

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

Maestría En Biología De La Reproducción Animal



Casa abierta al tiempo

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL EXTRACTO DE LA VAINA DE
MEZQUITE (*Prosopis juliflora*) SOBRE PARAMETROS REPRODUCTIVOS EN LA
DESENDENCIA FEMENINA Y MASCULINA EN LA ETAPA ADULTA**

T E S I S

**Para obtener el grado de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal**

PRESENTA:

BIOL. FLORIBERTA SOLANO SILVA

DIRECTORA:

DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ

ASESORAS:

MTRA. SUSANA ROJAS MAYA

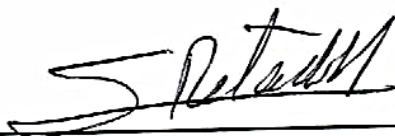
DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS.

Ciudad de México. 2018

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA:

DRA. MARÍA DEL SOCORRO IMELDA RETANA MÁRQUEZ
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa




ASESORA:

DRA. ADRIANA LIZBETH JUÁREZ ROJAS
Universidad Insurgentes



ASESORA:

MTRA. SUSANA ROJAS MAYA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México



“Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción, en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección y asesoría de la doctora María del Socorro Imelda Retana Márquez, la doctora Adriana Lizbeth Juárez Rojas y la maestra Susana Rojas Maya.

El Programa de Maestría en Biología de la reproducción animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACYT (PNPC) registro 593563”.

Numero de CVU: 718733 y becario otorgado por CONACYT: 426954.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado fueron designados por la Comisión de Posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Efecto de la exposición prenatal al extracto de la vaina de Mezquite (*Prosopis juliflora*) sobre parámetros reproductivos en la descendencia de ratas hembra y macho adultas” que presentó Floriberta Solano Silva el día 5 de abril del 2018.

M. EN B. E. GABRIELA LÓPEZ
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DRA. ADRIANA LIZBETH JUÁREZ ROJAS
Universidad Insurgentes

DRA. LETICIA GONZÁLEZ NÚÑEZ
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

DR. GERARDO PERERA MARÍN
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al posgrado en **Biología de la Reproducción Animal** de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Agradezco a mi directora de tesis la **Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez** por todo su apoyo y por darme la oportunidad de realizar el proyecto de investigación en el laboratorio de Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

A mi compañera de laboratorio y asesora la **Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas** por el apoyo en la realización de técnicas experimentales requeridas para este trabajo de tesis y por asesorarme en la realización de la tesis.

A la **Matra. Susana Rojas Maya**, por su tiempo, enseñanza y por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UNAM.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Neuropsicoendocrinología, principalmente a Eunice Hernández Soñanes y a Sergio Jonathan Romero Palacios por su apoyo incondicional, amistad y por los momentos que compartimos a diario en el laboratorio.

A mi amigo y compañero de la carrera **José Luis Martínez Ibarra** por el tiempo que pasamos juntos, por su comprensión, ayuda y amistad.

“Estoy eternamente agradecida a mis padres, **Armando Solano García** y **Antonia Silva Hernández**, que siempre han sido un ejemplo de esfuerzo y dedicación, que gracias a ello he podido alcanzar mis metas”. Y a mi hermana **Lucía Solano Silva** por su compañerismo y por todo su apoyo.

“GRACIAS”

RESUMEN

El mezquite (*Prosopis sp.*) es una leguminosa ampliamente utilizada como alimento de diversas especies de ganado debido a su alto contenido en proteína, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales. La vaina de mezquite contiene los fitoestrógenos mesquitol, luteolina, quercetina, isoharmnetina, genisteína y daidzeína. Los fitoestrógenos se comportan imitando la acción de los estrógenos debido a que pueden unirse a los receptores α y β estrogénicos, por lo que estas sustancias podrían tener efectos similares a estrógenos en los individuos que consumen la vaina de mezquite por periodos de tiempo prolongados. A pesar de esto, no existen estudios relacionados con los posibles efectos que esta vaina pudiera causar en la reproducción, la fertilidad de animales y del ser humano. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las alteraciones causadas por la administración prenatal del extracto de la vaina de mezquite sobre algunos aspectos reproductivos en la descendencia de ratas hembras y machos adultas, y la comparación de sus efectos con los del fitoestrógeno daidzeína (DAI). Se administraron los tres tratamientos durante 30 días consecutivos, tanto en machos como en hembras intactas adultas jóvenes: 1) vehículo; 2) extracto de vaina de mezquite y 3) daidzeína. Al finalizar los tratamientos, las hembras experimentales copularon con los machos experimentales. Una vez que las hembras quedaron preñadas, se continuó con la administración de los tratamientos durante toda la gestación hasta el nacimiento de las crías. Las crías se separaron en 9 grupos (n=10 cada uno), de acuerdo con el tratamiento administrado a los padres y se esperó a

que llegaran a la etapa adulta. En la descendencia femenina se evaluó la progresión del ciclo estral, la conducta sexual y se midieron las concentraciones séricas de estradiol (E₂) y progesterona (P₄). En la descendencia masculina se evaluó la conducta sexual, se realizó el análisis espermático y se midieron los niveles de testosterona. Una vez evaluada la conducta sexual, los animales fueron anestesiados con pentobarbital, se disectaron los órganos reproductivos y se obtuvo sangre por punción cardiaca. En los machos se realizó el análisis de la calidad de los espermatozoides de la cauda del epidídimo. Los resultados muestran que las hembras expuestas prenatalmente al extracto de la vaina de mezquite presentaron aumento en el número de días en estro, alargando así la duración del ciclo estral. El porcentaje de hembras receptivas, el coeficiente lordótico y la intensidad de la lordosis disminuyeron por efecto del extracto, patrón similar a lo producido por la DAI. En los machos, el extracto de mezquite incrementó las latencias de eyaculación y disminuyó el número de eyaculaciones. En comparación con los machos control se presentó menor peso glandular y testicular, así como menor movilidad, viabilidad y concentración espermática en comparación con los machos control. Estos efectos fueron similares a los de la DAI. Las concentraciones séricas de hormonas sexuales en las hembras y en los machos fueron similares a los del grupo control. Estos resultados indican que la exposición prenatal al extracto de la vaina de mezquite es capaz de alterar algunos parámetros reproductivos en la descendencia femenina y masculina.

Palabras clave: Mezquite; Fitoestrógenos; reproducción.

ABSTRACT

Mesquite (*Prosopis sp.*) is a legume widely used in the feeding of various species of livestock due to its high content of protein, carbohydrates, fiber, vitamins and minerals. The mesquite pod contains the phytoestrogens mesquitol, luteolin, quercetin, isoharmnetin, genistein and daidzein. It has been demonstrated that phytoestrogens can mimic the action of estrogens as they can bind to estrogen receptors α and β , so these substances could have estrogenic effects in animals and people who consume the mesquite pod for prolonged periods of time. To date, there are no studies about the possible effects that this pod could have on the reproduction and fertility of animals and humans. So, the objective of this study was to evaluate the alterations caused by the prenatal administration of the extract of mesquite pod in some reproductive aspects in the adult male and female offspring, comparing their effects with those of the phytoestrogen daidzein (DAI). Three treatments were administered for 30 consecutive days in males and females: 1) vehicle; 2) mesquite pod extract and 3) daidzein. Experimental females copulated with experimental males, and the treatments continued being administered in pregnant females throughout the gestation until offspring birth. The offspring were separated into 9 groups (n=10 each), according to the treatment administered to the parents and several reproductive variables were assessed in adulthood. In female offspring, the progression of the estrous cycle sexual behavior and serum concentrations of estradiol and progesterone were evaluated. In male offspring, sexual behavior, sperm quality and testosterone levels were assessed. The results indicated that mesquite

pod extract increased the estrous cycles duration by increasing the number of days in estrus in female descendants. The percentage of receptive females, lordotic quotient, and intensity of lordosis also decreased. In male descendants, mesquite pod extract caused greater latencies of ejaculation and lower number of ejaculations, decreased glandular and testicular weights, decreases mobility, viability and sperm concentration. No significant differences were observed in female and sexual hormones in the progeny. All these effects were similar to those of DAI. These results indicate that the administration of mesquite pod extract to pregnant females alters some reproductive parameters in adult male and female progeny.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Clasificación científica y descripción del Mezquite	15
1.2 Distribución del mezquite	18
1.2.1 Hábitat	18
1.2.2 Descripción, floración, fructificación y recolección	18
1.2.3 Importancia y usos	20
1.3 Metabolitos secundarios contenidos en el Mezquite	21
1.4 Fitoestrógenos, clasificación y fuentes alimentarias	21
1.4.1 Mecanismo de acción de los fitoestrógenos	25
1.5 Efectos de los fitoestrógenos en la salud	29
1.5.1 Fitoestrógenos en el desarrollo fetal	30
1.5.2 Exposición fetal a disruptores endocrinos	31
1.5.3 Funciones de la placenta	31
1.5.4 Etapas sensibles del desarrollo	32
1.6 Diferenciación sexual cerebral	33
1.6.1 Disfunción sexual hipotalámica	34
1.6.2 Núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM)	35
1.6.3 Área preóptica (APO)	35
2. ANTECEDENTES	36
2.1 Fitoestrógenos, su interacción con los RE	36
2.2 Alteraciones reproductivas por el consumo de forrajes con fitoestrógenos	37
2.3 El consumo de fitoestrógenos durante la gestación	37
2.4 Efecto de los fitoestrógenos en la atapa prenatal	48
2.5 Efectos estrogénicos del extracto de la vaina de mezquite	40
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
4. JUSTIFICACIÓN	41
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	42

6. HIPÓTESIS	43
7.OBJETIVOS	43
7.1 Objetivo general	43
7.2 Objetivos particulares	43
8. MATERIAL Y MÉTODOS	44
8.1 Diseño experimental	45
8.2 Animales de laboratorio	46
8.3 Obtención del extracto de la vaina del mezquite	46
8.4 Grupos experimentales	46
8.5 Evaluación de parámetros reproductivos en las hembras	49
8.5.1 Ciclo estral	49
8.5.2 Conducta sexual femenina	50
8.5.3 Obtención de órganos reproductores femeninos	51
8.5.4 Evaluación histológica de útero y vagina	53
8.5.5 Medición de la altura del epitelio vaginal y uterino	54
8.6 Concentración sérica de estradiol, progesterona y testosterona	54
8.6.1 Técnica de ELISA	55
8.7 Evaluación de parámetros reproductivos en los machos	55
8.7.1 Conducta sexual masculina	55
8.7.2 Órganos reproductores masculinos	57
8.7.3 Evaluación de muerte en células testiculares por TUNEL	57
8.7.4 Análisis espermático	59
8.7.5 Movilidad	60
8.7.6 Viabilidad	60
8.7.7 Concentración espermática	60
8.8 Análisis estadístico	61
9. RESULTADOS	61
9.1 Hembras	61
9.1.1 Peso corporal	61

9.1.2 Ciclo estral	63
9.1.3 Apertura vaginal	64
9.1.4 Conducta sexual femenina	65
9.1.5 Órganos reproductores de las hembras	67
9.1.6 Medias de los epitelios vaginal y uterino	68
9.1.7 Concentraciones séricas de estradiol y progesterona	70
9.2 Machos	71
9.2.1 Conducta sexual masculina	71
9.2.2 Peso corporal	72
9.2.3 Detección de muerte en células testiculares mediante TUNEL	75
9.2.4 Parámetros espermáticos	77
9.2.5 Concentraciones séricas de testosterona	79
10. DISCUSIÓN	79
10.1 Hembras	80
10.1.1 Peso corporal	80
10.1.2 Ciclo estral	81
10.1.3 Apertura vaginal	83
10.1.4 Conducta sexual femenina	84
10.1.5 Medias de los epitelios vaginal y uterino	85
10.1.6 Concentraciones séricas de estradiol y progesterona	85
10. 2 Machos	86
10.2.1 Conducta sexual masculina	86
10.2.2 Peso corporal y testicular	87
10.2.3 Apoptosis en células testiculares mediante TUNEL	88
10.2.4 Parámetros espermáticos	89
10.2.5 Concentraciones séricas de testosterona	92
11. CONCLUSIÓN	92
12. BIBLIOGRAFÍA	93

ABREVIATURAS

E ₂	17beta-estradiol
P ₄	Progesterona
RE	Receptores de estrógeno
RE α	Receptores de estrógeno alfa
RE β	Receptores de estrógeno beta
LBD	Dominio carboxi-terminal de unión al ligando
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NTD	Dominio de unión al ligando
SNC	Sistema nervioso central
SHBG	Proteína fijadora de hormonas esteroides humana
AFP	Alfa fetoproteína
CDE	Disruptores endocrinos
T	Testosterona
APO	Área preóptica
NVM	Núcleo ventromedial
NSQ	El núcleo supraquiasmático
ST	Estría terminal
SDN-POA	Núcleo sexualmente dismórfico del área preóptica del hipotálamo
BST	Núcleo cama de la estría terminal
MEA	Amígdala medial
DAI	Daidzeina
GEN	Genisteína
CON	Grupos controles (CC, CM, CD, CE)
MEZ	Grupos mezquite (MC, MM, MD, ME)
DAID	Grupos daidzeina (DC, DD, DM, DE)
CC	Cruza de macho control con hembra control
CM	Cruza de macho control con hembra mezquite

CD	Cruza de macho control con hembra daidzeina
CE	Cruza de macho control con hembra estradiol
MC	Cruza de macho mezquite con hembra control
MM	Cruza de macho mezquite con hembra mezquite
MD	Cruza de macho mezquite con hembra daidzeina
ME	Cruza de macho mezquite con hembra estradiol
DC	Cruza de macho daidzeina con hembra control
DD	Cruza de macho daidzeina con hembra daidzeina
DM	Cruza de macho daidzeina con hembra mezquite
LQ	Cociente lordótico
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
DAB	3-3´Diaminobencidina
ANOVA	Análisis de varianza
LM	Latencia de monta
LI	Latencia de intromisión
LE	Latencia de eyaculación
NM	Número de montas
NI	Número de intromisiones
NE	Número de eyaculaciones
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
BPA	Bisfenol A

1. INTRODUCCIÓN

La relación hombre-planta permite que los seres humanos utilicemos a las plantas como: medicinales, construcción, maderables, combustibles, ornamentales. Uno de los usos más importantes que se le da a gran variedad de plantas es para alimentación (Toledo *et al.*, 1995; Rodríguez, 2014).

El mezquite es un recurso valioso para los habitantes de zonas áridas, quienes encontraron en el múltiples beneficios, ya que es utilizado como: leña, carbón, goma, materiales para construcción, alimento, forraje, néctar para la apicultura, sombra, herramientas de trabajo, medicina y juguetes, entre otros usos (Cervantes, 1983).

1.1 Clasificación científica y descripción del Mezquite

El mezquite es un árbol o arbusto espinoso, que puede llegar a medir de 2 a 15 m de altura, de acuerdo con la profundidad del suelo. Es una leguminosa que pertenece a la familia botánica Mimosaceae (Tabla 1) (González y Velásquez, 2005).

Tabla 1. Clasificación científica de Mezquite (*Prosopis spp.*).

Clasificación Científica de Mezquite	
Reino	Plantas (<i>Plantae</i>)
Filum	Espermatofitas (<i>Spermatophyta</i>)
Clase	Dicotiledóneas (<i>Dicotyledoneae</i>)
Superfamilia	Leguminosas (<i>Leguminosae</i>)
Familia	Mimosáceas (<i>Mimosae</i>)
Género	<i>Prosopis</i>
Especie	spp. (diversas)
Nombre	<i>Prosopis spp.</i>

1.2 Distribución del Mezquite

El mezquite es originario del continente africano, donde se encuentra como una sola especie; *Prosopis africana*. A nivel mundial existen 44 especies del género *Prosopis*, 42 de las cuales se encuentran en el continente americano, distribuidas en dos grandes regiones: el norteamericano (mexicano-texano) y el sudamericano (argentino-paraguayo-chileno). El complejo norteamericano cuenta con nueve especies, su distribución comprende casi todo el territorio mexicano y es particularmente abundante en las zonas áridas y semiáridas del país (González y Velásquez, 2005). En México es abundante en los estados del centro y norte, donde

se localizan las mayores poblaciones de mezquite, en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y Guanajuato (Figura 1) (Sauceda *et al.*, 2014). Las principales especies autóctonas son: *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P. velutina*, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. palmeri* y *P. laevigata* (Figura 1) (González y Velásquez, 2005).

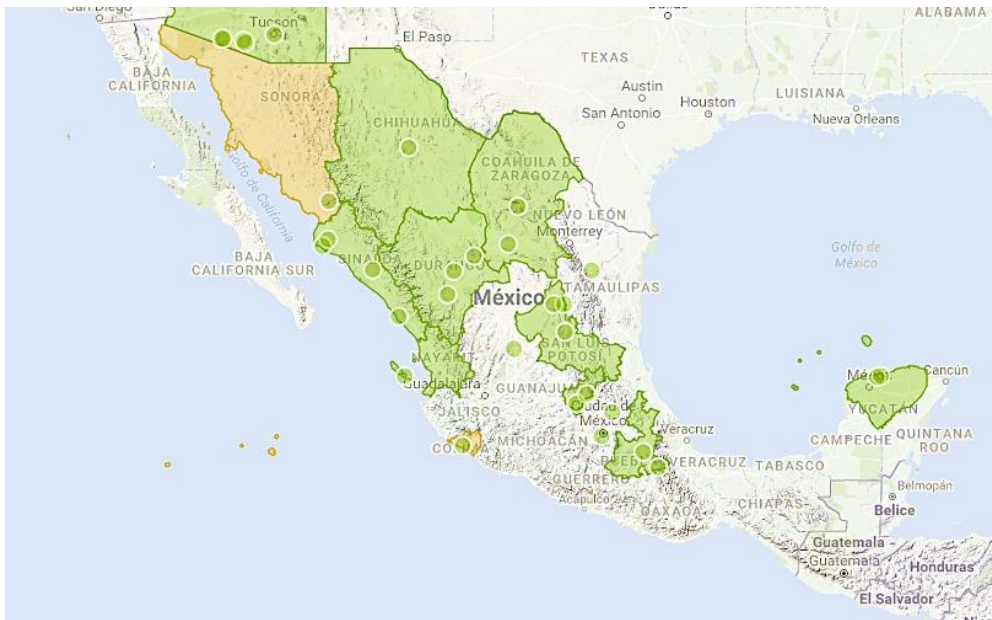


Figura 1. Distribución geográfica del mezquite (*Prosopis spp*) (color verde). Se localiza en las zonas áridas y semiáridas de México, se ha extendido en regiones áridas y semiáridas de Centro y Sudamérica, hasta Perú. Forma parte del bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, y vegetación riparia. Observaciones del mezquite (puntos verdes). Imagen tomada de (“Mezquite Naturalista,”).





1.2.1 Hábitat

El mezquite crece en climas secos muy cálidos, desde el nivel del mar hasta 1500 m de altitud, con precipitaciones de 150 a 250 mm/año, y temperaturas de 20-32°C, aunque puede encontrarse en áreas con temperaturas de hasta 48°C, con precipitaciones de 70 mm por año y hasta 10 meses de estación seca. Sus raíces penetran a grandes profundidades en busca de humedad (Cordero *et al.*, 2003).

1.2.2 Descripción, floración, fructificación y recolección

El Mezquite presenta flores en racimos de 4 a 10 cm de largo, de color amarillo verdoso: contiene vainas rectas o ligeramente curvas de 9 a 17 cm de largo, cuando maduran son de color amarillento a rojizo, con 12 a 20 semillas de color café rojizo a violáceo. Sus hojas son compuestas, pinnadas, folíolos con 12 a 15 pares por hoja de 5 a 10 mm (Tabla 2). El mezquite florece de noviembre a febrero, fructifica de febrero a abril y los frutos maduran de 7 a 9 semanas después de la floración. La recolección de las vainas maduras se puede efectuar inmediatamente después de su caída o cuando están plenamente desarrolladas, pero también pueden recolectarse verdes (Cordero *et al.*, 2003; Ruiz, 2011; López, 2014).

Tabla 2. Descripción de *Prosopis* spp. a) hoja; b) flor; c) semilla; d) fruto. Por sus características físicas el Mesquite es ampliamente adaptable y resistente a los climas áridos y semi áridos de nuestro país.

Descripción de la planta	
<p>Hojas Son compuestas bipinnadas, con 12 a 15 pares de folíolos oblongos o lineares, de 5 a 10 mm de largo, caducas en el invierno (López, 2014).</p>	<p>a)</p> 
<p>Flores Son de color amarillo verdoso, se encuentran agrupadas en inflorescencias en racimos en forma de espiga; las flores que miden de 4 a 10 cm y están situadas sobre pedúnculos (López, 2014).</p>	<p>b)</p> 
<p>Semilla Es de forma oblonga o aplastada, dura, su coloración varía desde el café claro al oscuro, según la especie (Ruiz, 2011).</p>	<p>c)</p> 
<p>Vaina o fruto Son alargadas, rectas o arqueadas, indehiscentes, de 9 a 17 cm de longitud, pueden ser planas o cilíndricas en la madurez, y contienen de 12 a 20 semillas; la cáscara o pericarpio es coriácea, de color rojizo-violáceo. La cosecha de la vaina se realiza a partir de agosto hasta el mes de octubre (Ruiz, 2011).</p>	<p>d)</p> 

1.2.3 Importancia y usos

En el norte del país se localizan dos extensas regiones consideradas como las más áridas, conocidas como desierto chihuahuense y desierto sonorense, que ocupan aproximadamente el 50% del territorio nacional. Estas zonas se caracterizan por tener condiciones climáticas extremas; altas temperaturas en primavera y verano, y bajas en invierno, las precipitaciones son pocas y generalmente ocurren en forma torrencial, lo que hace casi imposible los cultivos de temporales (Rodríguez, 2014). Las actividades principales en estas regiones son la cría de ganado bovino, caprino, ovino y equino. Sin embargo, uno de los mayores problemas para la alimentación de rumiantes en estas zonas es la disminución de la producción de forraje durante el periodo de estiaje; el resultado es un menor volumen de proteína para el animal, limitada por la baja disponibilidad de nutrientes, lo que provoca bajos rendimientos de carne por hectárea (Rodríguez, 2014).

Debido a lo anterior, las leguminosas como el Mezquite son utilizadas para aumentar el valor nutritivo de los alimentos consumidos por el ganado, puesto que las vainas contienen 30-40% de carbohidratos y 13% de proteína, mientras que las semillas contienen 65% de proteína (Cordero *et al.*, 2003; González y Velásquez., 2005; Rodríguez, 2014).

1.3 Metabolitos secundarios contenidos en el mezquite

Los productos naturales que se originan en las plantas se sintetizan a través de múltiples rutas metabólicas y se dividen en metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios se consideran esenciales y son moléculas nutricionales o estructurales (carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos). Los metabolitos secundarios, no tienen funciones nutricionales, pero son muy importantes para su supervivencia (flavonoides, taninos, lignanos, cumarinas, alcaloides, terpenos, saponinas, entre otros) (Kennedy, 2014).

Los metabolitos secundarios son compuestos que sirven para la protección de factores de estrés bióticos y abióticos, en respuesta a las presiones de depredadores, competidores, parásitos y microorganismos patógenos de tal forma que los metabolitos actúan, como defensas químicas que les permiten mantener la integridad de las plantas (Kennedy, 2014). Existen flavonoides y otros polifenoles que tienen propiedades estrogénicas, como consecuencia de su afinidad de unión directa con los receptores de estrógenos (alfa y beta) de los mamíferos. Debido a esto, a su acción estrogénica y a su origen vegetal, a estos metabolitos secundarios se les denomina “fitoestrógenos” (Kennedy, 2014; Haya, *et al.*, 2002).

1.4 Fitoestrógenos, clasificación y fuentes alimentarias

Los fitoestrógenos son un grupo de moléculas polifenólicas no esteroideas, que se encuentran presentes en una gran variedad de plantas, especialmente cereales, frutos y hortalizas. Entre estos, las leguminosas y los granos enteros al parecer son las fuentes más abundantes (Jefferson *et al.*, 2012; Lenis *et al.*, 2010).

Comparten una estructura difenólica heterocíclica común en la que se encuentran unidos grupos oxo, ceto, hidroxilo y ésteres de metilo que le dan la actividad biológica específica. Su estructura química presenta una similitud con el núcleo básico de los estrógenos, el anillo fenólico, cuya propiedad les permite unirse con los receptores de estrógenos (Díaz-Yamal y Munévar-Vega, 2009). Los principales grupos de fitoestrógenos son las isoflavonas (genisteína, daidzeína, gliciteína y formononetina) y las flavonas (luteolina), cumestanos (coumestrol), los estilbenos (resveratrol) y los lignanos (secoisolariciresinol, matairesinol, pinosresinol y lariciresinol) (Figura 2). (Jefferson *et al.*, 2012).

La mayoría de las leguminosas contienen fitoestrógenos, cuya concentración puede variar dependiendo de numerosos factores como: temperatura, humedad, luminosidad, cantidad y tipo de abono empleado, presencia de hongos, edad de la planta y estado fisiológico, estos factores son variables entre especies (Leniset *et al.*, 2010).

Isoflavonoides o isoflavonas: Los compuestos más representativos de este grupo son la genisteína, la daidzeína y la gliceteína (Navarro y Beltrán, 2000). 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 transportadas y absorbidas a través del epitelio intestinal (Bonilla, 2004). La principal fuente de estas sustancias son las bayas, los vinos, los cereales, los frutos secos, las leguminosas y las semillas de soya (Patisaul y Jefferson., 2010).

Flavonoides: Son un grupo aromático de pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno, se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las flores y frutos. Por ende, se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos, entre otros (Escamilla *et al.*, 2009). En este grupo se encuentra la naringenina, que fue caracterizada como un fitoestrógeno potente al utilizarlo en un modelo de rata ovariectomizada (Zierau *et al.*, 2008).

Lignan: El secoisolariciresinol es el principal representante de este grupo. Se encuentra presente en diversas plantas destinadas a la alimentación como la linaza (*Linum usitatissimum*), el girasol (*Helianthus annuus*), el sésamo (*Sesamum indicum*) y las semillas de calabaza (cucurbitáceas) (Navarro y Beltrán, 2000).

Cumestanos: El más conocido es el coumestrol, aislado de diferentes especies vegetales entre las que destacan el trébol (*Trifolium*), la alfalfa (*Medicago sativa*), y la col (*Brassica oleracea*) (Navarro y Beltrán, 2000).

Micotoxinas: El principal representante de este grupo es la zearalonona, molécula presente en el maíz en diferentes concentraciones. Aunque existe poca información bibliográfica con respecto a los efectos producidos por su consumo, se sabe que puede altera la función reproductiva (Malekinejad *et al.*, 2007).

Derivados del resorcinol: El más sobresaliente es el resveratrol, que se encuentra principalmente en la cáscara de las uvas, el maní y en las frutas tipo bayas (Navarro y Beltrán, 2000).

Como leguminosa, el mezquite contiene diferentes tipos de fitoestrógenos como: el mequitol, localizado principalmente en el tronco y la vaina, cuya concentración aproximada es de 6 $\mu\text{g/g}$ (Sirmah *et al.*, 2009), quercetina, isoharmnetina (Prabha, *et al.*, 2014), luteolina y vitexina (Harzallah-Skhiri y Ben Jannet., 2005), a una concentración total aproximada es de 1 g/L (Prabha *et al.*, 2014). También se han detectado concentraciones de daidzeína (5.27 $\mu\text{g/g}$) y genisteína (6.025 $\mu\text{g/g}$) en el extracto de la vaina del mezquite (González *et al.*, 2015).

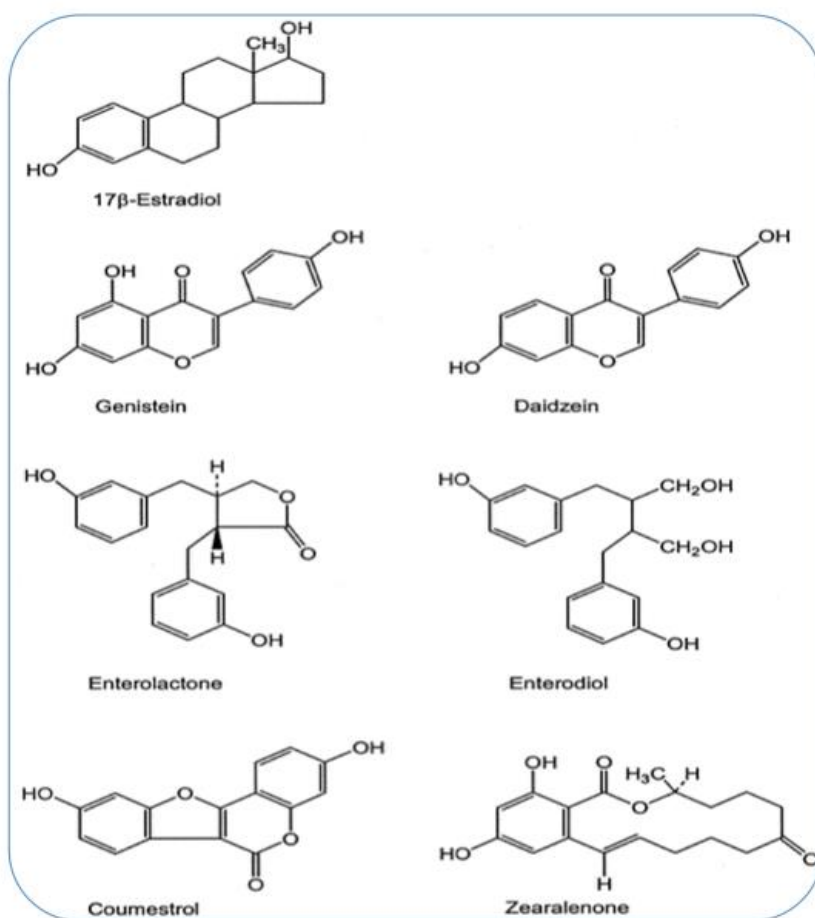


Figura 2. Núcleo estructural de los principales compuestos fitoestrogénicos. Se observa que los fitoestrógenos son estructuralmente similares al estradiol, por lo que tienen la capacidad de imitar sus efectos (Belcher y Zsarnovszky., 2001).

1.4.1 Mecanismo de acción de los fitoestrógenos

Debido a la similitud en la estructura química de los fitoestrógenos con el 17-beta estradiol (E_2), los fitoestrógenos se comportan imitando la acción del E_2 , ya que poseen la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos (RE) (Duffy *et al.*, 2007; Sirtori *et al.*, 2005). Sin embargo, la afinidad de los RE para los fitoestrógenos es mucho menor 1×10^{-3} a 1×10^{-4} que para el estradiol. Existen dos subtipos de los receptores para estrógenos, los receptores estrogénicos tipo α (RE α) y los receptores tipo β (RE β), ambos receptores están codificados por diferentes genes, que se distinguen por presentar diferencias en su secuencia de aminoácidos y tienen una expresión tisular separada, así como en sus acciones fisiológicas (Attia y Ederveen, 2012; Pérez-Rivero, *et al.*, 2007).

Los RE son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, estos receptores se localizan en el citoplasma y al unirse a su ligando, dimerizan y traslocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción. Los receptores de hormonas esteroides comparten una estructura similar, que consiste en un dominio carboxi-terminal de unión al ligando (LBD: dominio de unión al ADN), una región localizada en el centro de la estructura capaz de unirse al ADN (DBD) y un dominio amino-terminal (NTD) requerido para la completa actividad transcripcional del receptor (Figura 3) (Pérez-Rivero *et al.*, 2007; Bottino y Lanari, 2010).

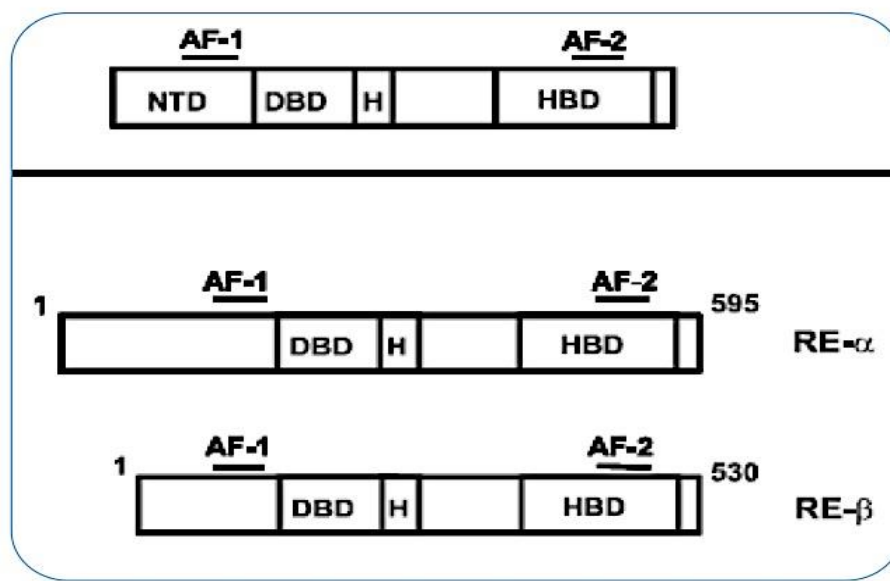


Figura 3. Estructura de los dos receptores de estrógenos RE α y RE β . HBD: dominio carboxi-terminal de unión al ligando, DBD: dominio de unión al ADN, región bisagra (H) y un dominio aminoterminal NTD. Presentan 2 funciones activadoras (AF) AF-1 y AF-2. (Bottino y Lanari., 2010).

Los estrógenos presentes en el plasma penetran en sus células blanco en los tejidos llamados “clásicos”, que se encuentran en el útero, la glándula mamaria, la placenta, el hígado, SNC, el sistema cardiovascular y el hueso. Las células blanco de estos tejidos presentan abundantes RE α . Existen otros tejidos considerados “no clásicos”, en los que la presencia de RE α es relativamente menor, pero que contienen cantidades significativamente mayores de RE β . Entre estos últimos se encuentran la próstata, ovarios, testículos, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, suprarrenales, páncreas, vesícula biliar, piel, tracto urinario, tejido linfoide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal, y algunas regiones del cerebro, como el hipotálamo, cerebelo y lóbulo olfatorio (Pérez-Rivero *et al.*, 2007).

La unión de los estrógenos a sus receptores específicos activa dos tipos diferentes de vías de señalización: la vía no genómica y la genómica. El modo de acción “no-genómico” del estrógeno es un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas para poder producir su efecto primario, por esta razón debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana. Los RE asociados a la membrana plasmática que median la vía de señalización no genómica pueden conducir a alteraciones citoplasmáticas para la regulación de la expresión de genes (Marino *et al*, 2006).

En la vía genómica, los estrógenos se unen a los RE en el núcleo, induciendo un cambio conformacional en los receptores que causan la disociación de las proteínas chaperonas, la dimerización y la activación del dominio transcripcional del receptor (Marino *et al.*, 2006). La interacción de los RE con E₂ conduce a la activación transcripcional de los genes asociados mediante el reclutamiento de coactivadores y componentes de la maquinaria transcripcional basal (Figura 4) (Marino *et al*, 2006).

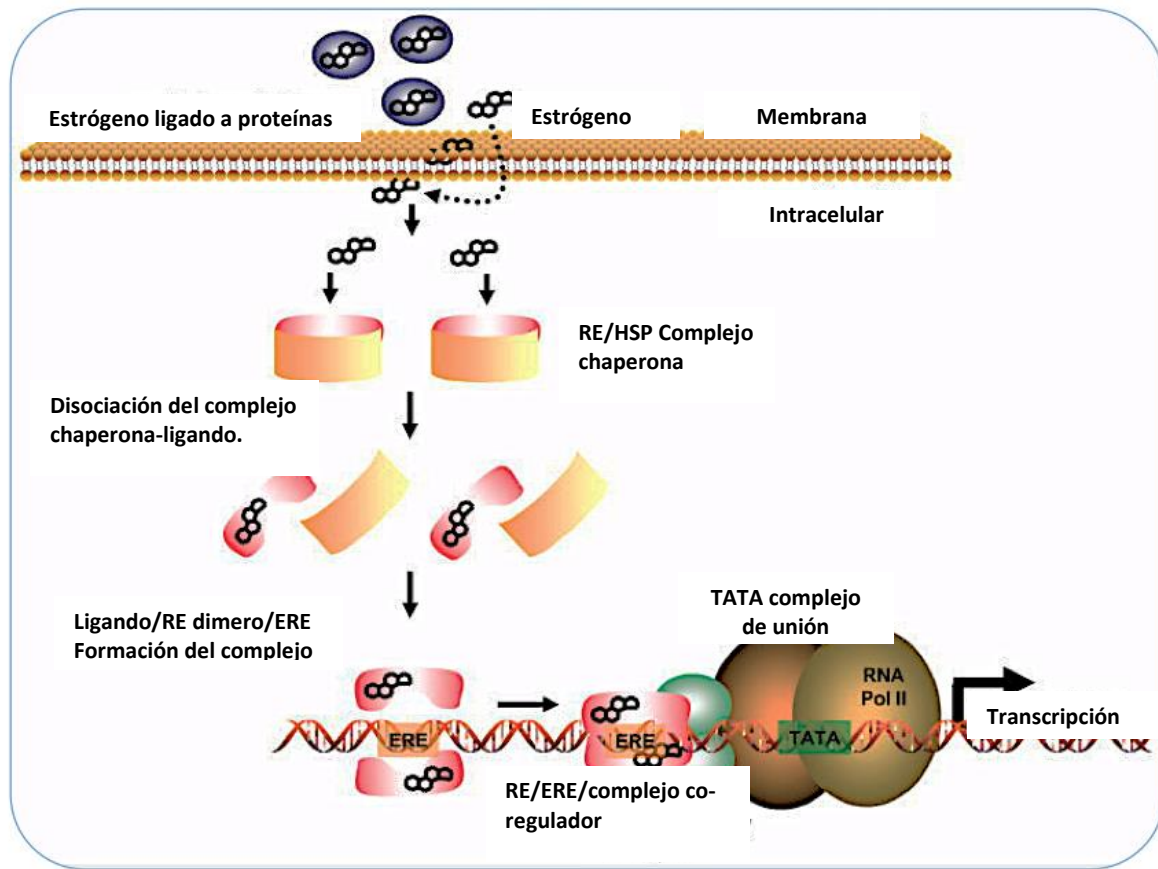


Figura 4. Interacción del estradiol con su receptor. Se muestra el mecanismo del receptor nuclear a estrógenos (RE) mediado por su ligando. La unión al ligando induce un cambio conformacional del receptor que conduce a la disociación de un complejo de proteínas. La unión del complejo ligando / receptor, da como resultado el reclutamiento de complejos co-reguladores para el promotor que modifica la transcripción del gen diana (Belcher, 2008).

Los fitoestrógenos actúan sobre una gran diversidad de tejidos alterando múltiples funciones fisiológicas, tanto en machos como en hembras, por lo tanto, estos compuestos pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos en los tejidos que expresan RE (Patisaul, 2005).

1.5 Efectos de los fitoestrógenos en la salud

El consumo de algunos alimentos con alto contenido de fitoestrógenos, como la soya, puede generar efectos benéficos en la salud. Muchos estudios indican que estos compuestos reducen el riesgo de cáncer de mama, previenen las enfermedades cardiovasculares, pueden detener la progresión de la aterosclerosis y ejercen efectos positivos en las mujeres posmenopáusicas (Woclawek-Potocka *et al.*, 2013).

Por otra parte, existen estudios que demuestran efectos perjudiciales de los fitoestrógenos sobre la fisiología reproductiva de los mamíferos (Patisaul, 2005). Por esta razón, estos compuestos son considerados como disruptores endocrinos, que son sustancias químicas exógenas con actividad hormonal, capaces de alterar la homeostasis endocrina por similitud, por afinidad hormonal, por antagonismo, por interferencia fisiológica o por modificación de receptores específicos, causando efectos adversos a la salud del organismo intacto o a su progenie (González y Velásquez, 2005). La primera evidencia de que los fitoestrógenos naturales podrían causar trastornos reproductivos en mamíferos fue observada en 1946 por Bennetts y colaboradores, quienes reportaron que la ingestión de trébol rojo (*Trifolium pratense*) el cual es rico en fitoestrógenos como isoflavonas formononetina, biochanina A y genisteína, causó la infertilidad en el ganado ovino. Posteriormente, resultados similares fueron reportados en vacas que presentaban trastornos en la fertilidad producidos por el consumo de trébol rojo (Woclawek-Potocka *et al.*, 2013).

1.5.1 Fitoestrógenos en el desarrollo fetal

Durante la gestación, el feto está expuesto a sustancias presentes en el suero materno que pueden atravesar la placenta. Aunque en teoría la placenta sirve como una barrera para proteger al feto de la exposición a productos químicos nocivos, la mayoría de los medicamentos y productos químicos ambientales entran a la circulación fetal, ya sea por difusión pasiva o por transporte activo. Las proteínas del suero materno son un importante modificador de la exposición fetal. Tal es el caso de la proteína humana fijadora de hormonas esteroideas (SHBG), la cual tiene alta afinidad por los fitoestrógenos, por lo que la exposición del feto a ellos está directamente relacionada con el nivel de esta proteína en el suero materno. La contraparte fetal a la albúmina sérica es la α -fetoproteína (AFP), constituyente principal del suero fetal. En los roedores, la AFP se une de manera eficiente al estradiol y también podría servir para proteger al feto de sus efectos sobre el desarrollo. Sin embargo, la AFP humana no se une al estradiol y ninguno de los tipos de esta proteína se une a los fitoestrógenos, por lo que su presencia en suero fetal humano no es protectora (Jefferson *et al.*, 2012).

Se ha detectado genisteína y daidzeína en el líquido amniótico de mujeres, durante el segundo trimestre del embarazo en niveles similares a los observados en el suero de adultos, en concentraciones 10 a 20 veces mayores que los niveles de estradiol en el líquido amniótico promedio en esa época del embarazo (Jefferson *et al.*, 2012).

1.5.2 Exposición fetal a disruptores endocrinos

El crecimiento y desarrollo fetal e infantil constituyen los periodos de mayor plasticidad celular y dependen en gran medida del ambiente intrauterino y posnatal en que se desenvuelve el individuo, por lo que la exposición materna a diferentes perturbaciones durante el embarazo y la lactancia tiene consecuencias adversas en la descendencia, debido a que el eje reproductivo es sumamente susceptible a las distintas influencias ambientales (Guzmán y Zambrano, 2007).

Diversas alteraciones clínicas en animales y humanos han sido asociadas con la exposición prenatal a compuestos fitoestrogénicos de origen natural presentes en los alimentos. Al ser consumidos durante periodos críticos del desarrollo afectan la fisiología normal del eje reproductivo, causando cambios a diferentes niveles del eje hipotálamo–hipófisis–gónada. Los fitoestrógenos pertenecen al grupo de los disruptores endocrinos (DE), son sustancias químicas exógenas con actividad hormonal y que tienen la capacidad de alterar la homeostasis endocrina de los organismos (Jefferson y Williams, 2011; Guzmán y Zambrano, 2007). Durante la gestación, el feto puede estar expuesto a diferentes DE por vía transplacentaria; el transporte placentario de sustancias de la madre al feto y del feto a la madre, en humanos se establece alrededor de la quinta semana de vida embrionaria (Guzmán y Zambrano, 2007).

1.5.3 Funciones de la placenta

La placenta ejerce diversas funciones, la principal es el intercambio fisiológico entre la madre y el feto, siendo el intercambio gaseoso la función primordial de este

órgano, seguida por la absorción de nutrientes y la excreción de productos de desecho. Los diferentes componentes de este intercambio son transportados por difusión simple (O₂ y CO₂), difusión facilitada y mediante transporte activo altamente selectivo. Estos pueden variar entre distintos mamíferos, siendo la difusión pasiva el tipo de transporte que adquiere mayor relevancia en roedores (Roa *et al*, 2012). En general, las sustancias que atraviesan con facilidad la placenta son las de bajo peso molecular (menor a 990 D), las sustancias con baja polaridad y las sustancias lipofílicas (Solís *et al.*, 2001).

Los fitoestrógenos están presentes en el líquido amniótico formando parte del ambiente fetal humano a partir del segundo trimestre del embarazo y, debido su bajo peso molecular (genisteína 270.24 D y daidzeína de 254.24 D), tienen la capacidad de atravesar la barrera placentaria.

1.5.4 Etapas sensibles del desarrollo

El feto y el neonato son muy susceptibles a la exposición a sustancias ambientales, ya que la organogénesis, el rápido crecimiento y la diferenciación de tejidos, ocurre durante estos periodos del desarrollo; además los mecanismos de procesamiento y eliminación metabólicos son inmaduros, por lo tanto, la desintoxicación es ineficiente. Aunado a lo anterior, muchos procesos del desarrollo son dependientes de hormonas esteroides, por ejemplo: la determinación del sexo fenotípico, el cual es mediado por la presencia o ausencia de testosterona y dihidrotestosterona; las hormonas también determinan diferencias sexuales en el comportamiento de los individuos, se ha demostrado que con independencia del

sexo genético el tratamiento hormonal masculiniza o feminiza áreas del SNC, que controlan el comportamiento sexual, debido a que las hormonas organizan los tejidos relacionados con el control de la reproducción en ciertas etapas del desarrollo, esta actividad hormonal (Carrasco *et al*, 2010). puede ser alterada por la acción de los fitoestrógenos; estos efectos tienen consecuencias en la fisiología de algunos parámetros reproductivos en ambos sexos de roedores y humanos (Jefferson *et al*, 2012). Por lo anterior, estos compuestos pueden afectar las funciones de los tejidos blancos en la vida adulta. Los fitoestrógenos también pueden ser transferidos a través de la leche materna al recién nacido, generando alto riesgo de alteraciones en los tejidos inmaduros sensibles a estrógenos, tales como los del tracto reproductivo (Carrasco *et al*, 2010).

1.6 Diferenciación sexual cerebral

La diferenciación sexual cerebral en la rata y en el humano ocurre durante el periodo prenatal, debido a que ciertas áreas del SNC, poseen receptores a hormonas gonadales durante la vida fetal. El proceso conocido como diferenciación sexual cerebral, se lleva a cabo por la secreción de testosterona (T) por parte del testículo fetal, donde las células de Leydig fetales sintetizan T, ésta se une a sus receptores y determina en parte la estructura final de ciertas áreas del SNC relacionadas con la reproducción (Jorge-Rivera, 1998). En el hipotálamo, la T es aromatizada a E₂, mediante la enzima aromatasa (P450), por lo que es el E₂ el responsable de la diferenciación del cerebro masculino (Herrera *et al*, 1981).

El dimorfismo sexual se refiere principalmente a diferencias en la forma y el tamaño de los núcleos cerebrales entre machos y hembras, que son mediados por el E₂ y que son capaces de establecer estructuras sexualmente dimórficas en etapas tempranas del desarrollo (Herrera *et al*, 1981). Estas diferencias neuroanatómicas están asociadas al sexo (macho o hembra), preferencia sexual, o transexualismo para la identidad de género. La mayoría de los circuitos dimórficos del cerebro están íntimamente relacionados con el hipotálamo (Jorge-Rivera, 1998).

1.6.1 Disfunción sexual hipotalámica

El hipotálamo regula patrones de hambre, sed, sueño, temperatura del cuerpo y conducta sexual. La mayoría de los circuitos dimórficos del cerebro forman parte del hipotálamo o están íntimamente relacionados con él. Los receptores a hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progesteronas) en el cerebro se encuentran en el hipotálamo (Jorge-Rivera, 1998).

En el cerebro de machos y hembras existen importantes diferencias anatómico-funcionales; por ejemplo, en la rata macho, el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (NDS-POA) es seis veces más grande que en la hembra, mientras que en el núcleo ventromedial y arqueado de la hembra son más abundantes las conexiones sinápticas que en los machos. Las gónadas juegan un papel crucial, ya que la secreción de hormonas esteroides en una fase específica del desarrollo del SNC, llamado “periodo crítico” es capaz de ejercer cambios morfoanatómicos, bioquímicos y fisiológicos que dan lugar a modificaciones permanentes y a establecer estructuras sexualmente dimórficas. En mamíferos

domésticos y de laboratorio, así como en otras especies, el E₂ es la hormona que dirige o provoca la diferenciación sexual del SNC, a través de mecanismos como la neurogénesis, apoptosis y diferenciación o funcionalidad de las células involucradas (Herrera *et al*, 2005).

1.6.2 Núcleo ventromedial del hipotálamo

El núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM) regula la conducta sexual de las hembras. Las hembras expresan receptividad sexual por medio de una respuesta refleja que se conoce como lordosis, esta conducta de receptividad sexual está mediada por altos niveles de estrógenos y progesterona; de lo contrario, la hembra rechaza los acercamientos sexuales del macho. El dimorfismo sexual del NVM, no se debe a diferencias en cuanto al tamaño o densidad del núcleo, sino a la complejidad estructural de las neuronas. En los machos la densidad sináptica en este núcleo es mayor que en las hembras, y el número de contactos sinápticos en la hembra varía a través del ciclo estral, existiendo un mayor número de sinapsis y de espinas dendríticas durante el proestro que en el diestro. El dimorfismo del NVM está claramente controlado por las hormonas sexuales, y en el caso de las hembras es regulado a lo largo de los ciclos hormonales (Herrera *et al*, 2005; Jorge-Rivera, 1998).

1.6.3 Área preóptica

El área preóptica (APO) o también llamado núcleo sexualmente dimórfico del área preoptica del hipotálamo (SDN-POA), ha sido considerada como el sitio donde reside

el mecanismo de regulación diferencial de las características dimórficas relacionadas con el sexo, incluyendo el control de la conducta sexual masculina, la liberación cíclica de gonadotrofinas y el mecanismo necesario para la ovulación. En humanos el SDN-POA se conoce como el núcleo intersticial del hipotálamo anterior-1 (NIHA-1 o INAH-1, por sus siglas en inglés) (Herrera *et al*, 2005; Jorge-Rivera, 1998).

2. ANTECEDENTES

2.1 Fitoestrógenos y su interacción con los RE

Se ha reportado que los fitoestrógenos se comportan imitando la acción de los estrógenos debido a que pueden unirse a los RE α y RE β , a causa de una característica química particular, la posición de los grupos hidroxilo que contienen estos compuestos (Lenis, *et al*, 2010).

Existen estudios que demuestran que los fitoestrógenos alteran la expresión de otros receptores celulares importantes en la reproducción, como los de la oxitocina, la T, la prolactina y que pueden influir de manera negativa en los folículos ováricos, ya que interactúan con los RE presentes en forma abundante en las células de la granulosa, disminuyendo el efecto de los estrógenos sobre el desarrollo folicular. Los fitoestrógenos también afectan la funcionalidad de diversos órganos reproductivos en machos debido a que los RE se expresan en diferentes tejidos del aparato reproductor masculino, como son los testículos, los conductos eferentes, el epidídimo, los conductos deferentes, la próstata, así como en las células de Sertoli, las espermatogonias y los espermatoцитos (Lenis, *et al*, 2010).

2.2 Alteraciones reproductivas por el consumo de forrajes con fitoestrógenos

El efecto disruptor endócrino de los fitoestrógenos se reportó en 1946 al presentarse tasas anormalmente altas de infertilidad, aborto y anomalías reproductivas, en corderos y ovejas que habían consumido trébol rojo (*Trifolium pratense*), rico en fitoestrógenos (Cumestrol e isoflavonas: genisteína, daidzeína y biochanina). Este síndrome se denominó "enfermedad del trébol" (Adams, 1995).

En vacas y ovejas que fueron alimentadas con forraje de alfalfa seca la cual contiene coumestrol (68.8 mg/kg de peso), se observó bajo desarrollo de la glándula mamaria, edema vulvar, descarga de moco cervical, engrosamiento del útero, deterioro de la función ovárica, tasas de concepción reducidas y mayor pérdida embrionaria. Los machos fueron menos afectados, pero las glándulas mamarias de las hembras y machos desarrollaron hipertrofia epitelial en los conductos, acompañada de secreción (Adams, 1995).

2.3 El consumo de fitoestrógenos durante la gestación

El periodo prenatal y postnatal temprano es una fase muy crítica en la que el estradiol realiza cambios estructurales y bioquímicos en el hipotálamo de hembras y machos; en este periodo se define el tamaño de los núcleos cerebrales de cada sexo, dando como resultado un conjunto de diferencias morfológicas, bioquímicas y conductuales, lo que genera el dimorfismo sexual en el SNC de ambos sexos, durante las etapas tempranas del desarrollo (MacLusky y Naftolin, 1981; Yu *et al*, 2013). Por esta razón su asociación con la gestación y la exposición temprana a

estos compuestos ha generado interés en el campo de la investigación, debido a que la organogénesis, el rápido crecimiento y la diferenciación de tejidos ocurre durante los periodos críticos del desarrollo (etapa prenatal y neonatal). Por lo tanto, las pequeñas perturbaciones en estas etapas pueden tener consecuencias importantes a largo plazo (Jefferson *et al*, 2012; Jarrell *et al*, 2012).

En mujeres embarazadas, los fitoestrógenos se han identificado en el líquido amniótico y en la sangre de madres durante el embarazo (Jarrell *et al.*, 2012); un ejemplo de ello es la genisteína y daidzeína. Estos compuestos se han identificado en mujeres embarazadas durante el segundo trimestre de la gestación, en niveles 10 a 20 veces mayores que los niveles de estradiol presentes en el líquido amniótico de manera normal (Jefferson *et al.*, 2012). Se ha reportado que la exposición a compuestos químicos estrogénicos como la daidzeína y su metabolito el equol, durante la vida fetal interrumpe el desarrollo del tracto reproductivo femenino, mediante la alteración de la expresión de genes que codifican proteínas de señalización, las cuales son críticas para dirigir ese proceso (Yu *et al*, 2013).

2.4 Efecto de los fitoestrógenos en la etapa prenatal

Los fetos de roedores y humanos se encuentran expuestos a altas concentraciones de equol a través de la dieta materna con altas concentraciones de fitoestrógenos durante la gestación y después del parto. El equol [7-hidroxi-3- (4'-hidroxifenil) -cromano], es un isoflavandiolo metabolizado a partir de la daidzeína, es producido por bacterias intestinales en respuesta a la ingesta de isoflavonas de soya,

y está reportado que tiene mayor actividad hormonal que su precursor, al competir con el E₂ por unirse a receptores citosólicos (Setchell y Clerici, 2010).

En roedores, la exposición prenatal al equol puede afectar a los fetos y alterar los comportamientos tales como la exploración, la ansiedad, la agresividad, la sociabilidad, el aprendizaje espacial y la memoria, debido a que el periodo prenatal y postnatal temprano es una fase muy crítica en la que el estrógeno esculpe el tamaño de los núcleos cerebrales relacionados con la conducta sexual en hembras y machos. La exposición perinatal a la daidzeína puede alterar también la expresión de RE en los adultos, por lo que los fitoestrógenos también pueden tener efectos organizacionales e inducir efectos a largo plazo (Yu *et al*, 2013).

La exposición neonatal a los flavonoides causa efectos negativos directos e indirectos en el tracto reproductivo de las ratas hembras, como infertilidad, aborto, cornificación vaginal persistente, folículos ováricos hemorrágicos, senescencia prematura reproductiva y fertilidad comprometida (Jefferson *et al*, 2012). Otros estudios realizados en ratones hembra adultas muestran que la exposición materna a la daidzeína masculiniza el comportamiento social en la descendencia femenina, debido a la reducción de RE en el núcleo cama de la estría terminal (BST) y en la amígdala medial (MEA) (Yu *et al*, 2013).

Ratas Sprague-Dawley fueron expuestas perinatalmente (desde el día 7 de gestación hasta el día 13 postnatal) a una mezcla de 12 fitoestrógenos que consistió principalmente en lignanos, e isoflavonas como genisteína y daidzeína, en dosis de 1, 10 o 100 veces el consumo de la población humana, se observaron efectos adversos persistentes en las hembras y machos. Los machos recién nacidos

presentaron distancia anogenital reducida, glándulas mamarias con hipertrofia, y niveles de T alterados en la etapa adulta, lo que indica acción anti-androgénica. Las hembras presentaron aceleración de la apertura vaginal, distancia anogenital reducida en hembras recién nacidas y niveles séricos de E₂ disminuidos en la etapa adulta (Boberg *et al*, 2013).

Otros datos experimentales indican que la exposición materna a los compuestos estrogénicos durante el periodo neonatal / perinatal, puede aumentar el riesgo de hipospadias. La hipospadias es un defecto congénito que se produce cuando el orificio uretral se encuentra en la parte ventral del pene, es ocasionada al interferir con la producción o la acción de los andrógenos fetales, que son críticos para el cierre normal de la uretra. Por ello, existe un riesgo 4 veces mayor de sufrir hipospadias entre los niños nacidos de madres que tienen una mayor ingesta de fitoestrógenos en las dietas vegetarianas, dadas sus propiedades estrogénicas (Carmichael *et al*, 2013).

2.5 Efectos estrogénicos del extracto de la vaina de mezquite

En un estudio donde se evaluaron parámetros reproductivos y la fertilidad en ratas macho y hembra tratados con el extracto de la vaina de mezquite, se observó, la disminución de la conducta sexual, menor peso testicular y glandular, así como disminución de la motilidad, la viabilidad y la concentración espermática. Después de la cópula, las hembras tratadas con el extracto de mezquite tuvieron un número menor de crías que las hembras control. A pesar de la baja calidad espermática, la

fertilidad de los machos tratados con el extracto pareció no estar perturbada, ya que fueron capaces de fecundar a hembras control (Retana-Márquez *et al.*, 2016).

Estos estudios indican que la exposición a compuestos con actividad estrogénica puede contribuir a ciertas anomalías observadas actualmente en seres humanos y animales, y que la exposición a largo plazo a bajas dosis puede ser particularmente perjudicial (Flynn *et al.*, 2000).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las zonas áridas y semiáridas de nuestro país, la escasez de alimentos de buena calidad inicia en noviembre y termina de mayo a junio, por lo que uno de los mayores problemas para la alimentación del ganado en esas zonas es la disminución de la producción de forraje. El resultado es un menor volumen de proteína para el animal, lo que ocasiona bajos rendimientos de carne por hectárea. Por lo anterior resulta de primordial importancia el uso de otras fuentes de forrajes con alto valor proteínico como es el mezquite (Rodríguez, 2014).

Sin embargo, debido a que el mezquite contiene ciertas cantidades de fitoestrógenos, su consumo en elevadas cantidades podría ocasionar efectos nocivos en la salud reproductiva de los animales en desarrollo, dado que el eje reproductivo es altamente sensible a las acciones hormonales en el periodo prenatal y neonatal.

4. JUSTIFICACIÓN

El consumo de forrajes con alto contenido de fitoestrógenos (como lo es la vaina del mezquite) por animales de pastoreo, se asocia a alteraciones reproductivas, sobre todo en rumiantes, los cuales poseen una amplia importancia económica en la ganadería de nuestro país (Lenis *et al*, 2010).

En la actualidad se desconoce si la fertilidad se ve afectada por el consumo de forrajes, como la vaina de mezquite y menos aún si se pudiera alterar la fisiología reproductiva de la descendencia en la vida adulta, puesto que los organismos en desarrollo suelen ser muy sensibles a los efectos de sustancias químicas en comparación con los adultos y la morfogénesis y la diferenciación de tejidos y de órganos importantes para la función reproductiva que se presenta antes y después del nacimiento (Jefferson *et al*, 2012; Lenis *et al*, 2010).

Este tipo de estudios podrían proporcionar evidencia de que la exposición de los animales en desarrollo a los fitoestrógenos afecta negativamente la reproducción en la etapa adulta, además, nuestro modelo animal nos permite de una manera controlada, determinar los mecanismos implicados en la respuesta fisiológica observada. Así mismo el estudio permite la identificación de estos mecanismos que son la clave en la prevención de alteraciones, reproductivas y metabólicas, en los estadios tempranos del desarrollo.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del extracto de la vaina de mezquite (*Prosopis juliflora*) en la fisiología reproductiva de ratas hembra y macho adultas expuestas prenatalmente a este extracto? ¿Estos efectos serán similares a los causados por el fitoestrógeno daidzeína?

6. HIPÓTESIS

La administración prenatal del extracto de la vaina de mezquite afectará diversos aspectos de la fisiología reproductiva en la descendencia femenina y masculina en la etapa adulta.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Evaluar los efectos en la etapa adulta sobre diversos parámetros reproductivos en ratas hembra y macho, tratadas prenatalmente con el extracto de la vaina de mezquite.

7.2 Objetivos particulares

- Evaluar si la exposición prenatal al extracto de la vaina de mezquite altera la fisiología reproductiva de la descendencia femenina y masculina en la etapa adulta.
- Comparar los efectos del extracto de la vaina de mezquite con los del fitoestrógeno daidzeína.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

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

8.1 Diseño experimental

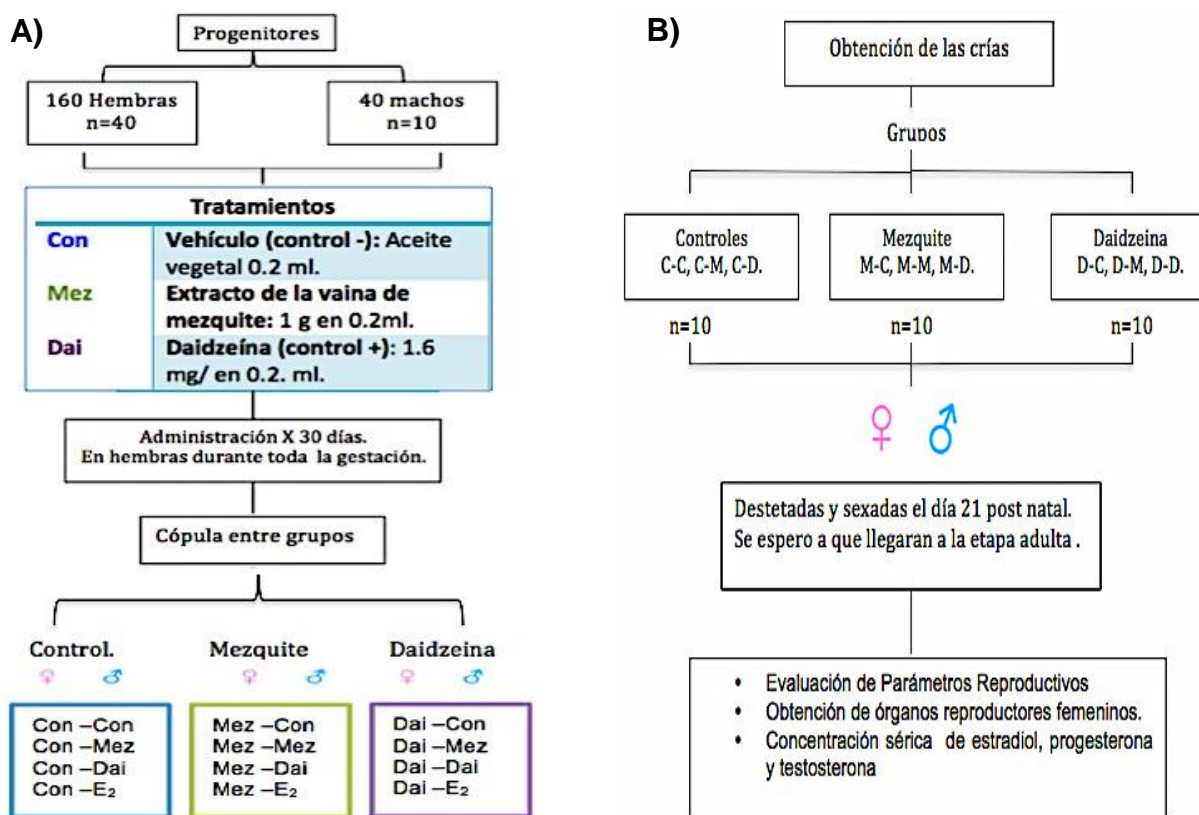


Figura 5. Diseño experimental. A) Administración de los tratamientos a los progenitores en los grupos experimentales (Control, mezquite y daidzeína), B) obtención de la descendencia y formación de los grupos experimentales (n=10 cada uno); la evaluación de los parámetros reproductivos y la obtención de las muestras de hembras y de machos adultos expuestos prenatalmente a los tratamientos.

8.2 Animales de laboratorio

Se utilizaron 120 ratas hembra de la cepa Wistar (*Ratus norvegicus albinus*), de 2.5 meses de edad con un peso corporal entre los 200 a 250 g de peso corporal y 30 ratas machos adultos sexualmente expertos de 3 meses de edad con 300 g de peso corporal, producidas en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Se mantuvieron separados por sexo en grupos de 10 animales en cajas de plexiglás transparente tamaño jumbo (50 X 30 X 20 cm), bajo condiciones habituales de bioterio, en un cuarto con temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), con ciclo invertido de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (luz se apaga a las 10:00 h), con agua y alimento ad libitum ("2018 Teklad global" de Harlan Laboratories).

8.3 Obtención del extracto de la vaina del mezquite

La vaina de mezquite madura se recolectó en la Huasteca Hidalguense durante los meses de junio y julio. Ésta se secó en horno a 60°C durante 24 h y posteriormente se molieron tanto la vaina como las semillas en un molino con mallas de 5 y 1 mm de diámetro. De 2.0 kg del fruto molido se preparó un extracto total hasta agotamiento; en extractores tipo Soxhlet con etanol-agua 4:1 v/v. El etanol del extracto fue retirado por destilación entre 78°C y 87°C , quedando un concentrado acuoso.

8.4 Grupos experimentales:

Los animales (machos y hembras) se asignaron aleatoriamente a uno de tres grupos experimentales (Tabla 3): 1) Control (CON); 2) Extracto de vaina de mezquite

(MEZ) y 3) Daidzeína (DAID). Cada grupo de machos se formó por 10 ejemplares, mientras que los grupos de hembras se formaron por 40 (n=10 machos/grupo; n=40 hembras/grupo) y posteriormente se registró el peso corporal de todos los animales de cada grupo experimental.

Tabla 3. Grupos de progenitores (machos n=10 y hembras n=40 por tratamiento) y sus tratamientos correspondientes (Vehículo, extracto del mezquite y daidzeína). control (CON), extracto de la vaina de mezquite (MEZ), daidzeína (DAID).

Grupo Experimental	Tratamientos	Dosis
1. CON	Vehículo (Control negativo)	Aceite (0.2 mL/día)
2. MEZ	Extracto de vaina de mezquite	Extracto (1g/0.2 mL/día).
3. DAID	Daidzeína (Sigma-Aldrich, pureza >97%)	Daidzeína (1.6 mg/0.2mL/día).

Al grupo vehículo se le administró aceite vegetal (0.2 mL/día). Al grupo extracto de vaina de mezquite, se les administró 1 g/0.2 ml/día; esta dosis equivale al consumo diario de mezquite en borregos, que es de 3.5 g/kg/día (Retana-Márquez *et al.*, 2012). Al grupo Daidzeína (Sigma, pureza >97%), se le administró 1.6 mg/0.2mL/día. Esta dosis se seleccionó de acuerdo con la dosis utilizada en otros estudios y que se ha reportado produce efectos fisiológicos, tales como disminución de niveles hormonales y respuesta eréctil en macho (Pan *et al.*, 2008), así como alteraciones en el ciclo estral de las ratas hembras (Retana-Márquez *et al.*, 2012).

La administración de los tratamientos en los machos y en las hembras se realizó por vía subcutánea, en la fase oscura, a las 8:00 am y durante 30 días consecutivos. Al término de los 30 días, las hembras en la etapa de proestro y los machos de cada grupo experimental se pusieron en contacto para que se llevara a cabo la cópula (Figura 6).

Cruzas de los progenitores

Obtención de la descendencia

<p>Macho Control – Hembra Control Macho Control – Hembra Mezquite Macho Control – Hembra Daidzeína</p>	<p>Grupo CC Grupo CM Grupo CD</p>	<p>GRUPOS CONTROLES (CON) n=10</p>
<p>Macho Mezquite – Hembra Control Macho Mezquite – Hembra Mezquite Macho Mezquite – Hembra Daidzeína</p>	<p>Grupo MC Grupo MM Grupo MD</p>	<p>GRUPOS MEZQUITE (MEZ) n=10</p>
<p>Macho Daidzeína – Hembra Control Macho Daidzeína – Hembra Mezquite Macho Daidzeína – Hembra Daidzeína</p>	<p>Grupo DC Grupo DM Grupo DD</p>	<p>GRUPOS DAIDZEINA (DAID) n=10</p>

Figura 6. En el esquema se muestran las cruzas realizadas entre los grupos de progenitores, donde las hembras en proestro, fueron puestas en contacto con machos sexualmente expertos, para que se realizara la cópula, y así obtener a la descendencia de hembras y machos de cada cruce con la finalidad de formar los grupos (n=10) experimentales.

Los machos eyacularon dos veces con el fin de asegurar que las hembras quedaran preñadas. El día de la cópula se consideró el día cero de la gestación. Durante toda la gestación se continuó con la administración de los tratamientos en las hembras, de acuerdo con el grupo experimental que les corresponde. Los tratamientos finalizaron un día antes del parto. Al nacimiento, se contabilizaron y pesaron a las crías de cada grupo. En el día 22 post natal las crías fueron sexadas y se separaron hembras de machos, para se mantuvieron en cajas de acrílico y posteriormente separadas al azar en distintos grupos.

Una vez que los animales alcanzaron los tres meses de edad, se formaron los grupos experimentales de la descendencia femenina y masculina (n=10, cada grupo experimental), de acuerdo con el tratamiento administrado a los progenitores (CON, MEZ o DAID).

8.5 Evaluación de parámetros reproductivos en las hembras

8.5.1 Ciclo estral

Se realizaron frotis vaginales diariamente durante 4 semanas, las muestras obtenidas fueron teñidas con hematoxilina-eosina para identificar los tipos de células observados al microscopio.

Procedimiento: se utilizó un asa bacteriológica esterilizada, se tomó solución salina 0.9% (NaCl 0.9%) y se introdujo en la vagina de la hembra para tomar la muestra, la cual fue colocada en un portaobjetos. Las preparaciones se tiñeron con hematoxilina por 15 min, se enjuagaron con agua, se tiñeron con eosina por 5 min,

se lavaron nuevamente con agua, posteriormente se lavaron con alcohol absoluto durante 3 min y se dejaron secar. Por último, las muestras se fijaron con resina sintética diluida en xilol al 60%, la cual se colocó sobre la muestra y se cubrió con un cubreobjetos. Los frotis se observaron en un microscopio de óptico, con un aumento de 400X, marca (OLYMPUS modelo CX41), para observar la citología vaginal y determinar la etapa del ciclo estral, en cada una de las hembras.

8.5.2 Conducta sexual femenina

Las evaluaciones conductuales se realizaron en la etapa de proestro. Las hembras copularon con machos sexualmente expertos a los cuales se les permitió montar en 10 ocasiones a las hembras. Se cuantificó el número de veces que la hembra realizó lordosis y se obtuvo el cociente lordótico (LQ), de acuerdo con la siguiente fórmula: $LQ = (\text{número de lordosis} / \text{número de montas}) \times 100$.

Se evaluó la intensidad de la lordosis (grado de dorsiflexión) de acuerdo con la escala propuesta por Lehmann y Erskine., 2004. La intensidad de lordosis se estableció de acuerdo con el grado de flexión del dorso y del grado con el que la cabeza coincide con el plano vertical. La clasificación se basa en una escala de: no dorsiflexión (0); ligera dorsiflexión acoplada con un ligero movimiento de la cabeza hacia el plano vertical (1); dorsiflexión moderada, acoplada con el movimiento vertical de la cabeza (2); dorsiflexión extrema acoplada con el movimiento vertical de la cabeza (3).

8.5.3 Obtención de órganos reproductores femeninos

Al finalizar las evaluaciones conductuales, las hembras de cada grupo en proestro y diestro, fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg). Una vez anestesiadas se realizó una incisión en la línea media del abdomen inferior y se identificó el aparato reproductor de la hembra. Se disectaron los 2 ovarios, los cuernos uterinos y la vagina. Los órganos fueron pesados y fijados en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA) durante 24 hrs.

Posteriormente se realizó un corte en la cavidad torácica para realizar la extracción de sangre por punción cardíaca (3-4 ml), para la posterior evaluación de hormonas sexuales.

Los órganos disectados fueron procesados para el análisis histológico, mediante la inclusión en parafina. Una vez fijados en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA), se realizaron varios lavados con PBS, para eliminar el fijador. Enseguida los tejidos se lavaron 3 veces con alcohol al 70% y se mantuvieron en refrigeración durante 24 hrs. Después de la fijación y lavado de los tejidos, estos se colocaron en el procesador automático de tejidos, Histoquinet (Leica, TO, 1020, Leica Biosystem Richmond, Inc. USA), el cual se programa para que automáticamente los tejidos sean deshidratados mediante baños sucesivos de alcoholes a diferentes concentraciones y diafanizados por xiloles (Tabla 4).

Posteriormente los tejidos fueron incluidos en Paraplast-plus (McCormick™ Scientific, Leica Biosystem Richmond, Inc. USA), con la finalidad de obtener los bloques, a los cuales se les realizaron cortes transversales de 5 µm de grosor en diferentes segmentos del cubo, utilizando el micrótopo (Leica microtome, Leica

Biosystem Richmond, Inc. USA) y se montaron en portaobjetos previamente tratados con poli-l-lisina (Poly-L-Lysine Hidrobromide, Sigma Aldrich, Ind., USA) para evitar la movilización de los tejidos en el portaobjetos.

Tabla 4. Proceso de deshidratación, diafanización e impregnación de la parafina de los tejidos.

Solventes	Tiempo
1. Alcohol 80%	1.5 h
2. Alcohol 96%	1.5 h
3. Alcohol 96%	1.5 h
4. Alcohol 96%	1.5 h
5. Alcohol absoluto	1.5 h
6. Alcohol absoluto	1.5 h
7. Alcohol absoluto	1.5 h
8. Alcohol absoluto-xilol	1h
9. Xileno I	1h
10. Xileno II	1h
11. Parafina I	2 h
12. Parafina II	2 h

Para la evaluación histológica de útero y vagina, las muestras de estos tejidos fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina y eosina, los cortes se desparafinaron en una parrilla a 60°, durante una hora. Posteriormente se realizaron baños sucesivos de xiloles y alcoholes: xilol I (6 min), xilol II (6 min), xilol-OH (6 min), alcohol 1 al 100% (5 min), alcohol 2 al 100 % (5 min), alcohol -éter (3 min), alcohol al 96 % (3 min), alcohol al 80% (3 min), alcohol al 70% (3 min), un lavado con agua destilada, colorante hematoxilina (6 min), un lavado con agua de la llave, OH-HCL (1 seg), un lavado con agua destilada, solución Scott (10 min), una lavado con agua destilada, colorante eosina (4 min), un lavado con agua destilada, 2 enjuagues con alcohol al 96%, 2 lavados con alcohol al 100%, xilol-OH (2 min) y xilol (2 min). Una vez finalizada la tinción de hematoxilina y eosina, las muestras fueron montadas mediante resina sintética en xilol al 60%.

8.5.4 Evaluación histológica de útero y vagina

Para la evaluación histológica de útero y vagina, las muestras de estos tejidos fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina y eosina, para esto los cortes se desparafinaron, en una parrilla a 60°, posteriormente los tejidos se introdujeron baños sucesivos de xiloles y alcoholes: Xilol I (6 min), Xilol II (6 min), Xilol-OH (6 min), alcohol 1 al 100% (5 min), alcohol 2 al 100 % (5 min), alcohol-éter (3 min), alcohol al 96% (3 min), alcohol al 80% (3 min), alcohol al 70% (3 min), enjuague con agua destilada, colorante hematoxilina (6 min), enjuague con agua de la llave, OH-HCL (1 seg), enjuague con agua destilada, solución Scott (10 min), enjuague con agua destilada, colorante eosina (4 min), enjuague con agua destilada, 2 enjuagues

con alcohol al 96%, 2 enjuagues con alcohol al 100%, Xilol-OH (2 min) y Xilol (2 min). Una vez finalizada la tinción de hematoxilina y eosina, las muestras fueron montadas mediante resina sintética en Xilol al 60%.

8.5.5 Medición de la altura del epitelio vaginal y uterino

Las laminillas de los cortes de vagina y útero fueron observadas al microscopio óptico (AmScope Microscope Camera, con un aumento de 400X) y, mediante el software AmScope 3.7 conectado a la computadora, se evaluó la altura de los epitelios vaginales y uterinos; se realizaron treinta medidas por cada corte evaluado en las etapas de proestro y diestro.

8.6 Concentración sérica de estradiol, progesterona y testosterona

Al finalizar los tratamientos de los grupos de machos y hembras, se obtuvo sangre (3-4 mL) por punción cardiaca. La sangre obtenida se depositó en tubos de ensayo e inmediatamente fue centrifugada a 1.39 g durante 10 min, para separar el suero, éste se colocó en tubos de ensayo y se congelaron a -20°C para su posterior evaluación por la técnica de ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay) que es una técnica inmunológica, que utiliza marcadores enzimáticos para la detección de las reacciones antígeno-anticuerpo.

Las concentraciones séricas de E₂, P₄ y T se determinaron mediante los kits: Kit DRG ELISA, con ensayos para cada hormona, P₄ (EIA-1561), E₂ (EIA-2693) y T (EIA: 1559), las cuales se trabajaron de acuerdo con las especificaciones del proveedor DRG International, Inc. Cada ejecución incluyó una curva estándar, el

límite de detección para E₂ fue de 0.10 pg/mL, para P₄ fue de 0.1 ng/mL y T 0.26 ng/mL.

8.6.1 Técnica de ELISA

Se aseguró el número de pocillos a utilizar en la placa y se dispensaron 25 µL de cada solución estándar (Standard control) con puntas nuevas en los pocillos adecuados, se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó el conjugado enzimático (Enzyme Conjugate), 200 µl para P₄ y T y 100 µl en el caso de E₂ en cada pocillo y se mezcló durante 10 seg, para dejar incubar la placa se dejó incubar durante 90 min para E₂, 60 min para P₄ y 60 min para T, a temperatura ambiente. Una vez que terminó el tiempo de incubación, se lavaron los pocillos 3 veces con la solución de lavado (Wash Solution) colocando 400 µL de la solución en cada pocillo, posteriormente se le agrego 200 µL de la solución de sustrato (Substrate Solution), 200 µl para P₄ y T, 100 µl para E₂, a cada pocillo y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción enzimática se agregaron 100 µL de la solución de parada (Solution Stop) a cada pocillo. Por último, se determinó la absorbancia a 450 + 10 nm con un lector de placa de microtitulación, dentro de los 10 min después de la solución stop. Los datos de absorbancia obtenidos en el lector de ELISA (BIOTEK modelo:Epoch) fueron introducidos al programa Gen5 versión 1.10 para obtener la concentración hormonal de cada muestra.

8.7 Evaluación de parámetros reproductivos en los machos

8.7.1 Conducta sexual masculina

Para la evaluación conductual, los machos se pusieron en contacto con hembras receptivas, previamente ovariectomizadas, tratadas con estradiol (10 µg) y progesterona (2 mg, 4 hrs antes de la prueba de conducta). Los machos se colocaron en redondeles de acrílico transparente de 3 mm de espesor (40 x 40 x 50 cm); se dejaron habituar durante 5 min. Posteriormente se introdujo en cada redondel una hembra receptiva y se registraron los siguientes parámetros para cada macho: latencia de monta (tiempo que el macho tarda en realizar la primera monta), latencia de intromisión (tiempo que el macho tarda en realizar la primera intromisión), latencia de eyaculación (tiempo transcurrido desde la primera intromisión hasta la eyaculación), número de montas (número de montas antes de cada eyaculación), número de intromisiones (número de intromisiones antes de cada eyaculación), número de eyaculaciones que los machos presentaron durante el tiempo de prueba. Se realizaron cuatro sesiones de conducta sexual una vez por semana, con duración de 30 min cada una. Al finalizar las cuatro pruebas de todos los machos se obtuvo el porcentaje de animales que copularon y el porcentaje de animales que eyacularon.

8.7.2 Órganos sexuales masculinos

Una vez que se realizó la eutanasia en los machos, se les disectaron los testículos, la próstata y las vesículas seminales, se tomaron los pesos de los órganos en húmedo. Los testículos se perfundieron con 1 mL de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA) a través de la arteria testicular. Se colocaron un vial que

contenía paraformaldehído al 4% y se mantuvieron en refrigeración por 24 hrs. Al día siguiente se realizaron lavados con PBS, para eliminar el exceso del paraformaldehído, y enseguida se realizaron tres lavados con alcohol al 70%, y se mantuvieron en refrigeración por 24 hrs. Posteriormente los testículos se deshidrataron e incluyeron en parafina. Una vez obtenidos los bloques, se realizaron cortes de 5 μm de grosor en un micrótomo y se colocaron en portaobjetos, previamente tratados con poli-l-lisina.

Los cortes de testículo fueron desparafinados y rehidratados de acuerdo con el protocolo estándar establecido en el laboratorio. Las laminillas se colocaron en una estufa a una temperatura de 60°C, durante una hora. Posteriormente, se realizaron dos lavados con xilol de 5 min cada uno (Xilol I 5 min, Xilol II 5 min y OH-Xilol 5 min). En seguida, los tejidos se hidrataron con concentraciones descendientes de etanol: 100, 96, 80 y 70%, durante 3 min en cada uno de los alcoholes. Al finalizar, los tejidos se mantuvieron en PBS hasta que inicio la prueba.

8.7.3 Evaluación de muerte en células testiculares por TUNEL (Terminal deoxyuridine Nick-end labeling)

Los cortes de testículo de 5 μm de grosor fueron desparafinados y rehidratados de acuerdo con el protocolo estándar establecido en el laboratorio. Las laminillas se colocaron en una estufa a una temperatura de 60°C, durante una hora. Posteriormente, se realizaron dos lavados con xilol de 5 min cada uno. Enseguida, los tejidos se hidrataron con concentraciones descendientes de etanol: 100, 96, 80 y

70 %, durante 3 min en cada uno de los alcoholes. Al finalizar, los tejidos se mantuvieron en PBS hasta que inicio la prueba.

La técnica de TUNEL (The deoxyuridine Nick-end labeling) para la detección de células con apoptosis se realizó con el In-Situ Cell Detection kit (POD kit, Roche, Germany). Los tejidos fueron delimitados en el portaobjetos utilizando un lápiz punta diamante e inmediatamente los tejidos se desproteinizaron, mediante 50 µl de proteínasa K (Proteinase K, recombinant PCR Grade, Roche, Germany) y pH= 8.0 a una concentración de 20 µg/ml. Posteriormente se cubrió el tejido con parafilm y se colocaron las laminillas en una cámara obscura-húmeda y se incubaron a 37°C durante 30 min. Al finalizar, los tejidos se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min. Enseguida, las laminillas se colocaron en un gel refrigerante congelado y se agregaron 100 µl de solución de permeabilización (Triton X-100 0.1% disuelto en citrato de sodio 0.1%) a 4 °C, durante 5 min. Al finalizar, los tejidos se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min.

Enseguida, las laminillas se colocaron en un gel refrigerante congelado y se agregaron 100 µl de solución de permeabilización (Triton X-100 0.1% disuelto en citrato de sodio 0.1%) a 4°C, durante 5 min. Al finalizar, los tejidos se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min.

Para el marcaje los tejidos fueron tratados con 25 µl de una mezcla compuesta por: desoxi-nucleotidil-transferasa-(TdT) y trifosfato de dideoxiuridina con fluoresceína no radioactiva-(dUTP) (dilución 1:10) que es el marcador de fluoresceína. Se incubaron a 37°C durante 60 min dentro de una cámara oscura húmeda, posteriormente se lavaron las laminillas con PBS y se colocaron 50 µl de

diaminobenzidina (3-3´Diaminobenzidina tetrahydrochloride) al 0.05% durante 5 min. Posteriormente se lavaron con PBS. Enseguida, los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina durante 4 min, después se lavaron las laminillas con agua destilada y se realizaron lavados con alcohol al 96%, alcohol al 100%, OH-xilol y Xilol. Al finalizar, las laminillas se cubrieron una solución de glicerol/PBS (relación 1:1), se les colocó cuidadosamente un cubreobjetos y se dejaron secar. Las laminillas se analizaron con el microscopio óptico a un aumento de 400X.

Se analizaron 50 túbulos seleccionados al azar por laminilla en diferentes campos. Por cada espécimen, se contaron 50 túbulos al azar y se calculó el porcentaje de túbulos que contenían células germinales positivas a TUNEL, así como el número de células positivas a TUNEL contenidas en estos túbulos. Los núcleos de las células germinales positivas a TUNEL mostraron una coloración café intenso.

8.7.4 Análisis espermático

Los espermatozoides se obtuvieron de la cauda del epidídimo. Inmediatamente después de extraer los órganos reproductores, se disectó el epidídimo de los animales experimentales e inmediatamente se colocó en un vaso de precipitados de 10 mL, que contenía 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) [NaCl, 137 mM, KCl, 2.68 mM, Na₂HPO₄, 8.03 mM, K₂HPO₄, 1.47 mM, pH 7.4] a 37°C. Se realizó un corte en la cauda del epidídimo, con unas tijeras de disección de punta fina para liberar a los espermatozoides almacenados en la cauda. Una vez liberados se homogeneizaron suavemente en el PBS para formar una suspensión homogénea y posteriormente se realizó el análisis espermático.

8.7.5 Movilidad

Se tomaron 10 μ L de la suspensión de espermatozoides y se colocó en un portaobjetos, enseguida se cubrió con un cubreobjetos y se observó con un microscopio de campo claro (Olympus Light Microscope CX 41), con el objetivo de 40X y un aumento de 400X. Se contaron los espermatozoides móviles (con movilidad progresiva) e inmóviles. La movilidad se expresó en porcentaje de espermatozoides móviles del total de espermatozoides contados (200 por preparación).

8.7.6 Viabilidad

La viabilidad espermática se determinó por el método aprobado por la Organización Mundial de la Salud ("World Health Statistics," 2010). Se tomaron 10 μ L de la suspensión de espermatozoides, se colocaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con 10 μ L de una solución de eosina-nigrosina, compuesto con 1% de eosina, 5 % de nigrosina y 2.9 % de citrato de sodio, disueltos en 100 mL de agua destilada (Lucio *et al.*, 2009), se colocó un cubreobjetos y las muestras se observaron con un microscopio de campo claro (Olympus Light Microscope CX 41) con el objetivo de 40X y un aumento de 400X. Los espermatozoides no teñidos se consideraron vivos y los teñidos se consideraron muertos. La viabilidad se expresó como el porcentaje de espermatozoides no teñidos del total de espermatozoides contados (200 por preparación).

8.7.7 Concentración espermática

Se tomaron 25 μL de la suspensión de espermatozoides y se colocaron en 500 μL de agua destilada (dilución 1:21). La mezcla se agitó suavemente por inversión y se colocaron 10 μL en cada uno de los dos extremos de la cámara de Neubauer (Neubauer-improved, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany), enseguida se observaron al microscopio con el objetivo de 20X. El análisis se realizó en la cuadrícula central, conocida como E, se contabilizaron los espermatozoides presentes en 8 sub-cuadros específicos de la cámara. Se contaron los espermatozoides cuyas cabezas se encontraban dentro de estos sub-cuadros. La concentración se determinó con la siguiente fórmula: número de espermatozoides contados \times el número de cuadros (8) \times el factor de dilución (21) $\times 10,000$ y se dividió entre 2. El número de espermatozoides fue expresado en millones por mL (espermatozoides $\times 10^6/\text{ml}$).

8.8 Análisis estadístico

Se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism 5. Los datos se muestran como la Media \pm E.E.M. Los parámetros conductuales, los pesos corporales y glandulares, así como las concentraciones hormonales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El número de túbulos seminíferos que presentaron células germinales con muerte celular, los parámetros espermáticos, así como la concentración de estradiol, progesterona (P_4) y testosterona, se analizaron mediante ANOVA de dos vías. Las diferencias entre los

grupos se analizaron con una prueba post hoc de Newman-Keuls. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$.

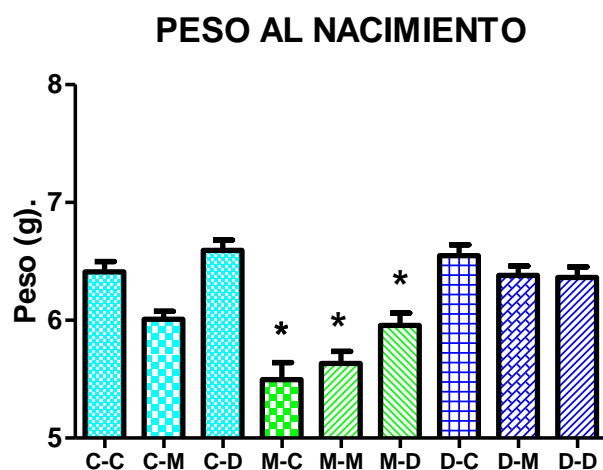
9. RESULTADOS

9.1 Hembras

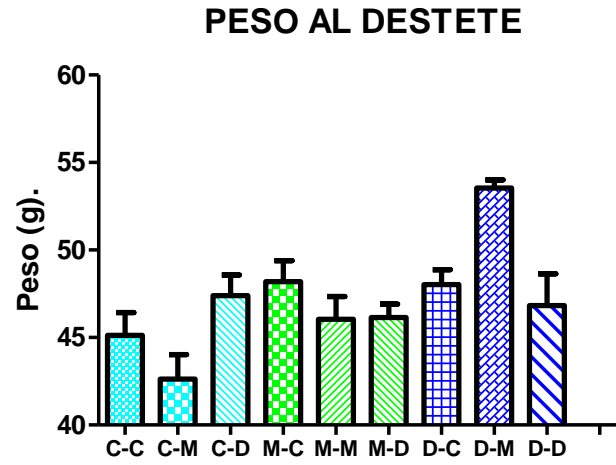
9.1.1 Peso corporal

El peso corporal de las hembras al nacimiento en los grupos que recibieron extracto de mezquite (MEZ) MC, MM, y MD mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) en comparación con las hembras de los grupos control (CON) CC, CM, CD y daidzeina (DAID) DC, DM, DD. Sin embargo, al momento del destete, el peso corporal de las hembras del grupo MEZ no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) con las hembras del grupo CON, DAID y MEZ. De manera similar el peso corporal de las hembras en la etapa adulta (3 meses de edad) entre grupos no fue diferente (Figura 7).

A



B



C

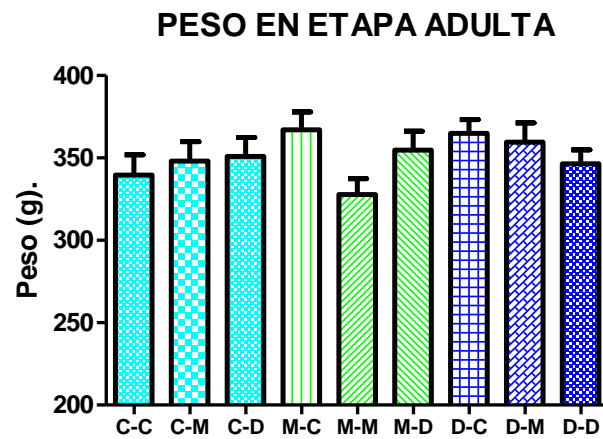


Figura 7. Efecto del extracto de la vaina de mezquite y daidzeina, sobre el peso corporal de hembras, al nacimiento (A), al destete (B) y en el adulto (C). Los datos muestran la media \pm E.E. * $p < 0.05$ comparado con el grupo CC.

9.1.2 Ciclo estral

Las hembras del grupo control (CC) no presentaron alteración en su ciclo estral durante las 4 semanas de análisis. Aunque en los grupos control mezquite (CM) y control daidzeína (CD) se observó una progresión continua del ciclo estral, con un incremento del 50% en alteraciones con un mayor número de días en estro. En lo que respecta a los grupos CM, MM, DM, CD, MD, DD se observó un incremento en los porcentajes de alteraciones en la progresión del ciclo estral, el cual fue del 50% en MC y DC, del 70% en CM y MD y del 80% en MM, DM, CD y DD. Las alteraciones correspondieron a la ausencia de las etapas de metaestro y diestro, así como alargamiento de las etapas de estro y proestro durante 2 y 3 días (Figura 8).

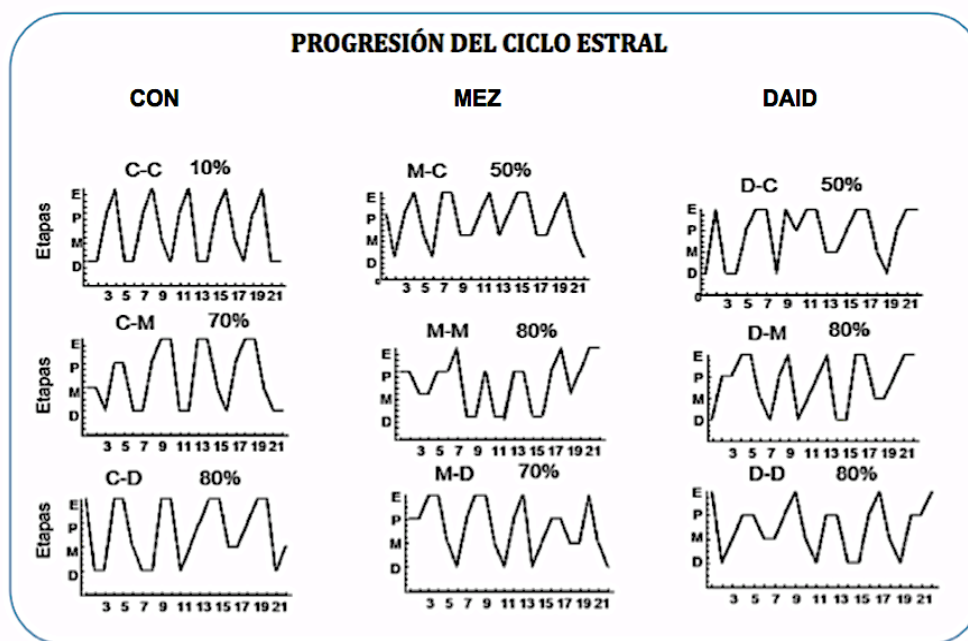


Figura 8. Ciclos estrales representativos de los grupos experimentales (CON, MEZ y DAID); los frotis vaginales fueron tomados diariamente por 4 semanas. Se muestra la progresión de los ciclos estrales y los porcentajes de anomalías. Etapas: E. Estro, P. Proestro, M. Metaestro y D. Diestro.

9.1.3 Apertura vaginal

Las hembras descendientes de las hembras de los grupos de MEZ (MC, MM, MD) presentaron una apertura vaginal adelantada en comparación con los grupos CON y DAI, sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas (Figura 9).

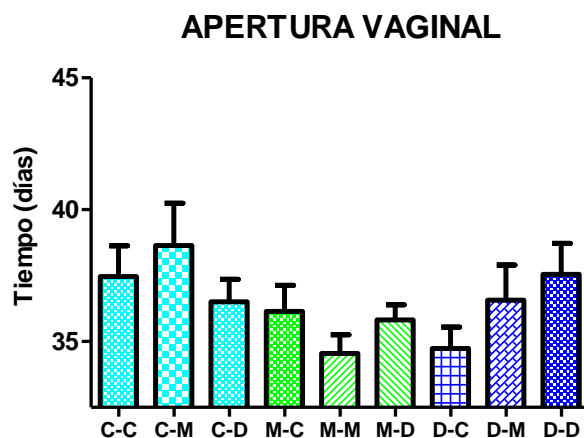


Figura 9. Apertura vaginal en las hembras de los grupos experimentales. No hubo diferencias significativas en los tiempos de la apertura vaginal entre los grupos. Los datos se muestran como la media \pm E.E; ANOVA de 1 vía.

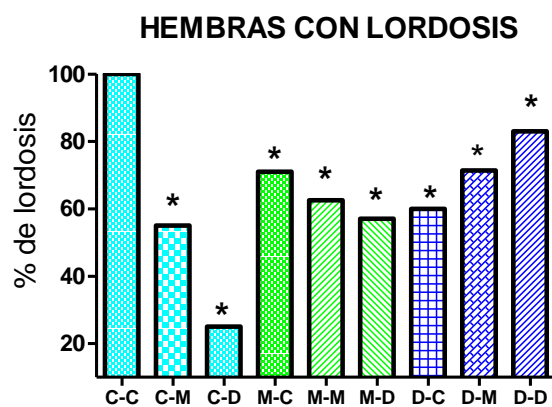
9.1.4 Conducta sexual femenina

Las hembras cuyas madres se expusieron al extracto de vaina de mezquite o daidzeína presentaron conducta proceptiva (hopping y darting), así como conducta receptiva (lordosis). El 100% de las hembras del grupo CC presentaron lordosis. Sin embargo, las hembras de los grupos que recibieron mezquite y daidzeína (CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM, DD) mostraron una disminución significativa en el porcentaje de lordosis comparados con el grupo control (CC) (Figura 10A).

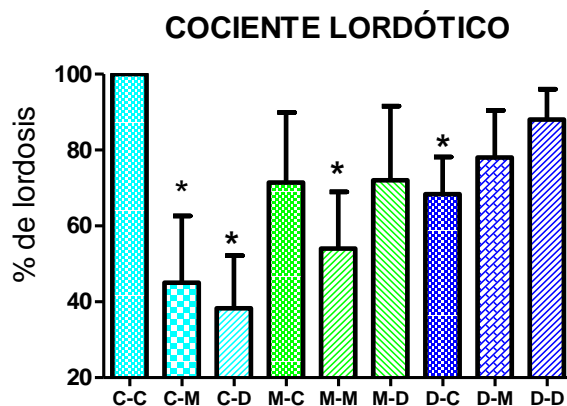
Las hembras del grupo CC mostraron cociente lordótico de 100%, mientras que los cocientes lordóticos de las hembras de los demás grupos (CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM, DD) fueron menores en comparación con el grupo CC, aunque no en todos los casos estas diferencias fueron significativas (Figura 10B).

Por otro lado, el 100% de las hembras del grupo CC presentaron intensidades de lordosis de nivel 3; en cambio, las hembras de los demás grupos experimentales (CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM, DD), mostraron menor intensidad de lordosis, de nivel 1 y 2, en comparación con el grupo CC (Figura 10C).

A



B



C

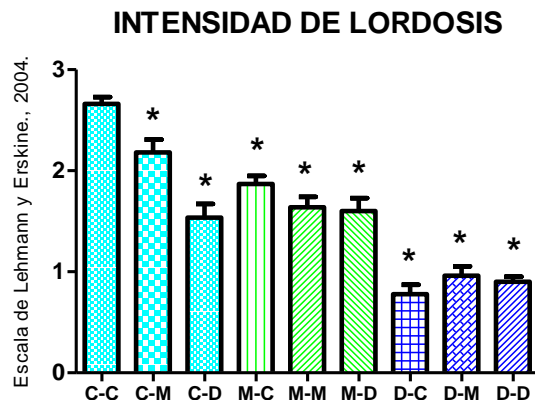


Figura 10. Porcentajes de hembras que presentaron lordosis, coeficiente lordótico e intensidad de la lordosis en hembras expuestas prenatalmente al extracto de la vaina de mezquite o daidzeina, sobre los porcentajes de lordosis, el cociente lordótico y la intensidad de lordosis de ratas hembras adultas. A) Porcentajes de lordosis, el grupo CC presentó el 100%, mientras que los grupos CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM y DD, presentaron porcentajes de lordosis, significativamente menores con respecto al grupo CC. B) Cociente de lordosis, se observó una disminución en el porcentaje del cociente de lordosis, entre los grupos CM, CD, MM y DC, estas diferencias fueron significativamente menores con respecto al grupo CC. C) Intensidad de lordosis, se observaron valores significativamente menores de la intensidad de lordosis en los grupos CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM y DD, con respecto al grupo CC. Los datos se muestran como la media \pm E.E. * $p < 0.05$ comparado con el grupo CC.

9.1.5 Órganos reproductores de las hembras

El análisis de las diferentes estructuras del aparato reproductor (pesos del ovario, útero y vagina) de la hembra no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en la etapa de proestro y diestro (Tabla 5).

Tabla 5. Pesos de órganos reproductivos de las hembras expuestas prenatalmente al vehículo, al extracto de vaina de mezquite o a la daidzeína evaluados en las etapas de proestro y diestro. No se observaron diferencias entre los grupos experimentales. Los datos se muestran como Media \pm E.E. * $p < 0.05$.

Proestro									
Grupos	C-C	C-M	C-D	M-C	M-M	M-D	D-C	D-M	D-D
Ovarios (mg)	65.0 \pm 4.0	65.0 \pm 5.6	68.75 \pm 6.1	65.0 \pm 6.2	57.5 \pm 2.1	60.0 \pm 3.2	60.0 \pm 2.1	75.0 \pm 4.0	63.3 \pm 5.5
Útero (mg)	754.4 \pm 96.5	882.5 \pm 112.1	622.5 \pm 38.1	724.0 \pm 152.7	721.6 \pm 65.0	860.0 \pm 140.0	700.0 \pm 62.6	634 \pm 39.8	662.0 \pm 51.2
Vagina (mg)	114.0 \pm 9.2	105.0 \pm 10.4	140.0 \pm 16.4	130.0 \pm 13.7	126.6 \pm 8.8	137.5 \pm 8.5	136.0 \pm 10.7	116.0 \pm 10.7	112.0 \pm 10.6
Diestro									
Grupos	C-C	C-M	C-D	M-C	M-M	M-D	D-C	D-M	D-D
Ovarios (mg)	53.0 \pm 3.3	51.0 \pm 2.2	57.0 \pm 5.3	49.1 \pm 3.5	56.6 \pm 4.9	54.1 \pm 1.9	54.0 \pm 2.6	54.0 \pm 2.6	50.0 \pm 2.1
Útero (mg)	328.0 \pm 22.2	396.2 \pm 85.7	407.5 \pm 56.7	386.0 \pm 28.2	530.0 \pm 85.4	458.3 \pm 24.1	454.0 \pm 61.6	426.0 \pm 36.1	350.0 \pm 43.2
Vagina (mg)	98.0 \pm 8.1	96.0 \pm 8.12	96.0 \pm 6.7	95.0 \pm 15.0	88.0 \pm 8.0	103.3 \pm 8.8	86.0 \pm 12.0	101.6 \pm 87	112.5 \pm 22.1

9.1.6 Medidas de los epitelios vaginal y uterino

El estudio de las medidas del epitelio vaginal y uterino del grupo control (CC) no mostró diferencias significativas entre los grupos CM, CD, MC, MM, MD y DC. En contraste, los grupos DM (10.93 μ m) y DD (10.57 μ m) presentaron un incremento en el grosor del epitelio vaginal en la etapa de proestro. El epitelio uterino, no mostró diferencias entre los grupos CD, MC, MD, DC, DM y DD cuando se comparó con el grupo CC. Una excepción se presentó en los grupos CM (12.01 μ m) y MM (19.16 μ m) en donde se observó un mayor grosor en la etapa de proestro (Figura 11).

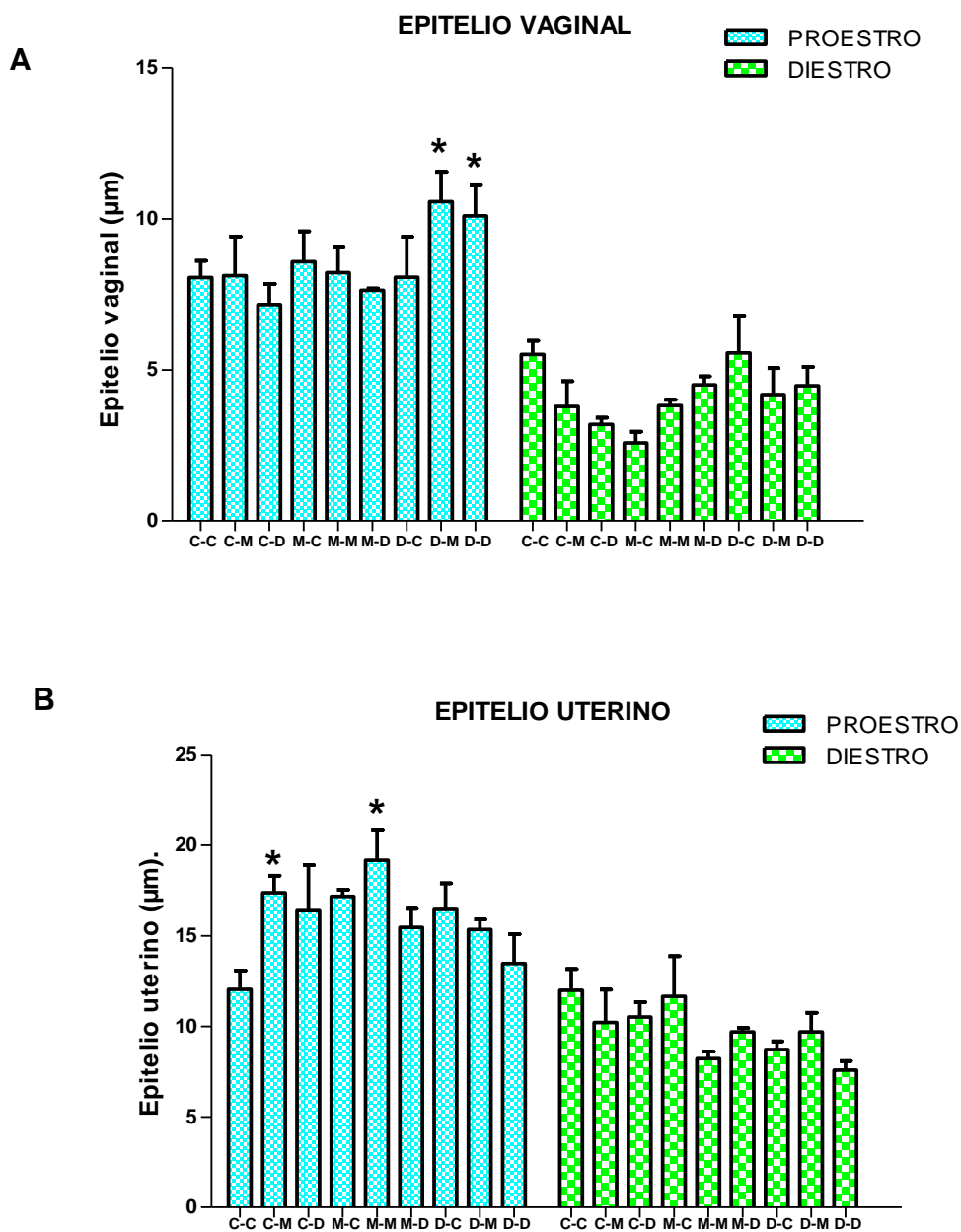
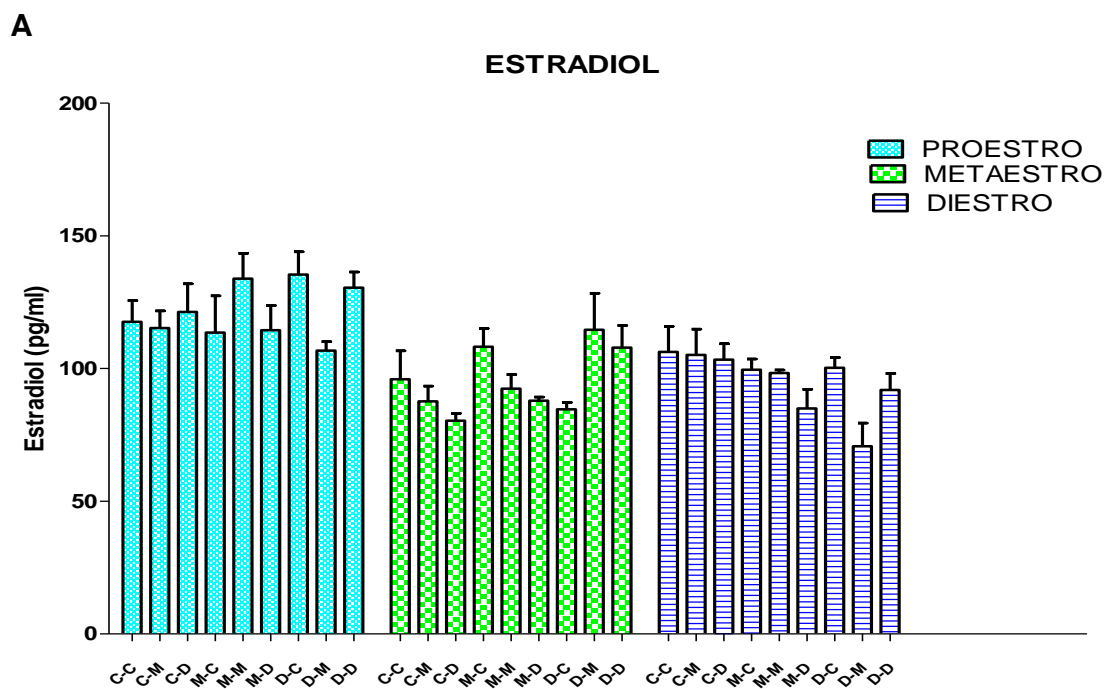


Figura 11. Efecto de la exposición prenatal de los tratamientos: vehículo, extracto de la vaina de mezquite y daidzeina, sobre el epitelio vaginal y uterino. A) se observó que los grupos DM y DD, presentaron un aumento significativo en el grosor del epitelio vaginal, en la etapa de proestro, al compararlo con el grupo CC. B) Se observó que los grupos de CM y MM presentaron un aumento significativo en el epitelio uterino, en la etapa de proestro al compararla con el grupo CC. Los datos se muestran como la media \pm E.E. * $p < 0.05$ comparado con el grupo CC.

9.1.7 Concentraciones séricas de estradiol y progesterona

Las concentraciones de estradiol en sangre de las hembras del grupo CON, MEZ y DAI en la etapa de estro proestro, metaestro y diestro se encontraron en el rango normal (60 a 90 pg/ml), sin diferencias entre los grupos (Figura 12A).

Los niveles de progesterona sérica entre los grupos experimentales no fueron diferentes en las etapas de proestro, metaestro y diestro (Figura 12B).



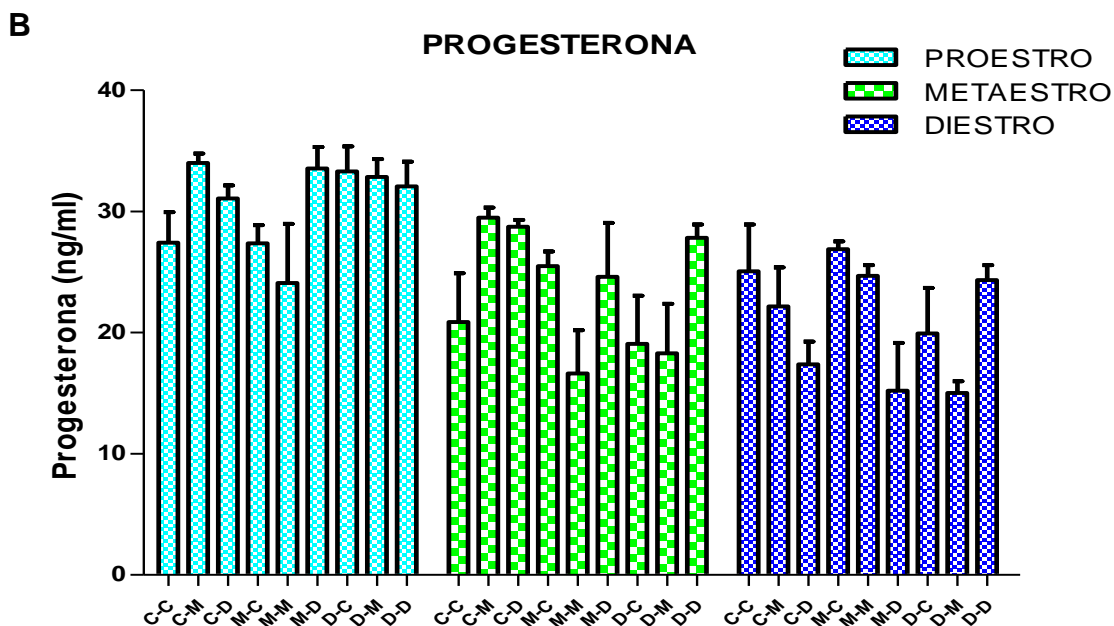


Figura 12. Concentraciones séricas de estradiol y progesterona en ratas hembras adultas, expuestas prenatalmente al extracto de vaina de mezquite o a la daidzeína, en las etapas de proestro y diestro. A) Niveles de estradiol, de los grupos experimentales, en las etapas del ciclo estral proestro y diestro. Aunque se observó un incremento en la concentración sérica de estradiol en los grupos de DAI, en las tres etapas, estas diferencias no fueron significativas. B) Concentraciones séricas de progesterona. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se muestran como la media \pm E.E. * $p < 0.05$.

9.2 Machos

9.2.1 Conducta sexual masculina

Con respecto a los parámetros de la conducta sexual masculina, los machos de los grupos CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM, DD, presentaron un incremento en las latencias de monta (LM), intromisión (LI), eyaculación (LE) y en el número de montas (NM) a lo largo de las 4 pruebas realizadas, en comparación con el grupo CC. En cuanto, al número de intromisiones (NI) y el número de eyaculaciones (NE), éstos fueron menores en los machos de esos grupos, en comparación con el grupo CC (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros conductuales masculinos en machos expuestos prenatalmente a los tratamientos: vehículo, extracto de la vaina de mezquite y daidzeína, evaluados a lo largo de cuatro sesiones de conducta sexual una vez por semana.

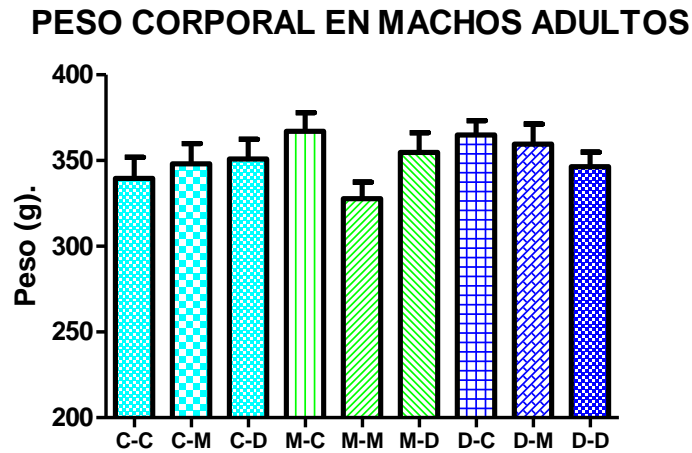
	LM	LI	LE	NM	NI	NE
C-C	16.81 ± 3.29	16.81 ± 3.29	547.75 ± 52.85	5.25 ± 1.06	11.8 ± 14.5	2.1 ± 0.27
C-M	43.33 ± 18.35	56.44 ± 17.27	1271.28 ± 142.01*	15.42 ± 3.13 *	11.66 ± 0.88	1.0 ± 0.26*
C-D	42.50 ± 12.70	46.12 ± 13.84	817.14 ± 110.90*	9.5 ± 4.11	11.12 ± 1.78	1.65 ± 0.26*
M-C	104.9 ± 49.23 *	381.11 ± 108.41*	828.0 ± 103.0 *	15.0 ± 2.12*	7.0 ± 0.57*	0.3 ± 0.15*
M-M	99.62 ± 43.93 *	143.00 ± 48.01*	1060.25 ± 218.20*	7.88 ± 1.26	7.4 ± 1.2*	0.55 ± 0.24*
M-D	259.60 ± 134.45*	226.75 ± 151.57*	1184.2 ± 192.71*	16.5 ± 3.66*	9.0 ± 0.97*	0.7 ± 0.26*
D-C	299.62 ± 97.50*	567.50 ± 127.58*	1050.0 ± 120.0*	13.0 ± 3.4*	5.33 ± 1.05*	0.12 ± 0.12*
D-M	154.71 ± 75.23*	160.00 ± 50.15*	750.25 ± 117.09	14.0 ± 3.29*	9.0 ± 1.46*	0.85 ± 0.34*
D-D	112.55 ± 41.53*	158.77 ± 43.17*	1015.8 ± 212.34*	15.0 ± 3.8*	11.57 ± 1.71	0.88 ± 0.35*

Los datos se muestran como la media ± E.E, *p<0.05 comparado con el grupo CC. LM: latencia de monta; LI: latencia de intromisión; LE: latencia de eyaculación; NM: número de montas; NI: número de intromisiones; NE: número de eyaculaciones.

9.2.2 Peso corporal

El peso corporal de los machos en la etapa adulta entre grupos resultó similar (Figura 13A). Sin embargo, el peso testicular en aquellos machos que recibieron mezquite y daidzeína (CM, MC, MM, MD y DC, DM) fue significativamente menor comparado con el grupo CC (Figura 13B).

A



B

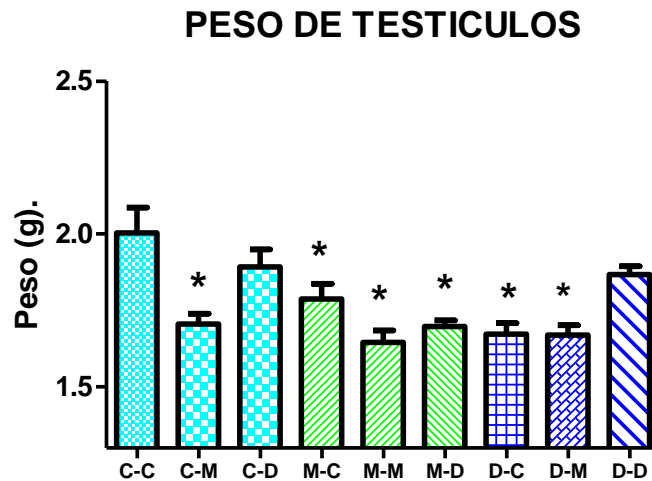


Figura 13. Pesos corporales y testiculares de ratas macho adultas expuestas prenatalmente a los tratamientos: vehículo, extracto de la vaina de mezquite y daidzeína. A) No se observaron diferencias significativas en los pesos corporales de los grupos B) Los pesos testiculares fueron significativamente menores en casi todos los machos de los grupos experimentales con respecto el grupo CC. Los datos se muestran como la media \pm E.E. * $p < 0.05$ comparado con el grupo CC.

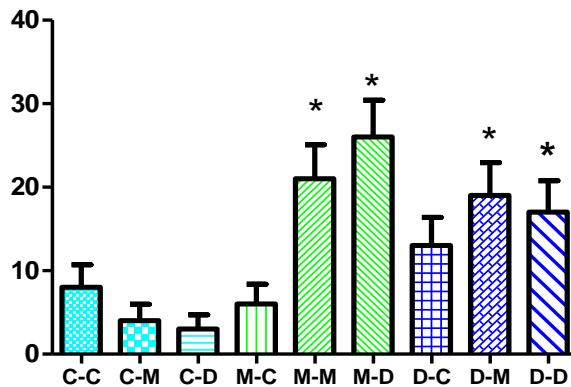
9.2.3 Detección de muerte en células testiculares mediante TUNEL

En los datos obtenidos en las pruebas con la técnica de Tunel, se observó un incremento en el porcentaje de túbulos que contenían células positivas a TUNEL en los grupos MM (21%), MD (26%), DM (19%) y DD (18%) en comparación con el grupo CC (7%) (Figura 14A).

Los túbulos seminíferos de los grupos MM (3%), MD (5%) y DM (4%) presentaron un incremento en el porcentaje ($p < 0.05$) de células positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos en comparación con los machos del grupo CC (1%) (Figura 14B).

A

% DE TÚBULOS CON CÉLULAS POSITIVAS A TUNEL



B

% DE CÉLULAS POSITIVAS A TUNEL POR TÚBULO

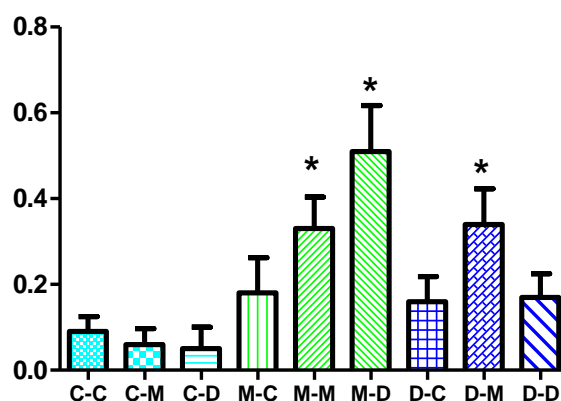


Figura 14. Porcentajes de túbulos seminíferos que contienen células positivas a TUNEL y número de células positivas a TUNEL contenidas en los túbulos seminíferos en testículos de machos expuestos prenatalmente a los tratamientos maternos: vehículo, extracto de la vaina de mezquite y daidzeina. A) Se observa un aumento significativo en el porcentaje de túbulos con células positivas a TUNEL para los grupos MM, MD, DM y DD en comparación con el grupo CC. B) Se observa un aumento significativo en el número de células positivas a TUNEL presentes en los túbulos seminíferos para los grupos MM, MD y DM, en comparación con el grupo CC (50 túbulos por grupo) Los datos se muestran como la media \pm E.E. * $p < 0.05$ comparado con el grupo CC.

En la figura 15 se muestran fotomicrográficas de cortes representativos de testículos de los machos de los diferentes grupos experimentales.

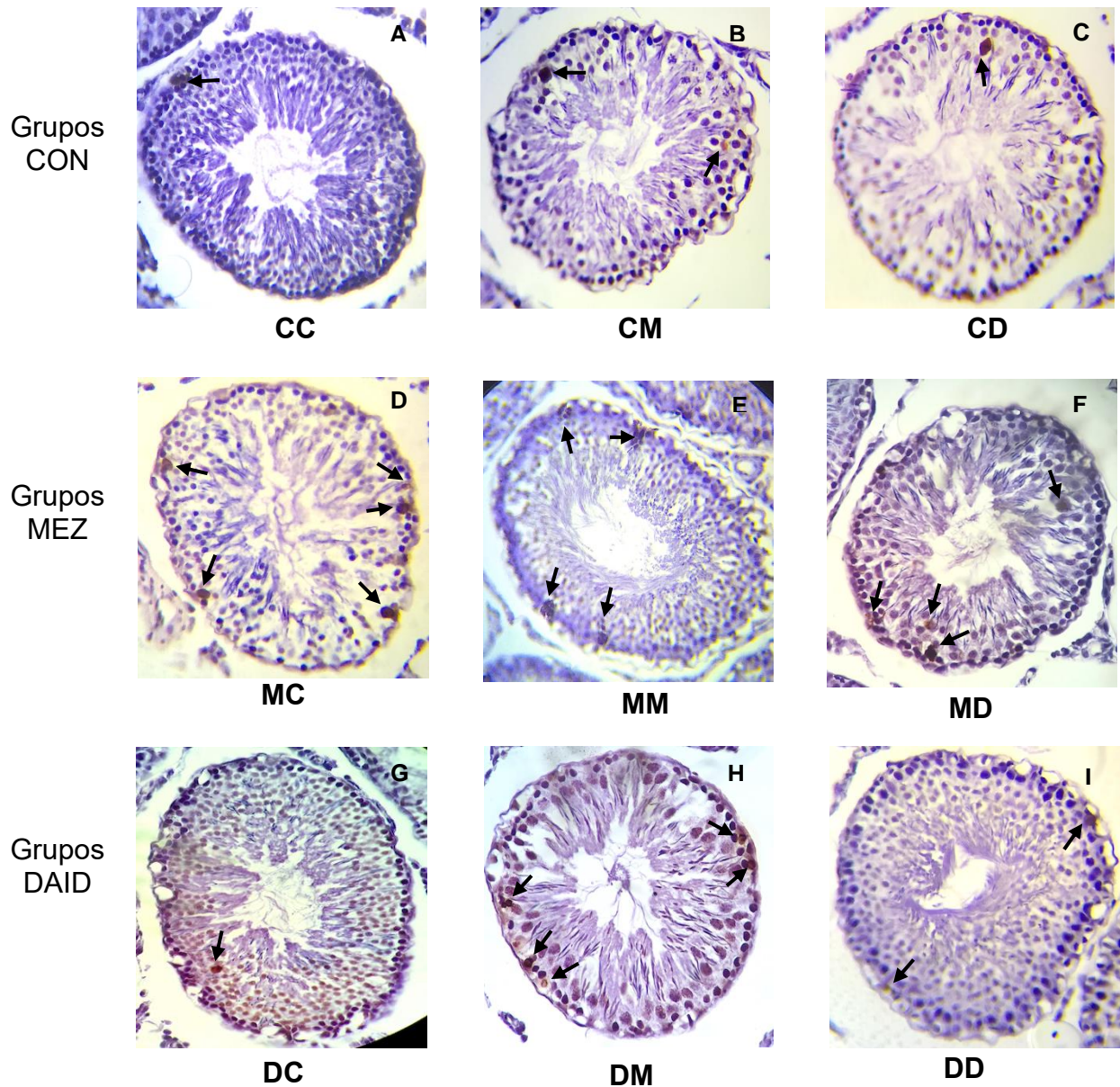


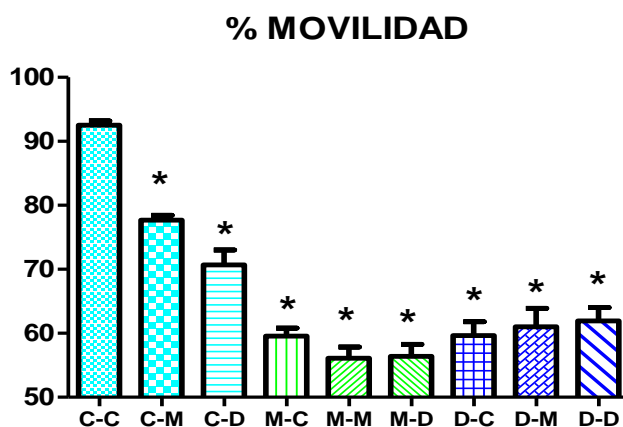
Figura 15. Fotomicrográficas representativas de testículos de machos de todos los grupos experimentales que fueron expuestos prenatalmente a los tratamientos: vehículo, extracto de la vaina de mezquite o daidzeina, sobre los túbulos seminíferos de ratas macho adultas. Células positivas a TUNEL (flechas). A, B y C son fotomicrográficas representativas de los grupos CON (CC, CM y CD), donde se observa la presencia de células positivas a TUNEL en la parte basal, las cuales corresponden a espermatogonias. En B es un espermatocito y

en C es una espermátida. D, E y F corresponden a fotomicrografías de los grupos MEZ (MC, MM, MD), donde se observa una mayor incidencia de espermatogonias en apoptosis (flechas), en F son espermatoцитos y espermátidas en comparación con los grupos CON. G, H e I, son fotomicrografías que corresponden a los grupos DAI (DC, DM, DD), se observa la presencia de espermatogonias en apoptosis, con una mayor incidencia en el grupo de DM, muy semejante a los grupos de MEZ. Las células en apoptosis se detectaron mediante la técnica de TUNEL (400X).

9.2.4 Parámetros espermáticos

Los datos obtenidos en los parámetros espermáticos para los machos del grupo CC reflejaron un mayor porcentaje en la movilidad (90%), la viabilidad (90%) y en la concentración espermática (140×10^6 mL). En contraste, los machos de los grupos CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM, DD presentaron una disminución en los parámetros espermáticos (Figura 16).

A



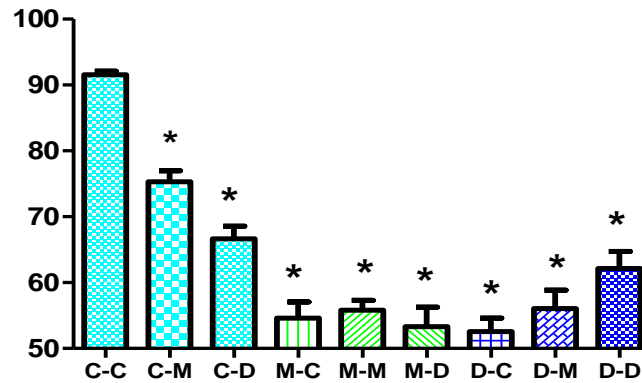
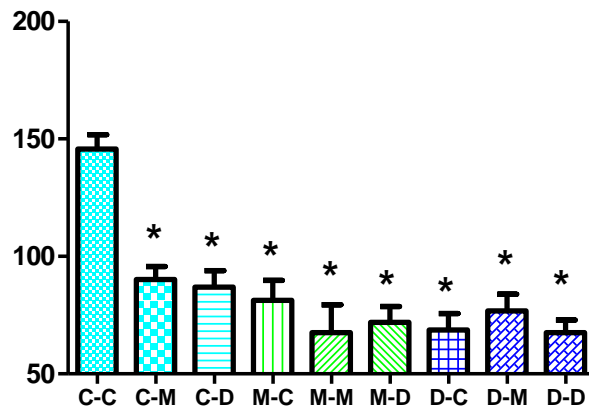
B**% DE VIABILIDAD****C****CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA x10⁶ /mL**

Figura 16. Parámetros espermáticos: movilidad, viabilidad, y concentración espermática, de ratas machos adultos expuestas prenatalmente al extracto de vaina de mezquite o daidzeína. Se observó disminución en los porcentajes de movilidad (A), viabilidad (B) y en la concentración espermática (C), en comparación con el grupo CC. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparado con el grupo CC.

9.2.5 Concentraciones séricas de testosterona

La concentración de T circulante de los machos de los grupos CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM no fue diferente a la del grupo CC. Sólo el grupo DD, mostró una concentración menor con respecto a los machos del grupo CC (Figura17).

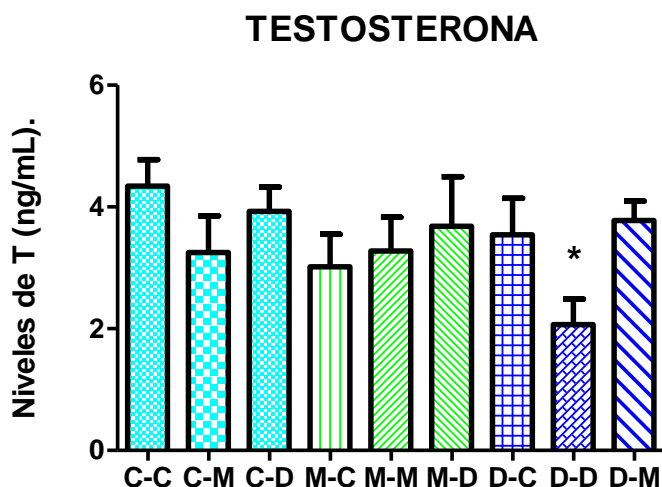


Figura 17. Efecto de la exposición prenatal de los tratamientos: vehículo, extracto de la vaina de mezquite y daidzeína, sobre los niveles de testosterona en suero sanguíneo de ratas macho adultas. Se observó que los machos de los grupos CM, CD, MC, MM, MD, DC, DM no presentaron niveles significativamente al grupo CC, mientras que el grupo DD, tubo concentraciones séricas de testosterona significativamente menores a las observadas en los machos del grupo CC. Los datos se muestran como $X \pm E.E.M.$ * $p < 0.05$ comparados con el grupo CC.

10. DISCUSIÓN

El elevado consumo de fitoestrógenos presentes en las dietas vegetarianas de los humanos y en las leguminosas que consume el ganado puede representar un riesgo significativo para la salud reproductiva, debido a que son considerados disruptores endocrinos. Puesto que la placenta no representa una barrera para los

fitoestrógenos, las consecuencias de la exposición a estos compuestos en etapas tempranas de la vida deben examinarse y vigilarse cuidadosamente (Degen *et al.*, 2002). El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos ocasionados por la exposición prenatal del MEZ, en la reproducción y durante la etapa adulta, utilizando ratas hembras y machos. Los efectos observados muestran que el MEZ es capaz de alterar diversos aspectos reproductivos, tanto en el macho como en la hembra.

10.1 Hembras

10.1.1 Peso corporal

El peso corporal que se observó en las crías de las hembras de los grupos de MEZ al momento del nacimiento, fue significativamente menor comparados con los de las hembras de los grupos CON, este efecto podría ser consecuencia de una menor ingesta de alimentos por parte de las madres gestantes. Se sabe que el E₂ ejerce un papel inhibitorio en la ingesta de alimentos, generando señales anorexigénicas que regulan el balance energético (Carrillo *et al.*, 2017; Kim, *et al.*, 2016). Los efectos anorexigénicos del estradiol son muy similares a los de la leptina; ambas hormonas causan reducción dosis-dependiente en la ingesta de alimentos, a través de la inhibición de las neuronas orexigénicas que liberan el péptido relacionado con Agouti (AgRP) y el neuropéptido-Y (NPY) en el núcleo arcuato (Arco) del hipotálamo (Kim *et al.*, 2016).

Es probable que el MEZ ejerza en la hembra gestante un efecto estrogénico similar al de E₂, lo que se traduce en un menor consumo de alimentos. Por lo tanto, se puede sugerir que el MEZ ejerce un efecto anorexigénico, similar al del E₂, lo que

provocó una menor ingesta de alimento por parte de las madres de los grupos de MEZ, ocasionado un menor peso corporal en las crías al nacimiento.

El peso al destete (21 días de edad) de las hembras de los grupos de MEZ fue similar al control, lo que indica una recuperación y ganancia de peso, debido, probablemente a que su consumo de leche haya sido adecuado o incluso mayor que en los controles. Es posible que el efecto estrogénico del extracto durante la etapa prenatal solo haya afectado el consumo de alimento por parte de las madres, sin afectar el control de la ingesta de alimento en las crías. Esto les permitió tener pesos corporales normales al destete y en la etapa adulta. Sin embargo, en este estudio no se registró el peso de las madres durante la gestación, por lo que no se puede corroborar la disminución de nutrientes a los fetos, repercutiendo en un bajo peso.

10.1.2 Ciclo estral

Los ciclos estrales observados en las hembras adultas expuestas prenatalmente al MEZ, presentaron alteraciones en la progresión del ciclo estral. Dichas alteraciones fueron observadas en la mayoría de las hembras expuestas tanto al MEZ como a la DAID. Las anomalías observadas en el ciclo estral fueron ausencia de metaestro y diestro y el alargamiento de estro y proestro.

Resultados similares han sido reportados en otros estudios, en los que la exposición prenatal a la daidzeína causa estros prolongados (Talsness *et al.*, 2015). Los cambios hormonales a lo largo del ciclo reproductivo femenino se reflejan en la progresión del ciclo estral (Freeman y Freeman., 2006). El E₂ causa proliferación y cornificación en el epitelio vaginal durante el proestro y el estro, respectivamente y, al

mismo tiempo, ejerce retroalimentación positiva en el hipotálamo, necesaria para que se lleve a cabo el pico preovulatorio de gonadotropinas. A mayor concentración de E₂, mayor proliferación y/o cornificación del epitelio vaginal, dando como resultado la prolongación del proestro y/o del estro. Sin embargo, en este estudio no se observaron elevadas concentraciones séricas de E₂ en la descendencia, que pudieran relacionarse con proestros y estros prolongados.

Las alteraciones observadas en el ciclo estral sugieren que la exposición prenatal al MEZ podría haber ocasionado cambios en los componentes neurales del eje HPG que regulan la secreción de Kisspeptina, GnRH y gonadotropinas. La exposición prenatal al MEZ podría inducir una mayor capacidad respuesta del epitelio vaginal, debido tal vez al aumento en la cantidad y/o la sensibilidad de los REs en las células del epitelio vaginal.

La administración de hormonas esteroideas durante períodos críticos de la gestación (prenatal y neonatal) puede acelerar la pubertad y eliminar la capacidad de generar oleadas preovulatorias regulares de GnRH (Bateman y Patisaul, 2008), además, está demostrado que las neuronas GnRH expresan RE β durante el desarrollo y por lo tanto pueden responder a compuestos estrogénicos, lo que provoca alteraciones en las neuronas GnRH que regulan la secreción de LH y FSH desde la adenohipófisis, dando como resultado la interrupción de la continuidad normal de los ciclos estrales (Smith y Jennes, 2001).

Las neuronas del núcleo AVPV son el principal regulador de la actividad de las neuronas GnRH en las hembras, ya que las lesiones en esta región anulan los picos de LH inducidos por estrógenos e interrumpen el ciclo estral. La exposición neonatal

a GEN y Bisfenol-A (BPA) afecta la expresión génica sexualmente dimórfica en el AVPV y su volumen, lo que sugiere que esta región puede ser particularmente sensible a los DE como los fitoestrógenos (Patisaul., 2005).

10.1.3 Apertura vaginal

En los roedores, la apertura vaginal es un marcador fisiológico del inicio de la pubertad y de la capacidad de generar y mantener un ciclo estral regular (Bateman y Patisaul, 2008).

La administración de estrógenos durante el desarrollo neonatal puede acelerar el inicio de la pubertad y evita el mantenimiento de ciclos estrales regulares en las ratas hembras (Bateman y Patisaul, 2008). Esto es debido a que las neuronas Kisspeptinérgicas (KISS), las cuales abundan en el núcleo AVPV, contienen REs y envían proyecciones axónicas a las neuronas GnRH. Las neuronas KISS desempeñan un papel, clave tanto en el inicio de la pubertad, como en la regulación del ciclo estral. El gen Kiss-1 de estas neuronas codifica una familia de proteínas llamadas kisspeptinas (KISS), que actúan como ligandos endógenos para el receptor GPR54 acoplado a la proteína G. Las neuronas GnRH y la activación de este receptor parece ser vital para desencadenar el inicio de la pubertad ya que en los humanos que carecen de GPR54 son hipogonádicos y no inician la pubertad (Bateman y Patisaul, 2008).

En este trabajo, aunque las diferencias observadas no fueron significativas, las hembras de los grupos de MEZ presentaron una apertura vaginal acelerada, lo que

indica cierto efecto estrogénico de la exposición prenatal al MEZ, además de las alteraciones mencionadas en la progresión del ciclo estral.

10.1.4 Conducta sexual femenina

La conductual sexual en la rata hembra está mediada por RE α presentes en estructuras hipotalámicas que regulan el comportamiento sexual, como es el núcleo ventromedial (NVM). La administración de E₂ a ratas en la etapa neonatal, causa una menor motivación sexual y un LQ reducido (Komine *et al.*, 2017). En el presente estudio, la exposición al MEZ disminuyó el cociente lordótico y la intensidad de la lordosis. Es probable que el MEZ haya afectado la expresión de los RE α y de los receptores para P₄ en las neuronas del NVM, induciendo así la desfeminización del cerebro de la rata, de manera similar a lo que se ha observado con la exposición neonatal al 17-etinilestradiol (Komine *et al.*, 2017). La diferenciación sexual del cerebro femenino de la rata ocurre desde el día 18 gestacional hasta el día 5 neonatal. La presencia de estrógenos durante este periodo afecta este proceso, desfeminizando el cerebro femenino y, por ende, el comportamiento sexual en las hembras (Komine *et al.*, 2017).

Los fitoestrógenos también son capaces de alterar el proceso de diferenciación sexual, ya que el tratamiento neonatal de hembras con GEN y DAI causa disminución del cociente lordótico. Esto se atribuye al efecto estrogénico de las isoflavonas, las cuales pueden causar defeminización del cerebro, repercutiendo así en la disminución de la conducta sexual femenina (Kouki, *et al.*, 2003).

Los efectos observados en la descendencia también podrían ser causados por cambios en el genoma. El reciente aumento en el interés por los efectos epigenéticos que proporcionan una nueva hipótesis para explicar los efectos permanentes de los esteroides sexuales sobre la organización de los tejidos neurales. La evidencia reciente sugiere que la acetilación de histonas es sexualmente dimórfica en el hipotálamo. La permanencia de tales efectos epigenéticos se establece para otros sistemas, aunque no siempre está claro cómo se mantienen las marcas epigenéticas en la cromatina. Este será un tema de investigación interesante en los próximos años (Arnold, 2009).

10.1.5 Medias de los epitelios vaginal y uterino

De acuerdo con los resultados obtenidos en este y otros trabajos, la exposición prenatal (antes del apareamiento y durante la gestación) al MEZ y a los fitoestrógenos no tiene efecto en el crecimiento epitelial uterino (Hertrampf *et al.*, 2009). Por lo anterior, el efecto estrogénico del MEZ y de los fitoestrógenos no es suficientemente potente como para causar proliferación en los tejidos uterinos y vaginales cuando las hembras son expuestas prenatalmente a estos compuestos.

10.1.6 Concentraciones séricas de estradiol y progesterona

En la rata la expresión de la conducta de proceptividad y receptividad dependen del E₂ y la P₄. Durante el proestro se observa un pico de E₂, el cual es seguido por un incremento en la secreción de P₄ y es al final de esta fase y al inicio del estro cuando la hembra ovula y se encuentra sexualmente receptiva (Retana-

Marquez, S. *et al*, 2012). La biosíntesis adecuada de esteroides sexuales depende de la disponibilidad de hormonas precursoras y enzimas esteroidogénicas (Patel *et al.*, 2016).

De igual forma que en el caso de los epitelios, las concentraciones séricas de E₂ y P₄ tampoco se modificaron en respuesta a la exposición prenatal al MEZ y a la DAI. La ausencia de alteraciones en las concentraciones hormonales indica que el MEZ y la DAI, en la etapa prenatal, no son capaces de alterar ni la expresión ni la actividad de las enzimas esteroidogénicas en los folículos ováricos.

10. 2 Machos

10.2.1 Conducta sexual masculina

Uno de los procesos reproductivos más afectados en la descendencia masculina expuesta prenatalmente al MEZ fue la conducta sexual, en la cual se observó incremento en las latencias de monta (LM), de intromisión (LI) y de eyaculación (LE), así como en el número de montas (NM), aunado a un menor número de intromisiones (NI) y de eyaculaciones (NE).

Las alteraciones observadas en la conducta sexual masculina podrían haber sido causadas por la des-masculinización del cerebro, pues la masculinización del cerebro depende principalmente de la aromatización de la T a E₂ durante el período crítico de diferenciación sexual, a través de los ER α en el hipotálamo. El E₂ es responsable de la organización de los circuitos neuronales que regulan la conducta sexual de los machos, como es el caso del Área Preóptica Media del hipotálamo, la cual es mayor en los machos que en las hembras (Komine *et al.*, 2017; Yu *et al.*,

2013). Es probable que las alteraciones conductuales observadas en los machos expuestos prenatalmente al MEZ o a la DAI se deban a que los fitoestrógenos inactivan a la enzima aromatasa (Wang *et al.*, 2006), la cual es la responsable de la aromatización de la testosterona a E₂, durante el periodo crítico de la diferenciación sexual. De esta manera, inducen un efecto antiestrogénico, necesario para la masculinización del cerebro masculino.

10.2.2 Peso corporal y testicular

El peso corporal de la descendencia masculina en la etapa adulta no se afectó por el tratamiento prenatal, lo que indica que los mecanismos neurológicos que regulan la ingesta de alimento tampoco se alteraron.

Al contrario de los pesos corporales, los pesos testiculares fueron menores en los machos expuestos prenatalmente al MEZ o a la DAI. De manera similar, la exposición prenatal de ratas macho a dosis altas de GEN durante el período crítico del desarrollo y diferenciación sexual (12-19 días de gestación) causó disminución de los pesos testiculares, del epidídimo, de las vesículas seminales y la próstata (Meena, *et al.*, 2017).

La exposición al dietilestilbestrol (estrógeno sintético) en la etapa prenatal y neonatal causa alteraciones en el epitelio y en los túbulos seminíferos, células germinales prematuras en el lumen de los túbulos, adelgazamiento en las capas de las células germinales e hipoplasia de las células de Leydig (Piotrowska, *et al.*, 2011).

10.2.3 Apoptosis en células testiculares mediante TUNEL

La apoptosis o muerte celular programada (MCP), es un tipo de muerte celular fisiológica que regula la producción de células germinales en los testículos, evitando el crecimiento desmedido del testículo y manteniendo un adecuado número de células germinales (Retana-Márquez, S. *et al*, 2012).

Sin embargo, la MCP en el testículo, también puede ser activada por factores externos como por sustancias químicas como los fitoestrógenos. En el epitelio seminífero existe un mecanismo encargado de regular el número de células germinales que las células de Sertoli pueden soportar sin exceder su capacidad, este mecanismo es regulado vía apoptosis mediante la activación del sistema Fas; esta vía de transducción de señal paracrina ha sido propuesta como un importante regulador fisiológico de la MCP en las células germinales. Este sistema también puede ser activado cuando existe una sobre población de células germinales, esto se debe a que las células de Sertoli son incapaces de proporcionar un ambiente hormonal adecuado, por lo que las células germinales pueden activar un sistema de autoeliminación vía Fas. Las espermatogonias y los espermatoцитos primarios son los más susceptibles a presentar daño por apoptosis (Retana-Márquez, S. *et al*, 2012).

La exposición prenatal al MEZ y a la DAI promovió el aumento en la muerte de las células testiculares, aumentando tanto el porcentaje de túbulos seminíferos que contenían células positivas a TUNEL como el número de células positivas a TUNEL por túbulo. El aumento en la muerte celular podría ser responsable del menor peso testicular y la menor concentración de espermatozoides epididimarios.

Se sabe que la MCP puede ser inducida por la disminución de T y de la FSH, debido a que ambas hormonas actúan como factores de supervivencia de las células germinales. Sin embargo, en nuestro trabajo el aumento en la muerte de células testiculares no se debe a la disminución de testosterona, ya que este esteroide no disminuyó. Es probable que tanto el MEZ como la DAI hayan tenido efecto directo sobre el testículo fetal, principalmente a nivel de las células de Sertoli o directamente en las espermatogonias, causando alteraciones a nivel genético, favoreciendo la expresión de genes y proteínas pro-apoptóticas, lo que explicaría el incremento en la apoptosis en la etapa adulta. Esto quedaría por ser demostrado en futuros estudios.

Por lo tanto, la exposición prenatal a compuestos estrogénicos conduce a una reducción en el tamaño testicular y en el peso de los órganos reproductivos, lo anterior puede deberse al efecto estrogénico del MEZ sobre los epitelios glandulares, causando pérdida de células germinales debido a una disminución en la proliferación de las células de Sertoli en la etapa prenatal, debido a que en la etapa adulta estas células pueden mantener un determinado número de células germinales, esta reportado que el número de células de Sertoli determina el tamaño testicular, así como la producción diaria de espermatozoides (Meena, *et al.*, 2017). Las concentraciones de T no mostraron cambios en la descendencia masculina.

10.2.4 Parámetros espermáticos

La exposición prenatal al MEZ y a la DAI causó reducción de la calidad espermática, disminuyendo los porcentajes de viabilidad y de movilidad, así como la concentración espermática.

Se ha reportado que el desarrollo normal de la espermatogénesis requiere de un adecuado cociente numérico entre células de Sertoli y células germinales, puesto que el número de células germinales está directamente relacionado con el número de células de Sertoli, esta dependencia de las células germinales se debe a que las células de Sertoli tienen una capacidad fija y limitada para sostener un número de células germinales, debido a que crean un ambiente especializado para la regulación y el desarrollo de la espermatogénesis (Retana-Márquez, S. *et al*, 2012).

Si la proliferación de células de Sertoli fue afectada por los fitoestrógenos contenidos en el MEZ durante alguna etapa crítica del desarrollo, esto pudo haber ocasionado la disminución en la concentración espermática de la rata macho.

En los parámetros de movilidad y viabilidad, su disminución podría explicarse debido a que se ha demostrado que el estrés oxidante, en el testículo incrementa el número de espermatozoides con baja movilidad y viabilidad.

Como se mencionó anteriormente los fitoestrógenos son considerados DE. Los DE se han asociado con la disminución de la calidad de los espermatozoides y el aumento de las anomalías en los órganos reproductores masculinos debido a que incrementan la generación de especies reactivas del oxígeno ERO (Tavares, *et al*, 2016).

Tanto las poblaciones humanas como los animales están continuamente expuestas a DE a través de la dieta, el contacto dérmico y / o la inhalación, por lo tanto, pueden comprometer la salud reproductiva masculina (Tavares, *et al*, 2016).

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción de ERO (especies reactivas de oxígeno) y su eliminación ineficaz por los sistemas antioxidantes

disponibles, y tanto las células espermatogénicas como los espermatozoides son blancos potenciales de las ERO (Retana-Márquez, S. *et al*, 2012).

Diversos estudios demuestran que las espermatogonias tienen una gran tolerancia al ataque de las ERO, mientras que, en fases más avanzadas de las células germinales, tales como los espermatozoides, son mucho más susceptibles, ya que la actividad y la expresión de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa disminuyen en los espermatocitos y en las espermatidas (Retana-Márquez, S. *et al*, 2012).

Por otro lado, la exposición neonatal de ratas machos a GEN genera aumento en el número de espermatozoides inmaduros, con disminución significativa de la movilidad, así como inhibición del desarrollo testicular a corto y a largo plazo. En consecuencia, el número de crías por camada descendientes de dichos machos disminuyó (Lenis, *et al.*, 2010).

La administración perinatal de daidzeína y genisteína reduce la espermatogénesis, la concentración y la calidad de los espermatozoides epididimarios (Yu, *et al.*, 2013). Por lo tanto, es probable que el MEZ pueda ejercer un efecto estrogénico en el testículo, y aumentar las ERO, lo que repercute en una baja calidad espermática. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar la generación de ERO en los testículos y epidídimo de ratas tratadas con fitoestrógenos.

10.2.5 Concentraciones séricas de testosterona

A diferencia de lo que se ha reportado anteriormente, en este trabajo no se observó disminución de la concentración sérica de T en la etapa adulta.

La exposición de los machos a la genisteína durante el desarrollo embrionario genera niveles elevados de FSH y LH asociados con bajos niveles de T en la etapa adulta. Los fitoestrógenos pueden inhibir la síntesis de andrógenos, así como disminuir la capacidad de respuesta de las células de Leydig a la LH y, en consecuencia, causar disminución de T (Meena, *et al.*, 2017). El que en este estudio no se hayan observado niveles bajos de T en los machos expuestos prenatalmente al MEZ podría deberse a la baja concentración de fitoestrógenos presentes en el extracto.

11. CONCLUSIONES

La exposición prenatal de hembras y machos al MEZ causa alteraciones reproductivas en la etapa adulta en ambos sexos.

Las alteraciones causadas son de tipo estrogénico en el ciclo estral y en la apoptosis testicular, pero de tipo antiestrogénico en la expresión de la conducta sexual femenina y masculina.

Los efectos del MEZ fueron mucho más drásticos en la descendencia masculina que en la femenina, lo que indica que el desarrollo prenatal de los machos es mucho más sensible a los fitoestrógenos que el de las hembras.

Estos resultados fortalecen la idea de que el forraje a base de leguminosas con contenido fitoestrogénico puede causar alteraciones reproductivas importantes no sólo en los animales adultos, sino también en los animales en desarrollo.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, N. R. (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science*, 73(5), 1509–1515.
- Arnold, A. P. (2009). The organizational–activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Hormones and Behavior*, 55(5), 570–578. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.011>
- Attia, D. m. a., & Ederveen, A. g. h. (2012). Opposing roles of ER α and ER β in the genesis and progression of adenocarcinoma in the rat ventral prostate. *The Prostate*, 72(9), 1013–1022. <https://doi.org/10.1002/pros.21507>
- Bateman, H. L., & Patisaul, H. B. (2008). Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased gnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*, 29(6), 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.06.008>
- Belcher, S. M. (2008). Rapid Signaling Mechanisms of Estrogens in the Developing Cerebellum. *Brain Research Reviews*, 57(2), 481. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.020>
- Belcher, S. M., & Zsarnovszky, A. (2001). Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(2), 408–414.
- Bonilla, C. A. (2004). Isoflavones in gynecology, non conventional therapy. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, 55(3), 209–217.

- Bottino, M. C., & Lanari, C. (2010). Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina (Buenos Aires)*, 70(2), 173–184.
- Carmichael, S. L., Cogswell, M. E., Ma, C., Gonzalez-Feliciano, A., Olney, R. S., Correa, A., & Shaw, G. M. (2013). Hypospadias and Maternal Intake of Phytoestrogens. *American Journal of Epidemiology*, 178(3), 434–440. <https://doi.org/10.1093/aje/kws591>
- Carrasco, M., Salinas, A., Mangione, A. M., & Gil, E. R. (2010). Efecto fitoestrogénico del extracto metanólico de frutos de *Prosopis torquata* (Cav. ex Lag.) en ratas Wistar hembras púberes. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(3). <http://hdl.handle.net/10915/7916>
- Carrillo, B., Collado, P., Díaz, F., Chowen, J. A., Pérez-Izquierdo, M. Á., & Pinos, H. (2017). Physiological and brain alterations produced by high-fat diet in male and female rats can be modulated by increased levels of estradiol during critical periods of development. *Nutritional Neuroscience*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1349574>
- Cervantes R. M. C. (1983). El Mezquite (*Prosopis* Spp). Retrieved October 2, 2017. http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/0965822/07_c03.pdf
- Cordero, J., Boshier, D., & Enseñanza, C. A. T. de I. y. (2003). Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. Bib. Orton IICA / CATIE.
- Degen, G. H., Janning, P., Diel, P., Michna, H., & Bolt, H. M. (2002). Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Archives of Toxicology*, 76(1), 23–29. <https://doi.org/10.1007/s00204-001-0305-7>
- Díaz-Yamal, I., & Munévar-Vega, L. (2009). Phytoestrogens: a topic review. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, 60(3), 274–280.
- Duffy J. Emmett, Cardinale Bradley J., France Kristin E., McIntyre Peter B., Thébault Elisa, & Loreau Michel. (2007). The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecology Letters*, 10(6), 522–538. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01037.x>

- Escamilla J, C, I., Cuevas M, E, Y., & Guevara F, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes, 52(2), 73–75.
- Flynn, K. M., Ferguson, S. A., Delclos, K. B., & Newbold, R. R. (2000). Effects of Genistein Exposure on Sexually Dimorphic Behaviors in Rats. *Toxicological Sciences*, 55(2), 311–319. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.2.311>
- Freeman, M., & Freeman, J. B. (2006). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. <https://doi.org/10.1016/b978-012515400-0/50048-8>
- González, A. R., & Velásquez, J. M. A. (2005). Nuevos disruptores endocrinos: su importancia en la población pediátrica. 18(4), 446–456.
- González Quijano G. K., Muñoz G. M., Romero R. C., Dorantes A. L., Porra M.R., San M. M. E., & Guerrero L. I. (2015). LX Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43713115>
- Guzmán, C., & Zambrano, E. (2007). Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Revista de Investigación Clínica*, 59(1), 73–81.
- Harzallah-Skhiri, F., & Ben Jannet, H. (2005). Flavonoids Diversification in Organs of Two *Prosopis Farcta* (Banks & Sol.) Eig. (Leguminosea, Mimosoideae) Populations Occurring in the Northeast and the Southeast of Tunisia. *Journal of Applied Sciences Research*, 1(2), 130–136.
- Haya J., Castelo-Branco C., & Pérez-Medina. T. (2002). Fitoestrógenos: conocimientos básicos y utilidad clínica. *Toko-Ginecología Práctica*, 61(663), 337–362.
- Herrera G. H, Vergara O. M., (primero), Rosales T. A., & Rosado G. A. (2005). Diferenciación sexual en el sistema nervioso central, 36(3), 339–360.
- Hertrampf, T., Ledwig, C., Kulling, S., Molzberger, A., Möller, F. J., Zierau, O. Diel, P. (2009). Responses of estrogen sensitive tissues in female Wistar rats to pre and postnatal isoflavone exposure. *Toxicology Letters*, 191(2-3), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.019>

- Jarrell, J., Foster, W. G., & Kinniburgh, D. W. (2012). Phytoestrogens in Human Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology International*, 2012(2012), 7. <https://doi.org/850313>
- Jefferson, W. N., Patisaul, H. B., & Williams, C. J. (2012). Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction (Cambridge, England)*, 143(3), 247–260. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0369>
- Jefferson, W. N., & Williams, C. J. (2011). Circulating Levels of Genistein in the Neonate, Apart from Dose and Route, Predict Future Adverse Female Reproductive Outcomes. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 31(3), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.10.001>
- Jorge-Rivera. (1998). Dimorfismo sexual en el cerebro, 1(2), 1–13.
- Kennedy, D. O. (2014). Polyphenols and the Human Brain: Plant “Secondary Metabolite” Ecologic Roles and Endogenous Signaling Functions Drive Benefits¹². *Advances in Nutrition*, 5(5), 515–533. <https://doi.org/10.3945/an.114.006320>
- Kim, J. S., Rizwan, M. Z., Clegg, D. J., & Anderson, G. M. (2016). Leptin Signaling Is Not Required for Anorexigenic Estradiol Effects in Female Mice. *Endocrinology*, 157(5). <https://doi.org/10.1210/en.2015-1594>
- Komine, C., Nakajima, S., Kondo, Y., Horii, Y., Yoshida, M., & Kawaguchi, M. (2017). Effects of neonatal 17 α -ethinyloestradiol exposure on female-paced mating behaviour in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, 37(8), 996–1003. <https://doi.org/10.1002/jat.3449>
- Kouki, T., Kishitake, M., Okamoto, M., Oosuka, I., Takebe, M., & Yamanouchi, K. (2003). Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. *Hormones and Behavior*, 44(2), 140–145.
- Lehmann, M. L., & Erskine, M. S. (2004). Induction of pseudopregnancy using artificial VCS: importance of lordosis intensity and prestimulus estrous cycle length. *Hormones and Behavior*, 45(2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.09.011>

- Lenis S., Y., Gómez, G. M. T., & Tarazona., M. A. M. (2010). Phytoestrogen Effects On Animal Reproduction. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2), 5555–5565.
- Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. (2010, May). http://148.206.32.94/informacion/consejo_divisional/lineamientos/LINEAMIENTOSDEETICA2012.pdf
- López Matías, E., & Castro, A. M. J. A. N. (2014). Respuesta de la regeneración natural de mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.) en tratamientos del suelo y vegetación en Zaragoza Coahuila México. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/1081>
- Lucio, R. A., Tlachi, J. L., López, A. A., Zempoalteca, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2009). Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Veterinaria México*, 40(4), 405–415.
- MacLusky, N. J., & Naftolin, F. (1981). Sexual Differentiation of the Central Nervous System. *Science*, 211(4488), 1294–1303.
- MacLusky, N. J., & Naftolin, F. (1981). Sexual differentiation of the central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4488), 1294–1302.
- Malekinejad, H., Schoevers, E. J., Daemen, I. J. J. M., Zijlstra, C., Colenbrander, B., Fink-Gremmels, J., & Roelen, B. A. J. (2007). Exposure of oocytes to the Fusarium toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. *Biology of Reproduction*, 77(5), 840–847. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062711>
- Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Current Genomics*, 7(8), 497–508.
- Meena, R., Supriya, C., Pratap Reddy, K., & Sreenivasula Reddy, P. (2017). Altered spermatogenesis, steroidogenesis and suppressed fertility in adult male rats exposed to genistein, a non-steroidal phytoestrogen during

embryonic development. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 70–77 .
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.020>

- Navarro M. C., & Beltrán E. M. (2000). Fitoestrógenos Posibilidades Terapéuticas. *Revista de Fitoterapia*, 1(3), 165–180.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).
<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- Pan, L., Xia, X., Feng, Y., Jiang, C., Cui, Y., & Huang, Y. (2008). Exposure of juvenile rats to the phytoestrogen daidzein impairs erectile function in a dose-related manner in adulthood. *Journal of Andrology*, 29(1), 55–62.
<https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003392>
- Patel, S., Peretz, J., Pan, Y.-X., Helferich, W. G., & Flaws, J. A. (2016). Genistein Exposure Inhibits Growth and Alters Steroidogenesis in Adult Mouse Antral Follicles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 293, 53–62.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.026>
- Patisaul, H. B. (2005). Phytoestrogen action in the adult and developing brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(1), 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01268.x>
- Patisaul, H. B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(4), 400–419.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.03.003>
- Pérez-Rivero, J.-J., Aguilar-Setién, A., Martínez-Maya, J.-J., Pérez-Martínez, M., & Serrano, H. (2007). Los Fitoestrógenos y el Efecto de su Consumo en Diferentes Órganos y Sistemas de Animales Domésticos. *Agricultura Técnica*, 67(3), 325–331. <https://doi.org/10.4067/S0365-28072007000300012>
- Piotrowska, K., Baranowska-Bosiacka, I., Marchlewicz, M., Gutowska, I., Noceń, I., Zawiślak, M., ... Wiszniewska, B. (2011). Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 27(3), 372–379.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.03.010>

- Prabha, D. S., Hans-Uwe Dahms, & Prabha Malliga. (2014). Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp. a review, 2(11), 918–924. <https://doi.org/doi: 10.12980/JCLM.2.2014J27>
- Retana-Marquez, S., Delgadillo, S. J., & Keller, M. (2012). Avances en biología de la reproducción 2012. México: UAM.
- Retana-Marquez, S., Hernandez, E., Solano, F., Romero, C., Lopez, G., Juarez-Rojas, L., Delgadillo, J. A. (2016). Mesquite (*Prosopis juliflora*) pod extract decreases fertility in female but not male rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10(46), 984–994. <https://doi.org/10.5897/AJPP2016.4682>
- Roa, I., Smok S, C., & Prieto G, R. (2012). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490–1496. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400036>
- Rodriguez-Gomez, A., Filice, F., Gotti, S., & Panzica, G. (2014). Perinatal exposure to genistein affects the normal development of anxiety and aggressive behaviors and nitric oxide system in CD1 male mice. *Physiology & Behavior*, 133, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.020>
- Rodríguez T. D. (2014). Arbustivas forrajeras en las zonas árida y semiárida del estado de Zacatecas. UAMVZ - UAZ. Retrieved from http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/32/2013/trimestrales/ane_xo_1166-5-2014-02-4.pdf
- Ruiz Tavares, D. R. (2011). Uso potencial de la vaina de mezquite para la alimentación de animales domésticos del Altiplano potosino. Retrieved from <http://ninive.uaslp.mx/jspui/handle/i/3648>
- Saucedo, E. N. R., Martínez, G. E. R., Valverde, B. R., Ruiz, R. M., Hermida, M. de la C. C., Torres, S. M. M., & Ruiz, H. H. P. (2014). Análisis Técnico del Árbol del Mezquite (*Prosopis Laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd.) En México. *Ra Ximhai*, (10), 3.

- Setchell, K. D. R., & Clerici, C. (2010a). Equol: History, Chemistry, and Formation. *The Journal of Nutrition*, 140(7), 1355S–1362S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119776>
- Setchell, K. D. R., & Clerici, C. (2010b). Equol: pharmacokinetics and biological actions. *The Journal of Nutrition*, 140(7), 1363S–8S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119784>
- Sirmah, P., Dumarçay, S., Masson, E., & Gérardin, P. (2009). Unusual amount of (-)-mesquitol from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Natural Product Research*, 23(2), 183–189. <https://doi.org/10.1080/14786410801940968>
- Sirtori, C. R., Arnoldi, A., & Johnson, S. K. (2005). Phytoestrogens: end of a tale? *Annals of Medicine*, 37(6), 423–438. <https://doi.org/10.1080/07853890510044586>
- Smith, M. J., & Jennes, L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(1), 1–10.
- Solís Sánchez, G., Sánchez, S., L, J., & Díaz González, T. (2001). Exposición prenatal a drogas y efectos en el neonato. *Trastornos Adictivos*, 3(4), 256–262.
- Talsness, C., Grote, K., Kuriyama, S., Presibella, K., Sterner-Kock, A., Poça, K., & Chahoud, I. (2015). Prenatal exposure to the phytoestrogen daidzein resulted in persistent changes in ovarian surface epithelial cell height, folliculogenesis, and estrus phase length in adult Sprague-Dawley rat offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 78(10), 635–644. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1006711>
- Tavares, R. S., Escada-Rebelo, S., Correia, M., Mota, P. C., & Ramalho-Santos, J. (2016). The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. *Reproduction*, 151(1). <https://doi.org/10.1530/REP-15-0355>

- Toledo M. V., Batis I. A., Becerra R., Martínez E., & Ramos H. C. (1995). La Selva Útil: Etnobotánica Cuantitativa de los grupos indígenas del trópico Húmedo de México., 20(4), 177–187.
- Wang, C.-T., Shui, H.-A., Huang, R.-L., Tai, M.-Y., Peng, M.-T., & Tsai, Y.-F. (2006). Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. *Neuroscience*, 138(2), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.026>
- Wocławek-Potocka, I., Mannelli, C., Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Waśniewski, T., & Skarżyński, D. J. (2013). Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 650984. <https://doi.org/10.1155/2013/650984>
- World Health Statistics. (2010). http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS10_Full.pdf
- Yu, C., Tai, F., Zeng, S., & Zhang, X. (2013). Effects of perinatal daidzein exposure on subsequent behavior and central estrogen receptor α expression in the adult male mouse. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 43, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.12.015>
- Zierau, O., Kretzschmar, G., Möller, F., Weigt, C., & Vollmer, G. (2008). Time dependency of uterine effects of naringenin type phytoestrogens in vivo. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 294(1-2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.08.008>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00053

Matricula: 2153803708

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN
PRENATAL AL EXTRACTO DE LA
VAINA DE MEZQUITE (*Prosopis
juliflora*) SOBRE PARAMETROS
REPRODUCTIVOS EN LA
DESENDERENCIA FEMENINA Y
MASCULINA EN LA ETAPA ADULTA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 5 del mes de abril del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

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

Bajo la Presidencia de la primera 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:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: FLORIBERTA SOLANO SILVA

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

Aprobar

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



FLORIBERTA SOLANO SILVA
ALUMNA

REVISÓ
[Signature]
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. ADRIANA LIZBETH JUAREZ ROJAS

VOCAL

[Signature]
DRA. LETICIA GONZALEZ NUÑEZ

VOCAL

[Signature]
DR. JOSE GERARDO PERERA MARIN

SECRETARIA

[Signature]
MTRA. GABRIELA LOPEZ