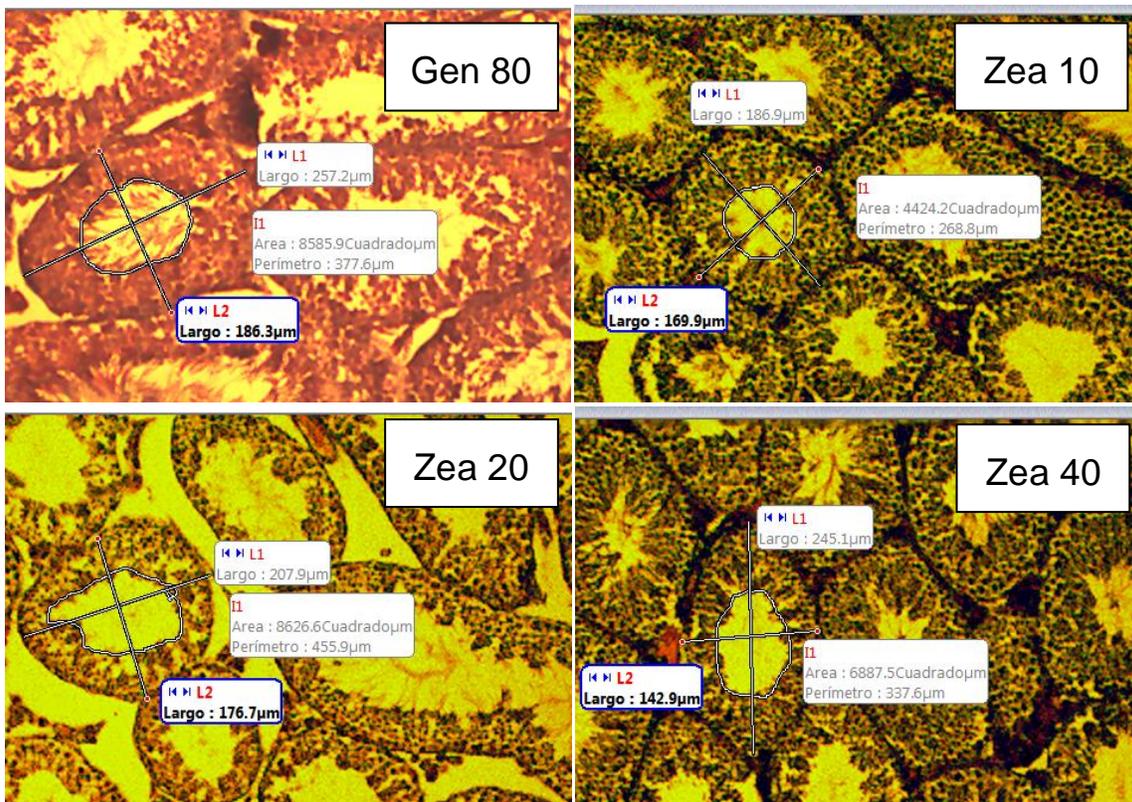


Figura 11. Morfometría de los túbulos seminíferos. Las imágenes digitalizadas de las preparaciones histológicas se utilizaron para evaluar el área ocupada por el epitelio germinal y las células de Sertoli tomando como indicador el área ocupada por ellas. Tinción Tricrómica de Mason (40X).

La evaluación del área ocupada por el epitelio germinal y las células de Sertoli en los diferentes tratamientos (figura 11) muestra que el tratamiento con los fitoestrógenos induce una disminución en el grosor del componente celular del túbulo seminífero.

Al comparar este parámetro entre los diferentes grupos y el control, el componente alterado principalmente es el eje longitudinal de los túbulos (figura 12), se puede observar que los túbulos seminíferos tienden a perder su forma elíptica y adquieren una conformación más redondeada. Mientras que el área ocupada por el

componente celular también muestra una disminución significativa en todos los tratamientos, exceptuando la menor concentración de coumestrol y la mayor de genisteína (figura 13).

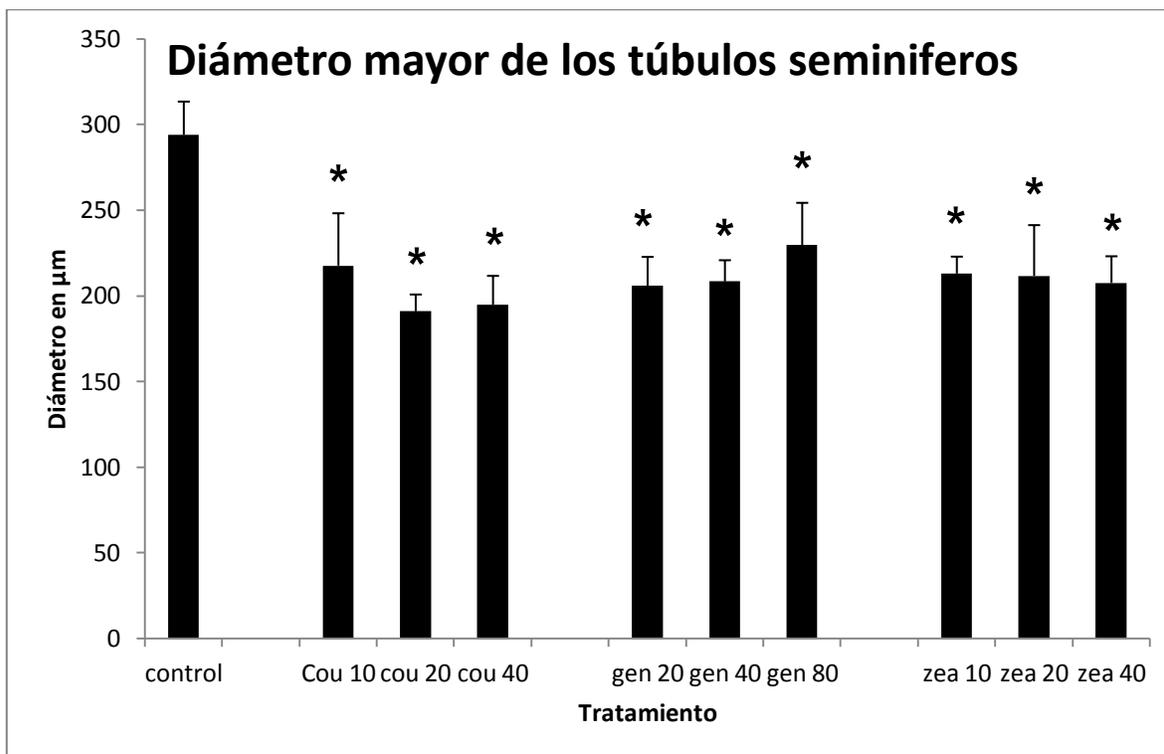


Figura 12. Evaluación del diámetro mayor de los túbulos seminíferos. Utilizando las imágenes digitalizadas de las preparaciones histológicas se determinó el diámetro mayor de los túbulos seminíferos. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a la determinación del grupo tratado con DMSO (control).

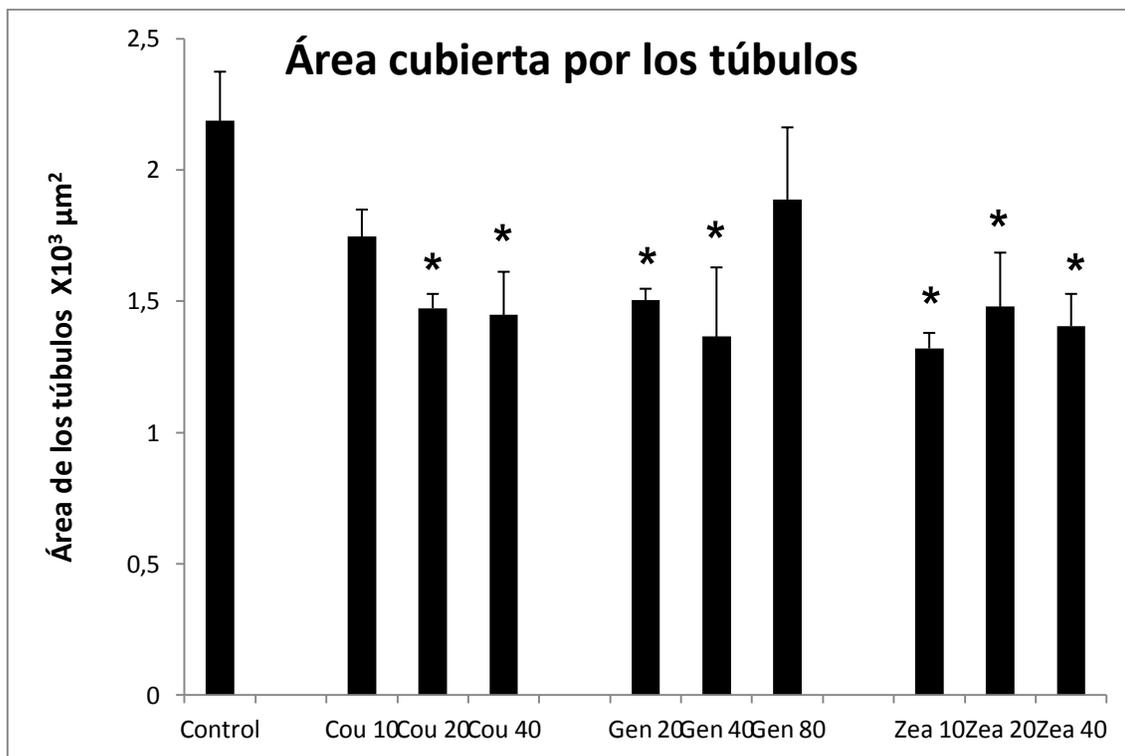


Figura 13. Área cubierta por el componente celular de los túbulos seminíferos de ratones tratados con fitoestrógenos. A partir de las imágenes digitalizadas de las preparaciones histológicas, se evaluó el área ocupada por las células de Sertoli y de la estirpe germinal en los túbulos de los animales tratados y control, en algunos grupos se encontraron diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$).

10.4 Obtención de fracciones enriquecidas

La obtención de las fracciones enriquecidas se realizó mediante las metodologías descritas previamente. Las muestras de células de Leydig fueron observadas al microscopio para su identificación. Se observaron células con estructura piramidal y/o agregados piramidales y redondos (figura 14).

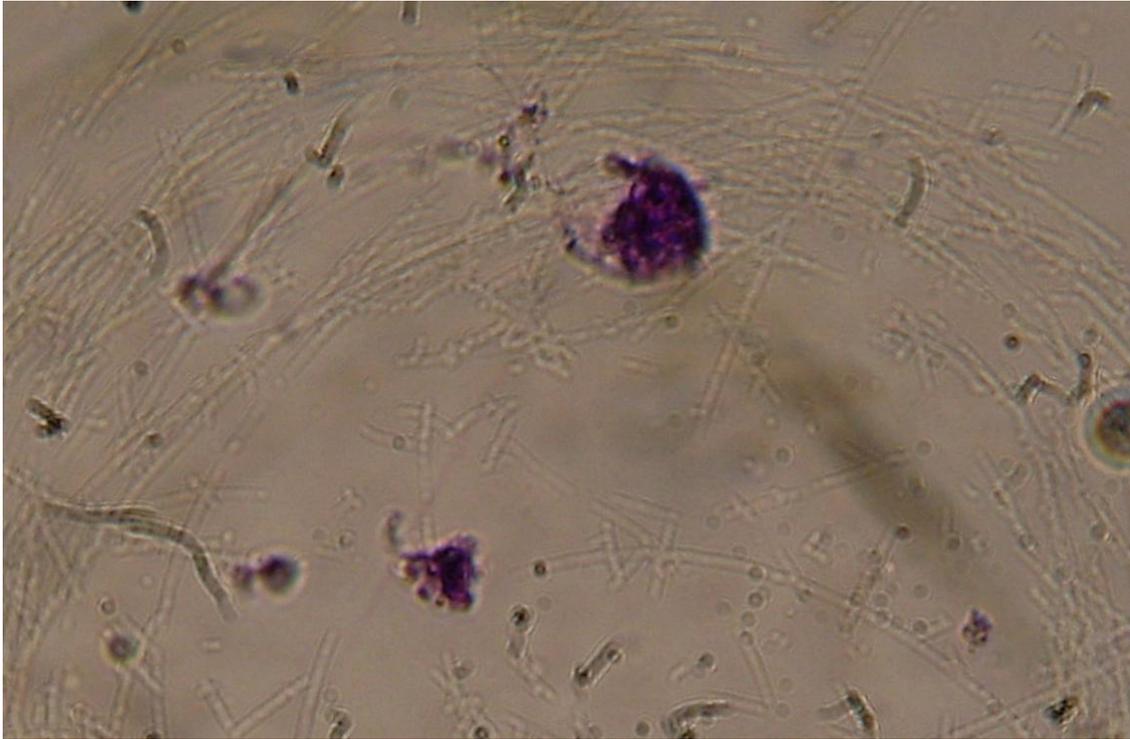


Figura 14. Fracciones enriquecidas en células de Leydig. Se observan células piramidales y grupos de células formando agregados. Se pueden identificar algunas células sanguíneas. Tinción de azul de toluidina (40X).

Con respecto a las fracciones enriquecidas de células de Sertoli al ser observadas al microscopio, presentan agregados con más células aún después de haber sido tratadas con pancreatina y un gradiente de sacarosa. Estas células agregadas a las células de Sertoli corresponden en su mayoría a células germinales (figura 15).

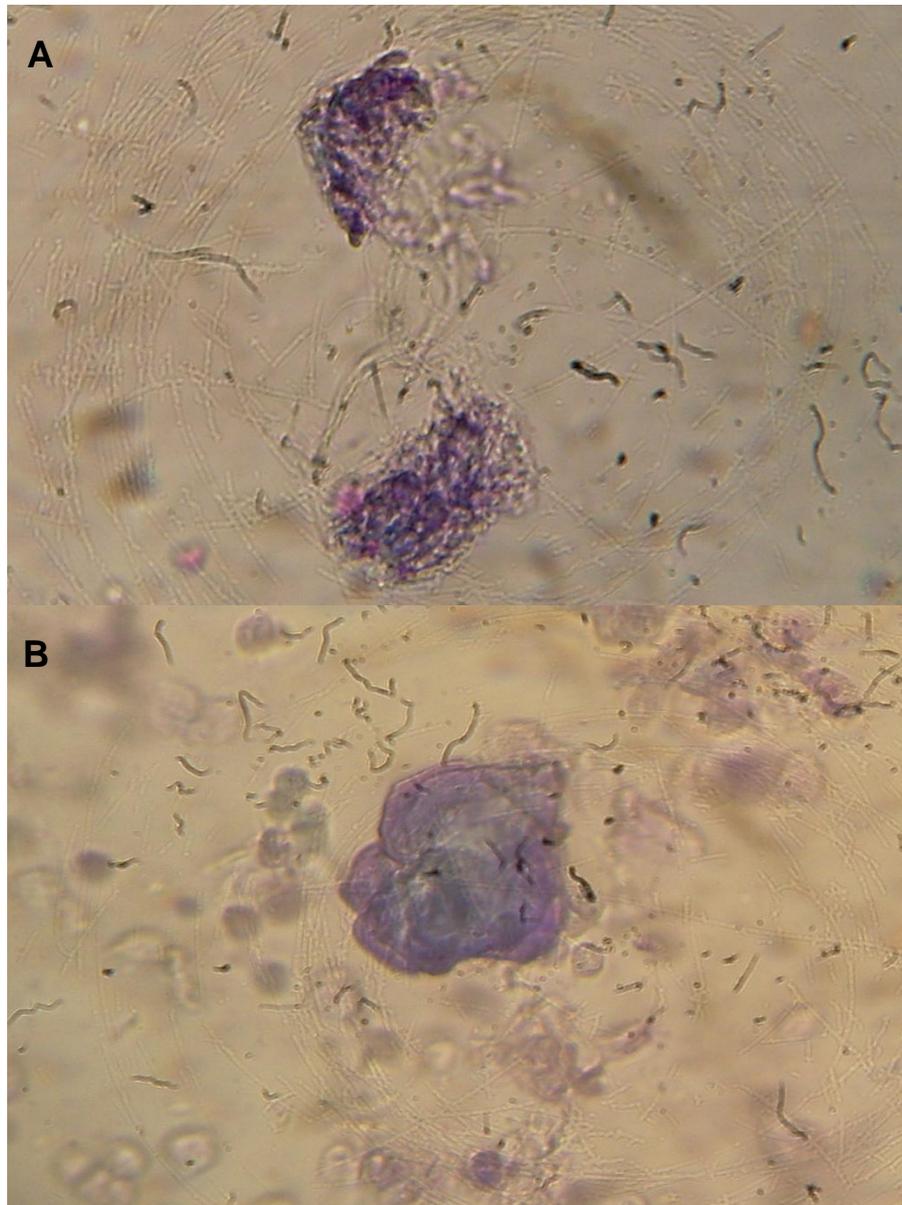


Figura 15. Fracciones enriquecidas en células de Sertoli. A) Las células de Sertoli son células muy grandes y presentan una estructura amorfa. B)Se puede observar que las células de Sertoli se encuentran asociadas a otros tipos celulares principalmente espermátides redondas. Tinción con azul de toluidina (40X).

10.5 Extracción de ARN y retro-transcripción

La extracción de ARN total se realizó a partir de las fracciones enriquecidas de células de Leydig y Sertoli de las diferentes muestras. La pureza del ARN extraído se evaluó con el coeficiente de absorción 260nm/280nm (figura 16). Los resultados que se obtuvieron fueron valores promedio de 1.2 para las células de Leydig y Sertoli, esto indica que se obtuvo un grado de pureza bajo.

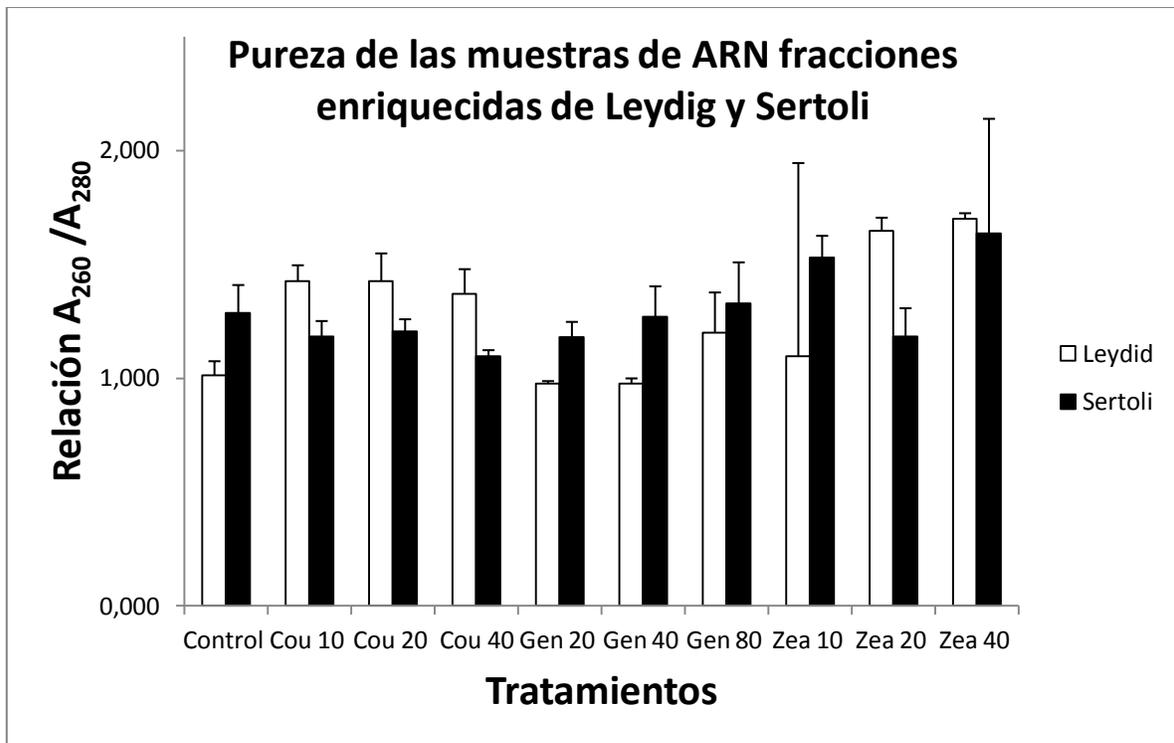


Figura 16. Pureza del ARN. La mayoría de las muestras se mantuvieron con una pureza de 1.2, algunos grupos como Zea 10, y 40 para las células de Sertoli y Zea 20 para células de Leydig presentaron un índice de pureza de superiores a 1.6.

Posteriormente, al calcular la cantidad de ARN obtenido como se describe en la metodología se observó lo siguiente. En las concentraciones obtenidas para las células de Leydig se puede apreciar que los tratamientos con genisteína tuvieron la menor concentración, mientras que los tratamientos con zearalona fueron los que presentaron la mayor concentración de ARN. Para el caso de las células de Sertoli se presentó una mayor variación. El grupo Zea 20 y Zea 40 fueron los más alto y bajo respectivamente en cuanto a la cantidad de ARN obtenido (Tabla 5).

Tabla 5

Características de ARN total obtenido de fracciones enriquecidas. La cuantificación se realizó utilizando el método de absorción en ultravioleta (A260). Se muestra el promedio y desviación estándar obtenido de las 5 repeticiones biológicas realizadas.

Grupo	µg de ARN en células de Leydig	µg de ARN en células de Sertoli
Control	192,000 ± 69,05	134,400 ±80,33
Cou 10	46,4 ± 18,24	62,4 ±13,15
Cou 20	57,6 ±12,83	70,4 ±13,45
Cou 40	73,6 ±38,22	74,4 ±13,45
Gen 20	230,400 ±24,59	103,200 ±59,83
Gen 40	260,800 ±80,11	84,800 ±57,30
Gen 80	121,600 ±93,49	76,000 ±21,73
Zea 10	290,400 ±131,83	61,760 ±6,43
Zea 20	455,200 ±107,42	278,400 ±340,07
Zea 40	297,600 ±92,84	22,400 ±6,07

Para llevar a cabo la retro-transcripción se utilizaron 2 µg de ARN total de las diferentes muestras.

10.6 Amplificación por PCR y densitometría

El análisis de PCR semi-cuantitativa se llevó a cabo para los ARNm de los genes Cyp19A1, ER α y ER β . Para el análisis comparativo de expresión relativa se utilizó como control a β -actina en todas las muestras (figura 17).

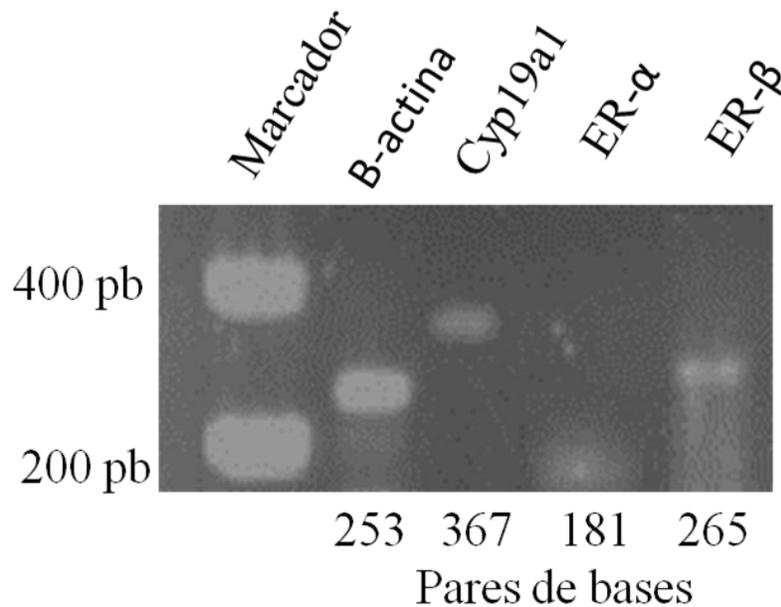


Figura 17. Amplificación de los diferentes genes estudiados. El ADNc se amplificó como se describe en materiales y métodos. Amplificados independientes se corrieron en un solo gel para efectos demostrativos.

Con los datos de la expresión de los transcritos (Cyp19A1, ER α , ER β y β -actina) obtenidos de las células de Leydig y Sertoli de todos los tratamientos se realizaron los análisis densitométricos para poder obtener el valor de intensidad de cada banda. (Tabla 6 y 7).

Tabla 6.

Densitometría de amplificones obtenidos para células de Leydig. Los valores corresponden a los datos obtenidos del análisis de densitometría de las amplificaciones de los RNAm obtenido de fracciones de células de Leydig de los diferentes tratamientos.

Leydig	β-actina	Cyp 19A1	ER-α	ER-β
Control	223,51	110,34	100,32	123,31
Cou 10	244,92	115,78	200,16	119,89
Cou 20	245,53	126,24	124,6	124,7
Cou 40	240,09	120,34	40,15	136,8
Gen 20	244,7	117,89	124,3	115,7
Gen 20	226,45	114,9	196,49	135,6
Gen 40	239,44	128,87	123,54	121,85
Zea 10	250,63	120,21	116,9	117,97
Zea 20	228,11	115,65	114,8	125,74
Zea 40	252,59	109,54	128,9	120,81

Tabla 7.

Densitometría de amplificones obtenidos para células de Sertoli. Los valores corresponden a los datos obtenidos del análisis de densitometría de las células de Sertoli de los diferentes tratamientos.

Sertoli	β-actina	Cyp 19A1	ER-α	ER-β
Control	219,69	120,4	115,79	125,65
Cou 10	247,1	191,78	188,27	188,23
Cou 20	230,08	115,7	117,78	119,87
Cou 40	240,62	185,6	114,8	120,87
Gen 20	221,46	125,6	121,01	115,51
Gen 20	226,64	119,64	115,79	114,98
Gen 40	217,94	117,18	112,43	112,59
Zea 10	243,59	119,43	245,78	115,79
Zea 20	251,84	112,65	120,19	118,5
Zea 40	243,75	116,8	218,27	118,93

10.7 Expresión relativa

Las gráficas correspondientes a la expresión relativa de Cyp19A1, ER α y Er β se realizaron con los valores densitométricos y utilizando el valor de β -actina como referencia (gen problema/ b-actina). Los valores de expresión relativa del control fueron igualados a cero, por lo que la expresión de los genes de estudio se representa como aumento o disminución en la expresión relativa de cada uno de los grupos con respecto al control. En las gráficas se comparan la expresión relativa de los diferentes genes a las diferentes concentraciones de cada uno de los fitoestrógenos empleados.

El efecto del tratamiento de los diferentes fitoestrógenos sobre las células testiculares es variado (figura 18-23). Mientras que el coumestrol induce una disminución en la cantidad de transcritos para ER α en la fracción enriquecida de células de Leydig de manera proporcional a la concentración (fig 18), el efecto de la genisteína y zearalonona es solo marginal en este gene y tipo celular. En las fracciones enriquecidas en células de Sertoli, el incremento en la expresión relativa de ER α es mayor en los tratamientos con zearalonona, esto en los grupos Zea 10 y 40 (figura 23) y, a pesar de que hay cierto aumento cuando se trata con coumestrol (figura 19), la variación es menos dramática si se compara con el mismo fitoestrógeno. Sin embargo, en las fracciones de células de Sertoli, el tratamiento con coumestrol induce una disminución en la expresión relativa de Cyp19A1 en los grupos Cou 10 y Cou 40 (figura 19) en la misma fracción, la zearalonona induce un

aumento marginal en la cantidad de transcritos para Cyp19A1 (figura 23). Para el caso de los Er β en esta fracción se observa un aumento en la expresión en el tratamiento Cou 10 (figura 19) y una disminución de este gen en los tratamientos con zealalonona (figura 23). En los tratamientos con genisteína no se observan cambios en la expresión de las fracciones enriquecidas de células de Leydig ni de Sertoli de ninguno de los tres genes (figura 20 y 21).

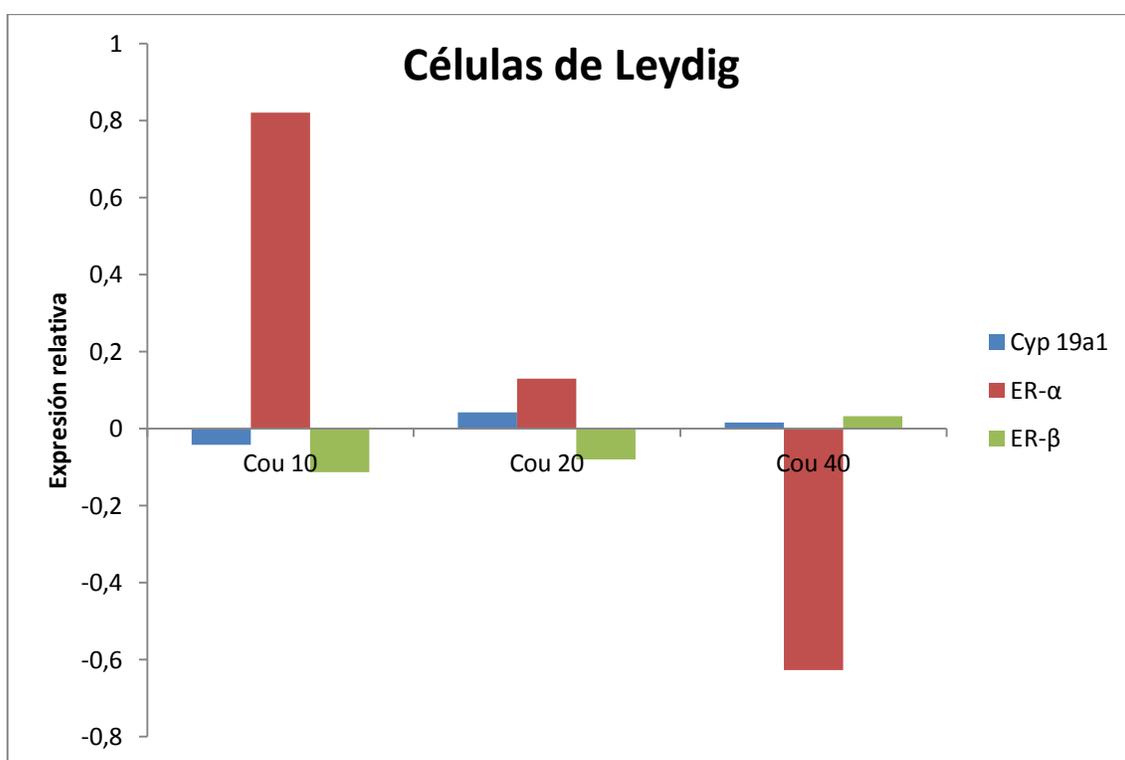


Figura 18. Expresión relativa de genes en las células de Leydig provenientes de ratones tratados con diferentes concentraciones de coumestrol. Se tomó como expresión base la que presenta la β actina (nivel estandarizado=0). El ARNm fue primeramente utilizado para sintetizar el ADNc y posteriormente amplificado. Los amplificones se midieron densitométricamente y la variación respecto al control se muestra.

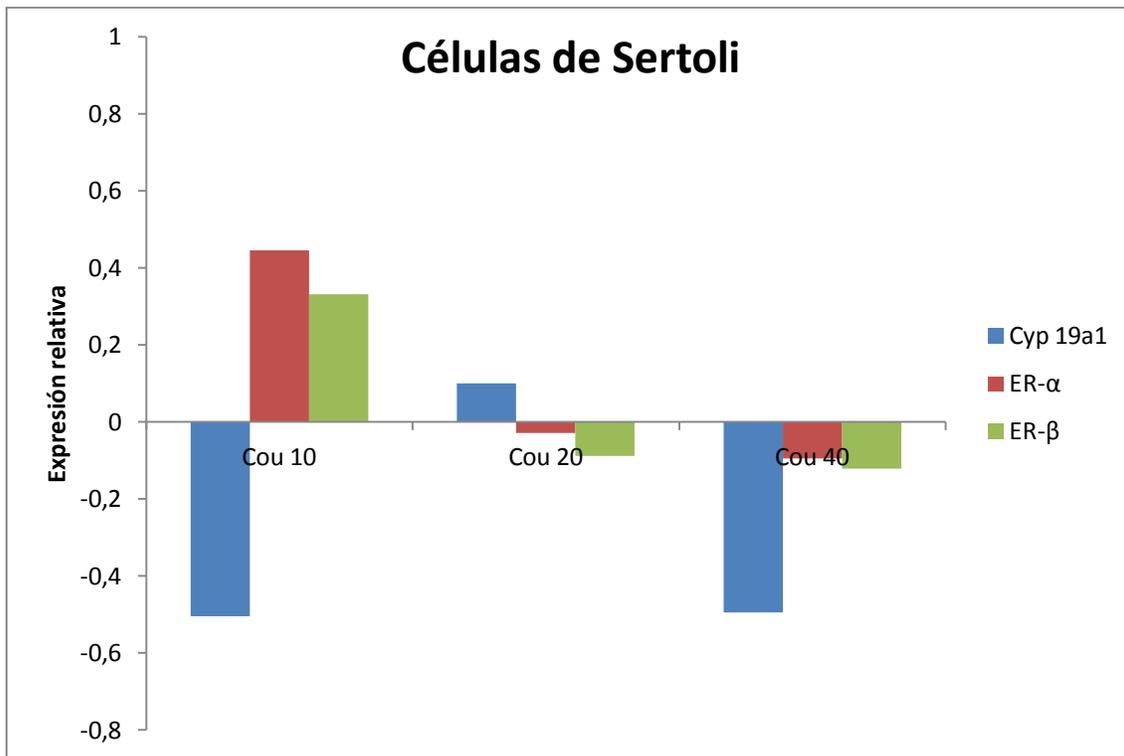


Figura 19. Expresión relativa de genes en las células de Sertoli provenientes de ratones tratados con diferentes concentraciones de coumestrol. El ARN aislado de fracciones enriquecidas en células de Sertoli de animales tratados con diferentes dosis se retrotranscribió a ADNc y amplificó como se señala en Material y Métodos. Se muestra las variaciones respecto a la expresión del gen endógeno (β actina=0).

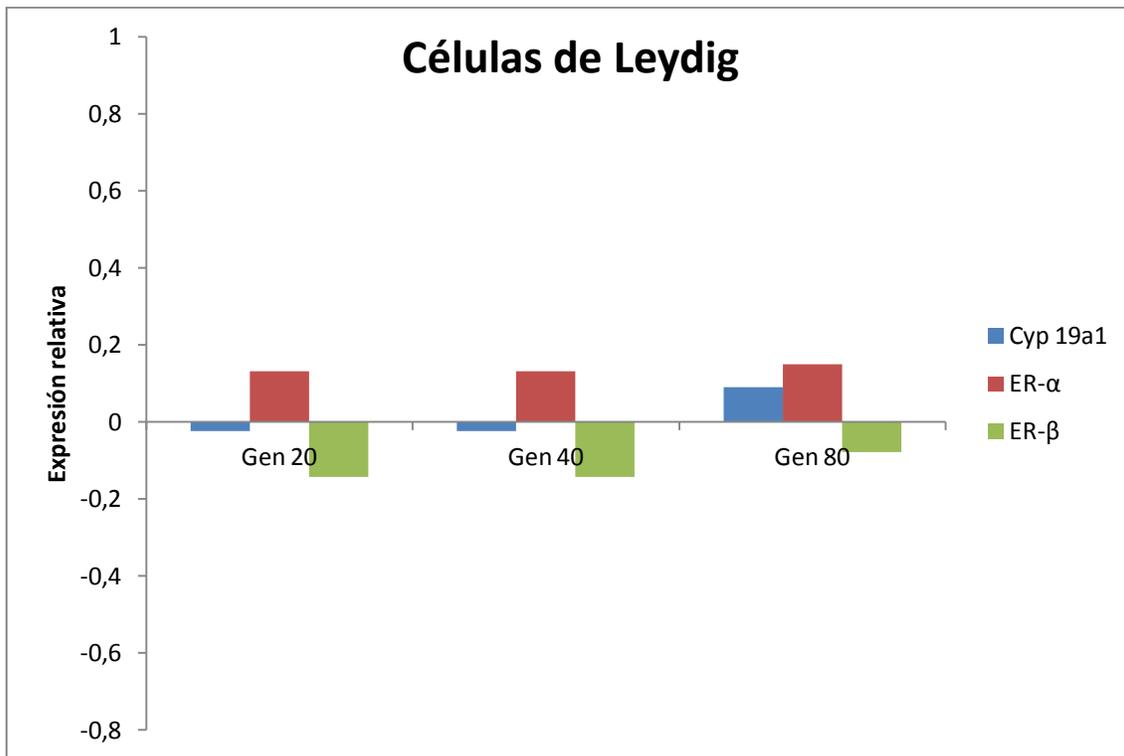


Figura 20. Expresión relativa de genes en las fracciones enriquecidas de células de Leydig de ratones tratados con diferentes concentraciones de genisteína. El ARN aislado de las fracciones enriquecidas en células de Leydig se trató como se describe en Materiales y Métodos. La expresión relativa de los diferentes genes se obtuvo por comparación con la amplificación para β actina.

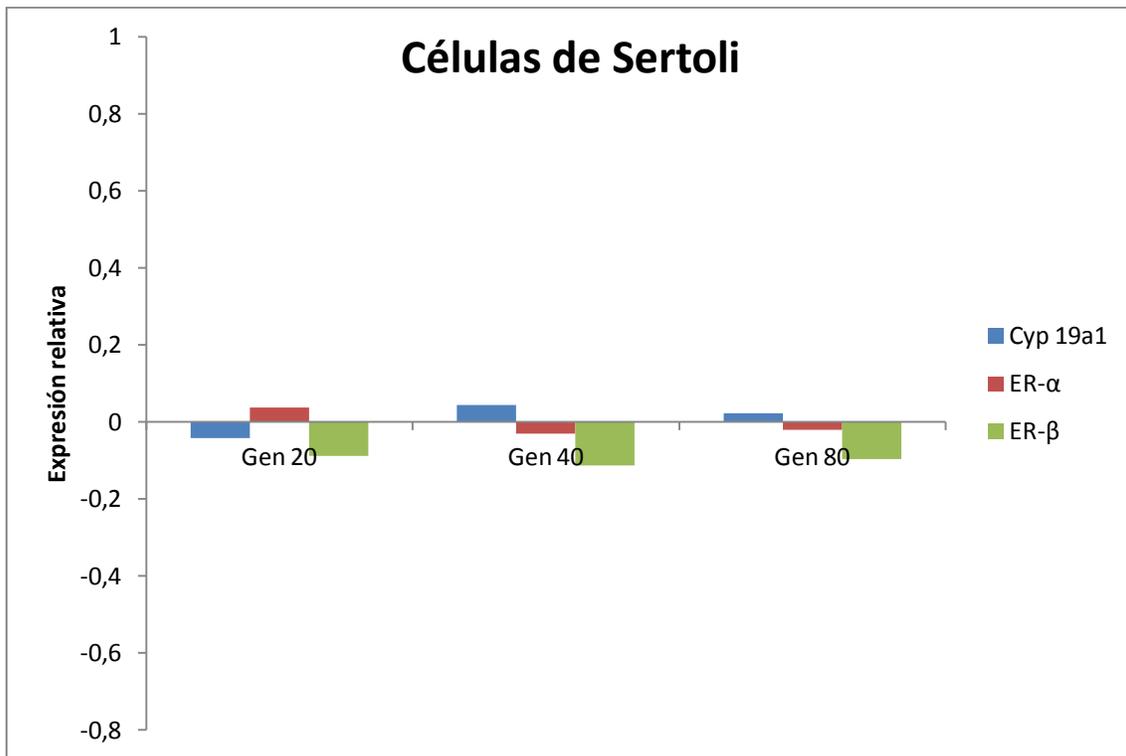


Figura 21. Expresión relativa de genes en las fracciones enriquecidas en células de Sertoli de testículos de ratones tratados oralmente con genisteína. Se aisló el ARN de las fracciones enriquecidas en células de Sertoli, se retro transcribió y amplificó como se describe en Material y Métodos. Se muestra las variaciones en la expresión de diferentes genes comparada a la del gen de β actina.

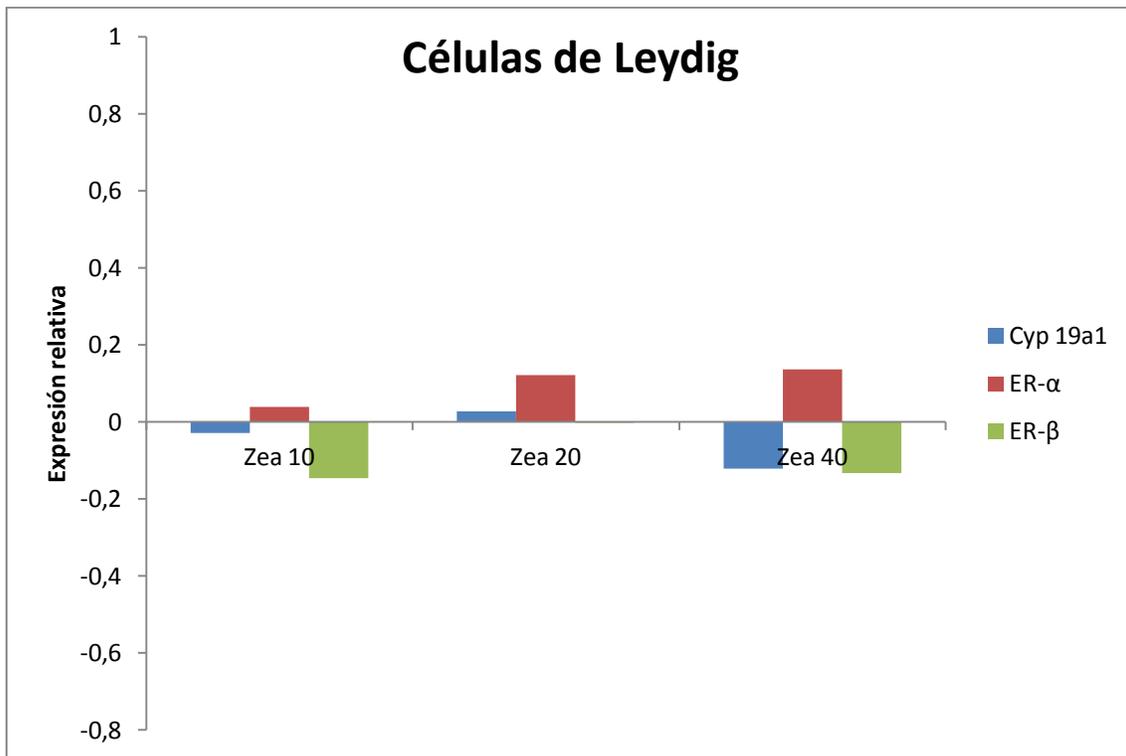


Figura 22. Expresión relativa en las fracciones enriquecidas en células de Leydig de ratones tratados con zearalonona. Los amplificadores obtenidos después de la retro-transcripción y amplificación a punto final se analizaron densitométricamente. La expresión relativa se hizo tomando al gen de β actina como referencia.

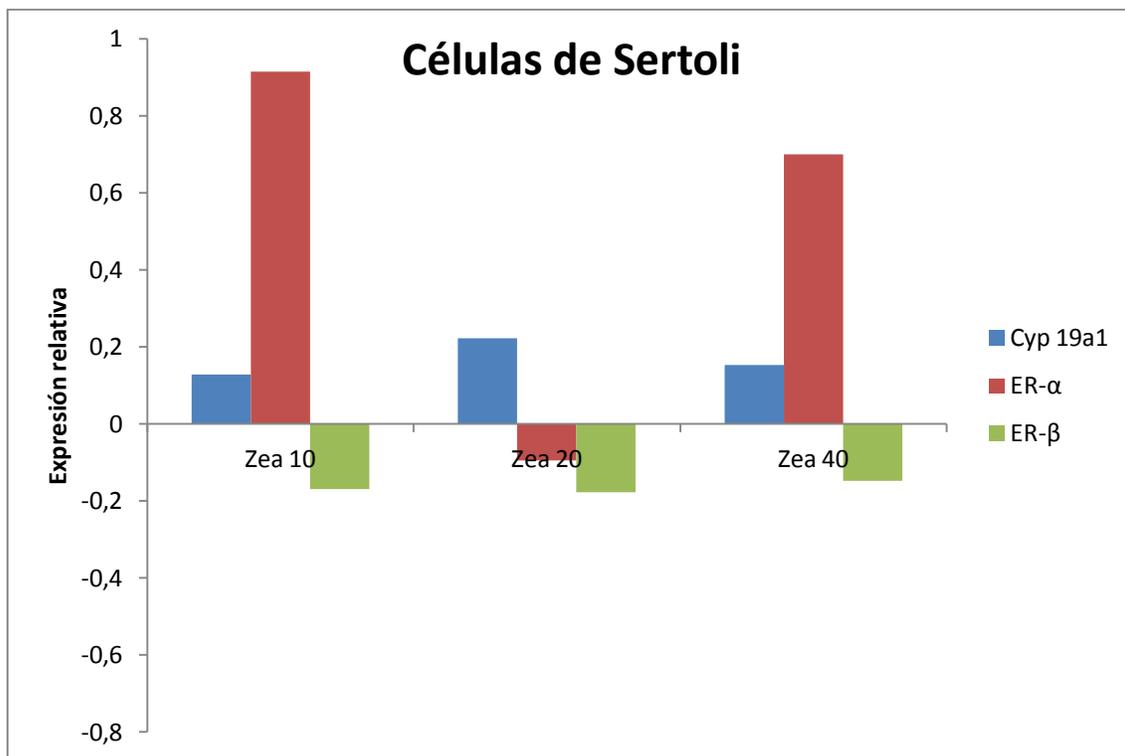


Figura 23. Expresión relativa de genes en las fracciones enriquecidas en células de Sertoli de testículos de ratones tratados oralmente con zearalona. Se aisló el ARN de las fracciones enriquecidas en células de Sertoli, se retro-transcribió y amplificó como se describe en Material y Métodos. Se muestra las variaciones en la expresión de diferentes genes comparada a la del gen de β actina

11 DISCUSIÓN

Dosis de los tratamientos

El consumo de fitoestrógenos en la alimentación diaria ha sido muy discutido, en un artículo publicado en la revista *Salud Pública de México* se menciona que no existe una guía para la ingesta adecuada para el consumo de fitoestrógenos, pero que el

consumo necesario para observar efectos biológicos benéficos en seres humanos es de 3-50 mg/día, valor que se obtiene con el consumo de 100 ml de leche de soya o tofu (Torres y Tovar, 2008). Breck y colaboradores en 2005 reportaron que el consumo de 40-50 mg de genisteína equivalen al consumo humano teniendo como efecto la disminución de AR y ER en próstata (Beck *et al.*, 2005).

Las concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ utilizada de genisteína en este experimento corresponden al valor estimado de consumo en la dieta diaria de los humanos (Carmichael *et al.*, 2011) y los valores de 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ corresponden a la mitad y el doble de este valor respectivamente. Para los valores de coumestrol se utilizó la concentración del doble de la concentración de genisteína, debido a que este presenta la mitad de afinidad relativa por los ER (Patisaul, 2005). En la literatura, está reportado que si bien la proporción de coumestrol en la dieta humana es relativamente menor (alrededor del 90% respecto del de la genisteína), el efecto se alcanza con dosis mayores (Bandera *et al.*, 2011). En el caso de la zearalonona en un modelo de cerdas se reportó que la administración oral de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día durante 14 días induce la disminución en la calidad de los ovocitos (Alm *et al.*, 2006), este tipo de concentración es considerada como alta y/o toxica (Kanora y Maes, 2009), por esta razón se consideró la décima parte (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día) y los valores de 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día corresponden a la mitad y el doble de la considerada como alimenticia (tabla 2).

Tamaño testicular e histo-arquitectura

El testículo en los mamíferos juega un papel muy importante en la reproducción, ya que es el responsable de la producción de las hormonas esteroideas y de la espermatogénesis. Este proceso se encuentra controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo; sistema neuroendocrino encargado de la regulación de la reproducción en los mamíferos (Carreau *et al.*, 2011, Crowley, 1999).

Para mantener el funcionamiento del tracto reproductivo masculino es necesaria la influencia de manera local de testosterona y estradiol (Assinder, 2007), hormonas que han sido reportadas en testículo y semen con valores superiores a los encontrados en suero de mujeres (Lucas *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por Atanassova y colaboradores, se observó que la exposición neonatal de ratas macho con compuestos estrogénicos (dietil estilbestrol 10 µg, octil fenol 2 mg, bisfenol A 0,5 mg y/o genisteína 4 mg/kg) por un periodo de 12 días altera la espermatogénesis puberal, el tamaño testicular el apareamiento y la fertilidad, generando un retraso en la espermatogénesis puberal, como se evidencia por la disminución de peso de los testículos y la formación del lumen, además de una disminución de la proporción considerada como unidad de espermatocitos por unidad de células de Sertoli y un aumento en el índice apoptósico de células germinales (Atanassova *et al.*, 2000). En nuestros resultados encontramos que el peso corporal de los ratones al inicio y al final de los tratamientos no tiene cambios significativos con respecto al control (figura 3), aunque se observa un aumento en el peso en todos

los tratamientos, esto también ocurre con los controles debido a que durante la administración de la dieta con fitoestrógenos los ratones aún se encontraba en crecimiento. Con respecto al peso de los testículos, encontramos que la relación peso testicular/peso corporal de los ratones de los diferentes tratamientos no presentan cambios significativos en comparación con los ratones control (figura 4-6), estos resultados son contradictorios con los obtenidos por algunos autores (Atanassova *et al.*, 2000, Mc Clain *et al.*, 2006, 2007, Tarragó-Castellanos *et al.*, 2006).

Una forma de explicar estos resultados es debido a que las dosis utilizadas en este trabajo corresponden a las dosis de consumo humano para el caso del coumestrol y la genisteína, mientras que para la zearalonona la concentración utilizada es 10 veces menor a la dosis tóxica. Por lo que la administración oral de estos fitoestrogenos no genera un cambio en el peso testicular como la harían dosis 10 o 100 veces mayores. No obstante a nivel de la histo-arquitectura testicular lo que encontramos es que si se presenta una disminución significativa con respecto al control en el tamaño de los túbulos seminíferos de los tratamientos a excepción de los grupos Cou 10, Gen 80 y Zea 20 en donde no se observaron cambios significativos con respecto al control (figuras 7-10) esta disminución en el tamaño de los túbulos es consistente con lo obtenido en un modelo de perro con una administración de 300 µg/kg por día de coumestrol durante 4 semanas (Perez-Rivero *et al.*, 2007) y/o un modelo de rata macho en donde se administraron 4 mg/kg por día

durante 12 días y se observó una disminución en el tamaño de los túbulos seminíferos y un aumento del lumen testicular (Atanassova *et al.*, 2000).

Esta disminución en el tamaño de los túbulos seminíferos podría estar asociado a una disminución en el número de células de Sertoli o un aumento en el índice apoptótico de las células germinales, fenómeno que fue reportado por Hess y colaboradores asociado a un aumento en las concentraciones de 17β -estradiol en el testículo (Hess *et al.*, 2001), indicando que en aquellos tratamientos en donde se aprecian cambios significativos en el tamaño de los túbulos seminíferos, los fitoestrógenos estarían actuando como agonistas de los ER y activando algunas vías apoptóticas como se ha visto en otros modelos. Ejemplo de esto se observa en un modelo de ratones lactantes, la administración de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso por día durante 6 y 16 días de coumestrol, dejó ver un aumento en los niveles de fosfatasa alcalina y RNAm de los genes que responden a estrógenos como c-fos y el factor de crecimiento endotelial, en tejido de duodeno (Kiriata *et al.*, 2011). En células de Sertoli lo que se avisto es que el E_2 juega un papel importante en la regulación de genes involucrados en la apoptosis y la proliferación celular como la Ciclina D1, Bcl2 y Bax (Royer *et al.*, 2011).

La presencia del aumento del lumen testicular en todos los tratamientos con excepción de Zea 10 y Zea 40 (figura 11) son consistente con lo reportado en la literatura, en donde el aumento del lumen va acompañado de una disminución del tamaño de los túbulos seminíferos (Atanassova *et al.*, 2000, Perez-Rivero *et al.*, 2007). Lo que es común en todos los tratamientos es la disminución del diámetro

mayor de los túbulos en comparación con los animales control (figura 12), esto significa que para compensar la deficiencia en el tamaño los túbulos seminíferos, estos tienden a perder su forma elíptica y adoptan una forma más redonda, como lo ha reportado en un modelo de bovinos adultos a los cuales se les administro 66.8 mg de coumestrol por kg de alfalfa y observo este mismo fenómeno (Pike *et al.*, 1999). Esto a su vez genera una disminución en el área cubierta por los las células de Sertoli y las estirpes germinales (figura 13) generando una disminución en el área cubierta por estas células y aumentando la luz del túbulo seminífero.

Obtención de fracciones enriquecidas

A nivel metodológico el procedimiento de obtención de fracciones enriquecidas permitió separar adecuadamente los componentes de los compartimentos tubular e intersticial. El uso de PBS en un primer lavado del tejido previamente desencapsulado elimina una gran cantidad de células sanguíneas de la muestra. Realizando el aislamiento sin este lavado se obtienen fracciones enriquecidas de células de Leydig con gran cantidad de células sanguíneas y cuyo contenido de ARN pudiera interferir con las evaluaciones de expresión génica. El uso de un gradiente de ficoll durante la primera etapa de la obtención fue de gran ayuda para el aislamiento de las fracciones crudas, ya que es muy notoria la separación entre los componentes, intersticiales que se mantiene en la parte superior del gradiente y los túbulos seminíferos que lo hacen hacia el fondo del tubo.

Con respecto a las fracciones enriquecidas de células de Leydig se obtuvieron con la presencia de algunos contaminantes como células sanguíneas, las cuales no pudieron ser eliminadas en su totalidad mediante el lavado con PBS. Esto podría asociarse a la disposición anatómica de los vasos sanguíneos que irrigan el testículo y que se encuentran en los espacios en los cuales se concentran las células de Leydig (figura 14).

La presencia de contaminantes celulares en las fracciones enriquecidas en células de Sertoli, puede ser explicado debido a que las espermátides presentan diferentes densidades debido a que presentan una gran cantidad de formas dependiendo la etapa de desarrollo en la que se encuentren (figura 15). Por este motivo pueden ser localizadas en el gradiente de sacarosa en todos los niveles, aún en aquellos donde se encuentra un mayor número de células de Sertoli. Por esta razón es muy difícil la separación completa. Al igual que en las fracciones de células de Leydig, la manipulación de los diferentes grupos se mantuvo bajo características similares por lo que se consideró una fuente de variación constante.

Extracción de ARN

En el caso de las muestras de ARN obtenidas para los experimentos presentaron una relación de pureza inferior a 1.6 (figura 16). Como se sabe las proteínas tienen un máximo de absorción a A_{280} (principalmente por residuos de triptofano) las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El

cálculo de la relación A_{260}/A_{280} es la manera más común para expresar la pureza de las muestras. Dependiendo de la composición nucléica, un valor de 1.65 a 1.9 indican una muestra pura (Amaru *et al.*, 2008). Aunque esto no es de todo cierto ya que debido a otros contaminantes una muestra con una relación alta de A_{260}/A_{280} puede no necesariamente producir buenos datos cuando se realizan las metodologías posteriores como síntesis, amplificación o traducción en medios libres de células. En muchas ocasiones también una muestra con una baja relación A_{260}/A_{280} puede ser utilizada sin ningún problema (Boom *et al.*, 1990), como fue el caso de nuestras muestras, en donde a pesar de una pureza baja se obtuvo la cantidad necesaria de ARN para realizar la expresión relativa (tabla 5 y 6).

Expresión relativa

Los estrógenos endógenos y los exógenos desempeñan un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de la función de la reproducción y la fertilidad, y también tienen un papel muy importante en procesos patológicos observados en los tejidos reproductivos (Carreau y Hess, 2010). Por esta razón el equilibrio entre andrógenos y estrógenos en el macho es de suma importancia para mantener la función reproductiva (Lucas *et al.*, 2011).

La fuente principal de los estrógenos en el testículo es la conversión local de andrógenos a estrógenos por el citocromo P450 aromatasa, codificada por el gen CYP19A1 (Carreau y Hess, 2010). La aromatasa es localizada en el retículo

endoplásmico y es la encargada de catalizar el último paso en la vía androgénica (Lazari *et al.*, 2009). Dependiendo de la especie, la aromatasa puede ser detectado en las células de Leydig y Sertoli, en espermatogonias, espermatocitos, espermatidas alargadas y espermatozoides (Carreau *et al.*, 2011). En roedores se ha visto que en etapas tempranas del desarrollo las células de Sertoli son la principal fuente de estrógenos, mientras que en etapas adultas las células de Leydig se convierten en las productoras de estas moléculas (Papadopoulos *et al.*, 1986). La evaluación de las alteraciones inducidas en la transcripción de este gen podría hacer una correlación con las alteraciones funcionales y estructurales en los componentes testiculares de roedores expuestos a dosis alimentarias de los diferentes fitoestrógenos.

El tratamiento con coumestrol induce una menor cantidad de ARN en las células de Sertoli para el gen Cyp19A1 a dosis bajas y altas (figura 19). En la dosis intermedia de 20 µg/kg de peso, aparentemente hay un aumento marginal (<0.1) en la cantidad relativa de ARN transcrito para este gen. Este dato puede tener una doble interpretación. Por un lado, se ha reportado que el efecto agonista o antagonista de los fitoestrógenos es dependiente de la concentración (Serrano y Pérez Rivero, 2010) y por otro lado, las alteraciones en la citología de los túbulos seminíferos evidencia una proporción y cantidad diferencial de las células que conforman los márgenes del lumen tubular. En el primer caso, es necesario realizar evaluaciones con metodologías más sensibles para poder determinar si la variación observada se debe a una inducción real de la expresión del gen. Podríamos sugerir utilizar PCR de

tiempo real con la fracción enriquecida de células de Sertoli para hacer estas determinaciones. En el segundo caso, una metodología alternativa podría ser el uso de histoquímica o inmunocitoquímica que permita evaluar la variación en la cantidad de células de Sertoli inducidas por el tratamiento con coumestrol.

Al igual que el grupo con coumestrol, la zearalonona induce un aumento marginal en la cantidad de ARN para Cyp19A1 en las células de Sertoli a cualquiera de las cantidades administradas (figura 23), mientras que en las células de Leydig se observa una disminución en el tratamiento Zea 40 (figura 22). Esto podría explicarse debido a que la zearalonona se ha reportado como un agente hiperestrogénico en modelos de cerdas administradas con 400 µg/kg por día (A. Kanora y Maes, 2009), aunque este último dato es sorprendente pues si bien es entendible la ruta metabólica que interviene en la utilización de los estrógenos en las células de Sertoli, en las células de Leydig aparentemente se está afectando una vía cuya expresión natural debería ser inferior a la de las células de Sertoli. Este hallazgo necesita ser confirmado experimentalmente utilizando otras metodologías basadas no únicamente en la amplificación, sino incluso en presencia de inhibidores específicos de la transcripción de este gen.

Los ER tienen un papel muy importante en la función reproductiva, los ER α en roedores han sido identificados en células de Leydig, mientras que en primates se han localizado en Leydig, espermatoцитos, espermátides y espermatozoides (Lambard *et al.*, 2004). En el caso de los ER β tanto en primates como en roedores, han sido identificados en todos los tipos celulares del testículo (Carreau *et al.*, 2006,

Saunders *et al.*, 1998). La presencia de los ER en la células testiculares y la síntesis de ligando de manera local, como se mencionó anteriormente, sugiere la existencia de un efecto paracrino y/o autocrino llevado a cabo en el testículo.

En nuestro caso, la presencia de células de la estirpe germinal en las fracciones enriquecidas en células de Sertoli no permite hacer una distinción real entre las variaciones en la expresión relativa de los receptores estrogénicos, sobre todo en aquellos tratamientos con genisteína y zearalona en donde estas variaciones son marginales. El cambio dramático en la expresión de los ER α inducida por el tratamiento con coumestrol requiere una confirmación utilizando alguna metodología que permita obtener fracciones puras o semi-puras de células de Sertoli y Leydig o bien utilizar modelos en los cuales el desarrollo de los tipos celulares de células germinales progenitoras no se encuentren en las gónadas. Las células de tumores formados solamente por células de Leydig o Sertoli podrían representar una alternativa.

Una de las estrategias metodológicas que permiten la determinación de la participación de dos o más tipos celulares es la separación física de sus componentes. En el caso del testículo, además de las células que conforman la estirpe germinal que va desde la espermatogonia hasta el espermatozoide pasando por los diversos estadios del espermatozito, son las células de Sertoli en contacto estrecho con la estirpe germinal, y las células de Leydig. En este estudio se trató de obtener fracciones puras de ambos tipos celulares basándose en las características

de densidad y la facilidad de obtener compartimentos tubulares e intersticiales por separaciones simples.

Para las fracciones enriquecidas en células de Leydig, los principales contaminantes fueron las células sanguíneas y, en menor escala, las de los epitelios que conforman los vasos sanguíneos. Potencialmente, el ARN de los leucocitos presentes y, en menor proporción, el de los eritrocitos podría interferir en las determinaciones posteriores que se realizaron. A pesar de ello, se mantuvo como una fuente de variación en la metodología y, para disminuir su efecto, se trataron tanto las muestras del grupo control como las de los diferentes grupos experimentales de la misma forma.

Las fracciones enriquecidas en células de Sertoli presentan una dinámica ligeramente diferente que hace aún más compleja su separación. Estructuralmente, las células de Sertoli y aquellas que forman la estirpe germinal presentan interacciones más estrechas ya que la unidad anatómica representada por estas células conforman la barrera hemato-testicular que permite mantener un ambiente específico que permite la diferenciación terminal de la estirpe germinal hacia la producción de espermatozoides. Las fracciones enriquecidas de células de Sertoli mostraron una cantidad remanente de células de la estirpe germinal en diferentes estadios de diferenciación.

12 CONCLUSIONES

Nuestros resultados concluyeron que la administración de fitoestrógenos (coumestrol, genisteína y zearalonona) en las dosis probadas en este estudio, no induce cambios en el peso de los testículos de los animales tratados.

Aunque el peso de los testículos no presenta variaciones, estos resultados también demuestran que dosis consideradas como alimentarias de distintos fitoestrógenos inducen alteraciones en la histo-arquitectura como la disminuyendo el tamaño de los túbulos seminíferos de manera similar a lo obtenido con dosis farmacológicas que ya han sido documentadas,

En la expresión relativa se concluyó que los productos de transcripción del gen de la aromatasasa (Cyp19a1) del ratón se encuentran disminuidos por el tratamiento de coumestrol y aumentados en los tratamientos con zenisteina, mientras que aquellos provenientes del gen ER α se encuentran aumentados considerablemente en ambos tratamientos. Se considera que la falta de claridad en el efecto sobre la expresión relativa de los genes ER α y ER β puede estar enmascarada por la presencia de células contaminantes en las fracciones enriquecidas.

13 PERSPECTIVAS

De manera global, la sugerencia para continuar en la elucidación de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta a los fitoestrógenos es utilizar metodologías cuyo poder fuera superior al utilizado en el presente trabajo. Particularmente, sería adecuada la incorporación de estudios de microscopía confocal que permitiera evaluar la presencia de proteínas específicas como los propios receptores a estrógenos y la aromatasa, entre otras proteínas. Igualmente, la evaluación del transcriptoma ya sea por PCR de tiempo real o mediante microarreglos permitiría no solo validar nuestros hallazgos, sino ampliar significativamente el impacto que tienen los fitoestrógenos obtenidos en la dieta sobre células, tejidos o el organismo completo.

13 BIBLIOGRAFÍA

- Alm H., Brussow K.-P., Torner H., Vanselow J., Tomek W., Danicke S., Tiemann U. Influence of Fusarium – toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilts oocytes. *Reproductive Toxicology*. 2006; 22: 44–50.
- Amaru R., Peñaloza R., Miguez H., Torres G., Cuevas H. UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. *Cuadernos*. 2008; 53(1): 38-43

- Assinder S., Davis R., Fenwick M., Glover A. Adult -only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction*. 2007; 133(1): 11-9
- Atanassova N., McKinnell C., Turner K., Walker M., Fisher J., Morley M., Millar M., Groome N., Sharpe, R. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*. 2000; 141(10): 3898-3907
- Bacciottini L., Falchetti A., Bartolini E., Carossino A., Brandi M. Phytoestrogens: food or drug?. *clinical case min bone metabolism*. 2007; 4(2): 123-130
- Bandera E., King M., Chandran U., Poddock L., Rodriguez-Rodriguez L., Olson S. Phytoestrogen consumption from foods and supplements and epithelial ovarian cancer risk: a population-based case control study. *BMC Women's Health*. 2011; 11(40): 1-9
- Beck, V., Rohr U., Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2005; 94:499-518.
- Bonilla C. Isoflavonas en ginecología, terapia no convencional. *Revista Colombiana Obstetricia Ginecológica*. 2004; 55(3): 209-217

- Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C, Wertheim-van Dillen M., Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28(3): 495-503.
- Brugo-Olmedo S., Chillik C., Kopelman S. Definición y causas de la infertilidad. *Revista Colombiana Obstetricia Ginecológica*. 2008; 54(4): 227-248
- Cao Y., Calafat AM., Doerge DR., Umbach DM., Bernbaum JC., Twaddle NC., Ye X., Rogan WJ. Isoflavones in urine, saliva, and blood of infants: data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula. *Journal Exposition Science Environment Epidemiology*. 2009; 19: 223–234
- Carmichael, S., Gonzalez-Feliciano, A., Ma, C., Shaw, G., Cogswell, M. Estimated dietary phytoestrogens intake and major food sources among women during the year before pregnancy. *Nutrition Journal*. 2011; 10:105
- Carreau S y Hess R. Oestrogens and spermatogenesis. *Phil. Trans.* 2009; 365, 1517–1535
- Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FR, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Science*. 2011; 89: 584-7
- Carreau S. Paracrine control of human Leydig cell and Sertoli cell functions. *Folia Histochem Cytobiol*. 1996; 34(2-3): 111–119
- Carreau S., Bourguiba S., Lambard S., Galeraud-Denis I., Genissel C., Levallet J. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002; 193(1-2): 137-43

- Carreau S., Delalande C., Silandre D., Bourguiba S., Lambard S. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 426(1-2): 65-68
- Carreau, S., Lelong, H., Delelende, C., Estrogen-new players in spermatogenesis. *Reproductive Biology*. 2011; 11(3): 174-93
- Crowley W. Toward Multifactorial Hypothalamic Regulation of Anterior Pituitary Hormone Secretion. *News Physiology science*. 1999; 14: 54-58
- Foster WG., Chan S., Platt L., Hughes CL Jr. Detection of phytoestrogens in samples of second trimester human amniotic fluid. *Toxicology Lett*. 2002; 129: 199–205
- Glitso, L., Mazur, W., Adlercreutz, H., Wähälä, K., Mäkelä, T., Sandström, B., Bach., Knudsen, K. Intestinal metabolism of rye lignans in pigs. *British Journal of Nutrition*. 2000; 84(4): 429-437
- Hess R., Bunick D., Bahr J. Oestrogens, its receptors and function in the male reproductive tract-a review. *Molecular Cell and Endocrinology*. 2001; 178: 29-38
- Jefferson W., Patisaul H., Williams C. Reproductive Consequences of Developmental Phytoestrogen Exposure. *Reproduction*. 2012; 143(3):247–260
- Kanora A y Maes D. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Veterinarni Medicina*. 2009; 54(12): 565–576
- Kao YC., Zhou C., Sherman M., Laughton C., Chen S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone

phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environmental Health Perspectives*. 1998; 106: 85–92

- KiriHata Y., Horiguchi Y., Ueda M., Sugimoto M., Ikeda S., Kume S. Effects of coumestrol administration to pregnant and lactating mice on intestinal alkaline phosphatase activity. *Phytotherapy research*. 2011; 25(5): 654-8
- KuhnLe G., DeLL'AquiLA C., AsPinALL S., Runswick S., Joosen A., Mulligan A, y BinghAm S. Phytoestrogen content of fruits and vegetables commonly consumed in the UK based on LC–MS and 13C–labelled standards. *Food Chemistry*. 2009; 116: 542–554
- Lenis Y., Gutiérrez M., Tarazona A. Efectos de los fitoestrógenos en la reproducción animal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 2010; 63(2): 5555-5556
- Lorand T., Vigh E., Garai J., Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. *Current medicinal chemistry*. 2010; 17: 3542–3574
- Lucas T., Pimenta T., Pisolato R., Lazari M., Porto C. 17 β -estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis*. 2011; 1(4): 318–324
- Malekinejad H., Maas-Bakker R.F., Fink-Gremmels J. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Veterinary Research*. 2005; 36: 799–810
- Malekinejad H., Schoevers E.J., Daemen I.J.J.M., Zijstra C., Colenbrander B., Fink-Gremmels J., Roelen B.A.J. Exposure of oocytes to the Fusarium

toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. *Biology of Reproduction*. 2007; 77: 840–847

- McClain, R., Wolz, E., Davidovich, A. Acute, subchronic safety studies with genistein in rats. *Food Chemical Toxicology*. 2006;44: 56-80
- McClain, R., Wolz, E., Davidovich, A. Reproductive safety studies with genistein in rats. *Food Chemical Toxicology*. 2007; 45: 1319-1332
- Minervini, F., y DeLL'Aquila M. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008; 9: 2570–2584.
- Morton MS., Arisaka O., Miyake N., Morgan LD., Evans BA. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *Journal Nutrition*. 2002; 132: 3168–3171
- Noriega M., Langley E. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer de mama. *Cancerología*. 2008; 3: 29-40
- Ogborn MR., Nitschmann E., Bankovic-Calic N. The effect of dietary flaxseed supplementation on organic anion and osmolyte content and excretion in rat polycystic kidney disease. *Biochemistry and Cell Biology*. 1998; 76: 553-559.
- Papadopoulos V., Carreau S., Szerman-Joly E., Drosdowsky M., Dehennin L., Scholler R. Rat testis 17-beta estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age-related cellular distribution. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1986; 24: 1211–1216
- Patisaul, H., Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinology*. 2010; 31(4): 400-419

- Patisaul, H., Phytoestrogen Action in the Adult and Developing Brain. *Journal of Neuroendocrinology*. 2005; 17: 57-64
- Pérez-Rivero J., Aguilar A., Martínez J., Pérez M., Serrano H. Los fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. *Agricultura Tecnológica*. 2007; 67(3): 325-331
- Pérez-Rivero J., Martínez-Maya J., Pérez-Martínez M., Aguilar-Setién A., Serrano H. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral. *Veterinaria México*. 2008; 40(1): 9-16
- Pike A., Brzozowski A., Hubbard R., Bonn A. Thorsell O. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO Journal*. 1999; 18: 4608-4618.
- Prakash P., D'Cruz Z. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian Journal of Andrology*. 2011; 13: 585-591
- Retana-Marquéz S., García F., Alcántara M., García E., Muñoz-Gutiérrez., Arteaga M., Lopez G., Romero C., Chemineau p., Keller M., Delgadillo J. Mezquite pod extract modifies the reproductive physiology and behavior of the female rat. *Hormonas and Behavior*. 2012; 61: 549-558
- Romero C., Castellanos R., Mendoza R., Reyes R., García A. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinaria México*. 1997; 28(1): 25-30

- Royer C., Lucas TF., Lazari MF., Porto CS. 17 β -estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis*. 2011; 1:4 318-324
- Saunders P. Does estrogen receptor β play a significant role in human reproduction? *Trends Endocrinology Metabolism*. 2005; 16(5): 222-227
- Serrano H., Pérez-Rivero J. Mecanismos de control hormonal: la superfamilia de los receptores nucleares. En: *Fisiología Veterinaria, introducción a la fisiología de los procesos productivos* (S. Caballero y A. Villa-Godoy, eds), UNAM, México. 2010; 181-188.
- Setchell K., Gosselin S., Welsh M., Johnston J., Balistreri W., Kramer L., Dresser B., Tarr M. Dietary estrogens a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*. 1987; 93(2): 225–233
- Shanle EK y Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chemical Research in Toxicology*. 2011; 24: 6–19
- Simoncini T. Mecanismo de acción de los receptores de estrógeno en células vasculares: relevancia para la menopausia y el envejecimiento. *Revista del Climaterio*. 2010; 74(13): 41-47
- Tarragó-Castellanos C., García C., Días V., Velásquez J. Gonadotropin levels and morphological testicular features in rats after different doses of the phytoestrogen coumestrol. *Neuro Endocrinology Letters*. 2006; 27: 487-492

- Torres y Torres, N. y Tovar-Palacio, A. La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. *Salud pública de México*. 2009; 51:3
- Unüvar T. y Büyükgebiz J. Fetal and Neonatal Endocrine Disruptors. *Journal Clinical Pediatric Endocrinology*. 2012; 4(2): 51-60
- Verkasalo PK., Appleby PN., Allen NE., Davey G., Adlercreutz H., Key TJ. Soya intake and plasma concentrations of daidzein and genistein: validity of dietary assessment among eighty British women (Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). *British Journal of Nutrition*. 2001; 86: 415–421
- Watson CS., Alyea RA., Jeng YJ. Kochukov MY. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007; 274: 1–7
- Whitten P. y Patisaul B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109(1): 5-20
- Wilson M., Westberry J., Prewitt A. Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: A role for promoter methylation? *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2008; 29: 375-385
- Woclawek-Potocka I., Mannelli C., Boruswska D., Kowalczyk-Zieba Ilona., Wasniewski T., Skarzynski D. Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model. *International Journal of endocrinology*. 2013; 1: 1-15

- Wu C., Tzeng J., Lai J., Tsan S., Wang J. Prescription profile of Chinese herbal products containing coumestrol, genistein, and/or daidzein among female users: an analysis of national health insurance data in Taiwan between 1997 and 2007. *Chinese Medicine*. 2012; 7(22): 1-6
- Zhao E y Mu Q. Phytoestrogen Biological Actions on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. *Scientia Pharmaceutica*. 2010; 79: 1-20
- Zierau, O., Kretzschmar. G., Möller. F., Weigt, C., Vollmer, G. Time dependency of uterine effects of naringenin type phytoestrogens in vivo. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008; 294(1-2): 92-99



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00120

Matricula: 2113801426

ASPECTOS MOLECULARES DE LA ESTIMULACION CON FITOESTROGENOS EN CELULAS DE LEYDIG Y SERTOLI DE RATONES CD-1

En México, D.F., se presentaron a las 15:00 horas del día 2 del mes de diciembre del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. PABLO ARTURO SALAME MENDEZ
- DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES
- DR. MARIO PEREZ MARTINEZ
- DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO



GUILLERMO MORA RAMIRO
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GUILLERMO MORA RAMIRO

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. PABLO ARTURO SALAME MENDEZ

VOCAL

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL

DR. MARIO PEREZ MARTINEZ

SECRETARIA

DRA. IRIS ANGELICA FERIA ROMERO