



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA REPRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN EL TESTÍCULO DE
PERROS TRATADO IN VITRO CON COUMESTROL**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ROSANA RAMÍREZ RAMÍREZ

TUTOR:

HÉCTOR FERNANDO SERRANO

COMITÉ TUTORAL:

MARIO PÉREZ MARTÍNEZ

ALEJANDRO VILLA GODOY



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS:

GRACIAS DIOS POR LAS INFINITAS BENDICIONES QUE ME HAS PROPORCIONADO AL ENCONTRAR BELLAS PERSONAS QUE SIEMPRE ME HAN APOYADO, POR DOTARME DE PACIENCIA Y PERSEVERANCIA.

A MIS PADRES POR SU ETERNO E INCONDICIONAL APOYO Y AMOR, POR SOPORTAR TODOS MIS INTEMPESTIVOS CAMBIOS DE HUMOR Y POR ENSEÑARME A SER CADA DÍA MEJOR PERSONA. ESPECIALMENTE A TI MAMI POR TU EJEMPLO DE ENTERESA.

A MIS HERMANOS Y A SUS LINDAS FAMILIAS, POR ESTAR SIEMPRE PENSANDO EN MI Y Y POR DARMÉ ANIMOS Y ALEGRÍAS PARA SEGUIR ADELANTE.

A MIS TIOS JOSEFA Y ARTURO POR SU APOYO Y CARIÑO INCONDICIONAL EN TODO MOMENTO.

A MIS ABUELOS QUE SIEMPRE FUERON EJEMPLO DE HUMANIDAD, TRABAJO Y RESPETO A LOS DEMÁS. EN DONDE QUIERA QUE SE ENCUENTREN...! LOS AMO!.

CON CARIÑO A MIS PRIMOS, ESPECIALMENTE A TI JORGE EDUARDO (†) ...POR TU ALEGRE MANERA DE SER QUE ME ARRANCABA SIEMPRE UNA SONRISA CUANDO MÁS TRISTE ESTABA.

A TODOS MIS PROFESORES, MI FAMILIA, EN LA UAM-I Y UNAM POR SER LA LUZ QUE HA GUÍADO CON CERTEZA MI VIDA PROFESIONAL

AGRADECIMIENTOS:

AL DR. HÉCTOR FERNANDO SERRANO POR GUIAR MIS PASOS EN EL ÁMBITO PROFESIONAL Y COMO PERSONA, POR TODA SU VALIOSA ENSEÑANZA Y SOBRE TODO POR SU INFINITA PACIENCIA, APOYO, CONFIANZA Y AMISTAD.

AL DR. MARIO PÉREZ MARTÍNEZ POR SUS ATINADOS CONSEJOS Y SUGERENCIAS Y POR DEMOSTRARME SU FRECUENTE APOYO Y PREOCUPACIÓN POR MI BIENESTAR.

AL DR. ALEJANDRO VILLA GODOY, POR SU SINCERIDAD Y ATINADOS CONSEJOS.

AL DR. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO, POR SU VALIOSA ENSEÑANZA Y APRECIABLE APOYO.

AL DR. ARTURO SALAME POR SUS CONSEJOS, POR SU APOYO Y POR SU OPTIMISMO.

A LA DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR POR SU APOYO Y CONFIANZA.

AL DR. JUÁN JOSÉ PÉREZ RIVERO POR SU INCONDICIONAL APOYO, POR SUS CONSEJOS Y POR SU AMISTAD.

ÍNDICE:

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....I

ABSTRACT.....II

Pg.

INTRODUCCIÓN.....1

Acción y efecto de los fitoestrógenos

Estrógenos

Distribución de los ER α y ER β en el organismo

Representación esquemática de la estructura modular de los ERs

Consecuencias de la sobrepoblación canina

Principales enfermedades zoonóticas asociadas a la población canina

Antecedentes de control reproductivo en perros

Estudios del efecto del coumestrol en el tejido testicular *in vivo*

Antecedentes del proceso de microencapsulamiento

Propiedades físicas y químicas del alginato

Utilización del alginato en el encapsulamiento de distintos tejidos para estudios *in vitro*

JUSTIFICACIÓN.....16

HIPÓTESIS.....17

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS PARTICULARES

MATERIALES Y MÉTODOS.....18

Animales

Obtención de tejido testicular

Metodología de encapsulamiento de tejidos

RESULTADOS.....21

DISCUSIÓN.....24

REFERENCIAS.....28

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha descubierto que diversas sustancias producidas por algunas plantas poseen propiedades especiales que son utilizadas en el tratamiento de diferentes padecimientos. El origen de ellas varía pues mientras algunas se obtienen de la cáscara de los frutos como el resveratrol, un flavonoide con actividad anti cancerígena, antiviral y usado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Campagna y Rivas, 2003; Brown et. al., 2009); otras se obtienen de legumbres y forrajes.

Los fitoestrógenos (FES) son compuestos fenólicos o difenólicos no esteroides que inducen una respuesta estrogénica o antiestrogénica dosis-dependiente en diversos tejidos como en el cerebro, corazón, hígado y, sobre todo, en los tejidos reproductivos de diversas especies de animales. En estos tejidos, producen alteraciones fisiológicas e histológicas (McClain et. al., 2006). Los fitoestrógenos mejor caracterizados son los flavonoides entre los cuales se encuentran las isoflavonas como la ginesteína; los lignanos como la enterolactona; y los coumestanos como el coumestrol (Whitten et. al., 1991). En el cuadro 1 se muestran las fuentes principales de los grupos de fitoestrógenos mejor caracterizados.

Acción y efecto estrogénico de los FES

Los fitoestrógenos tienen el potencial de ejercer tanto efectos benéficos como adversos (tabla 2). Aún cuando no tienen la estructura típica de los estrógenos (figura 1), son capaces de unirse a las dos isoformas de receptores estrogénicos (ER α y ER β), resultando en la alteración de la actividad estrogénica, dependiente de la dosis, lo que les da la característica de agonistas o antagonistas estrogénicos (Kuiper et al., 1998).

Como agonistas, ayudan a disminuir los trastornos hormonales en las mujeres menopáusicas, pero al mismo tiempo les estimulan el crecimiento de células carcinogénicas en sus mamas (Jordan et al, 1985).

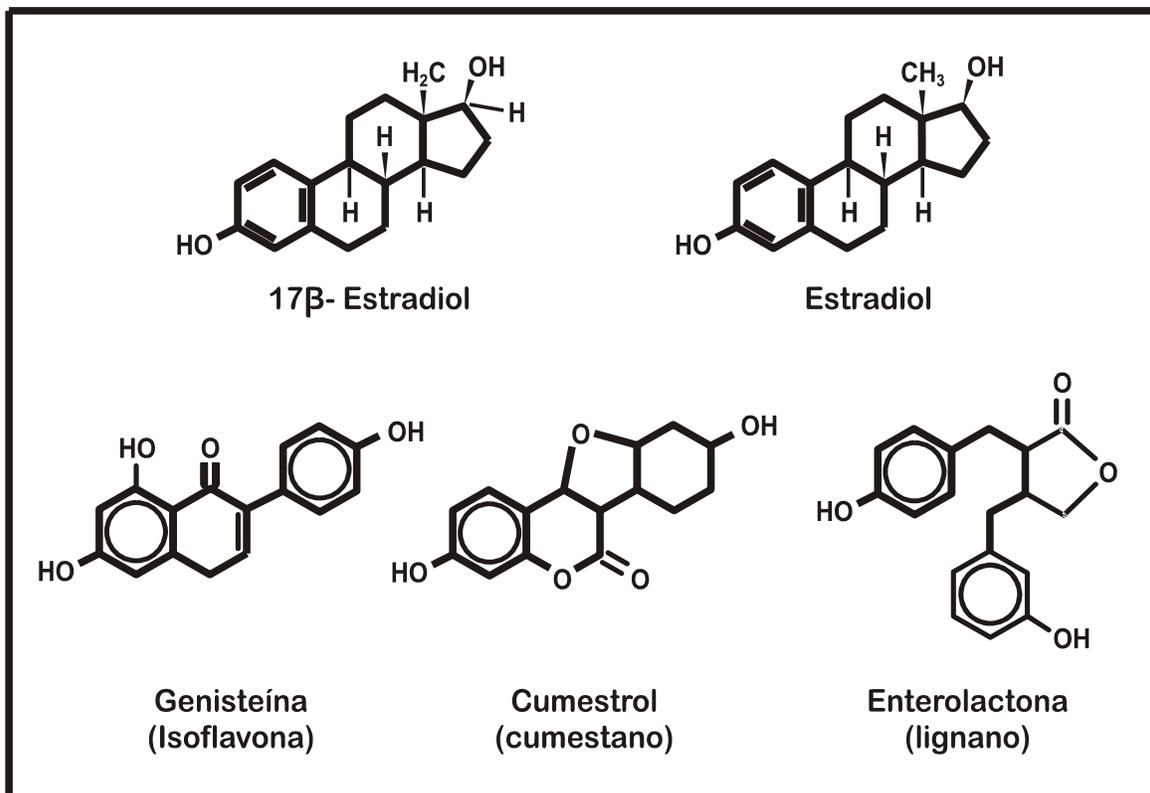
Como agentes antagonistas de la actividad estrogénica o antiproliferativa, ayudan en la prevención de cáncer dependiente de estrógenos; inducen estados de infertilidad ya que suprimen la función reproductiva normal; son capaces de interrumpir la diferenciación sexual alterando los patrones de desarrollo específicos del sexo. Estos efectos se agregan a su capacidad de ser protectores contra otros estrógenos ambientales, alterando los umbrales de respuesta a esteroides (Whitten et. al., 1995).

Cuadro 1. Clasificación de algunos fitoestrógenos y sus principales fuentes.

| Fitoestrógenos | Especies | Fuente Natural de Obtención |
|-----------------------|-------------------------------------|---|
| Isoflavonas | Ginesteina, Daidzeína, Biochanina A | Soya, lentejas, garbanzos y otras legumbres (Navarro, 2001) |
| Lignanós | Enterodiol, Enterolactona | En la pared celular de frutas y cereales (trigo, cebada, lúpulo, arroz, centeno) y semillas de lino (Navarro, 2001) |
| Coumestanos | Coumestrol | Germen de alfalfa o alfalfa madura contaminada con el hongo <i>Pseudopeziza medicaginis</i> (Romero et. al., 1997) Germen de Trébol rojo, semillas de girasol (Jacob <i>et al.</i> , 2001) |

De la misma manera, existen evidencias experimentales que comprueban las alteraciones sexuales producidas por los fitoestrógenos a nivel histológico, fisiológico y conductual en diversas especies como en roedores, ovejas y bovinos como se muestra en el cuadro 2.

Fig 1. Estructura química de estrógenos y de algunos fitoestrógenos. La característica común de estos compuestos es el anillo α . En la parte superior se muestran las hormonas esteroides y en la inferior los fitoestrógenos. Disponible en los URL www.medchem.rutgers.edu/MedChemII/graphics/estradiol.png&imgrefurl y www.antioxidantes.com.ar/Imagenes/art211_G1.gif.



Cuadro 2. Efecto de diferentes fitoestrógenos sobre la reproducción de los animales experimentales, de vida silvestre o importancia económica. Abreviaturas utilizadas: IV:intravenoso; H: hembras; M: machos; µg: microgramo; SC: Subcutáneo. Tomado de Pérez-Rivero *et al.*,2007.

| Animal | Edad | Sexo | Fitoestrógeno | Dosis y vía | Efecto | Referencia |
|----------------------|---------|------|---------------|--|--|----------------------------------|
| Rata Wistar | 2 días | M | Coumestrol | 4 mg kg-1 d-1 SC por 16 días | Disminución de lumen de túbulos seminíferos, incremento del índice apoptótico en células germinales | Atanassova <i>et. al.</i> , 2000 |
| Rata Wistar | Adultas | H | Coumestrol | 0,4-1,6 mg IV por 8,5h | Inhibición de la hormona luteinizante (LH) por inhibición de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) | McGarvey, <i>et. al.</i> ,2001 |
| | | H | Genisteina | 1,6 mg IV por 8,5 h | | |
| Rata Sparague Dawley | Adultas | H | Coumestrol | 100 mg kg-1 en la dieta por 10 días | Anovulación, supresión de LH | Shaw y McCully, 2002 |
| | | M | | | Supresión de conducta sexual como monta y eyaculación | |
| Bovinos | Adultos | M | Coumestrol | 66,8 mg kg-1 en alfalfa seca como pastura vía oral | Metaplasia glandular y epitelial en próstata y glándulas bulbo-uretrales, disminuye la maduración de espermatozoides | Pike <i>e.t al.</i> , 1999 |
| Ovejas | Adultos | H | Coumestrol | 25 mg kg-1 oral en la pastura | Crecimiento uterino, descargas vaginales, desarrollo mamario, ovarios quísticos, estros irregulares | Adams, 1995 |

Estrógenos

Las hormonas esteroides son compuestos derivados del colesterol, sintetizados en respuesta a señales endócrinas; ejercen su efecto durante el crecimiento, el desarrollo de

tejidos y en la homeostasis del cuerpo. Se clasifican en glucocorticoides, mineralocorticoides y los esteroides sexuales que regulan la reproducción y el desarrollo de las características sexuales secundarias en machos y hembras. Los esteroides sexuales incluyen a los andrógenos como la testosterona, a los estrógenos como el estradiol y a los progestágenos como la progesterona (Lewin, 2004). Los estrógenos son moléculas lipofílicas, de gran importancia en la función reproductiva tanto en la hembra como en el macho, por lo que se sintetizan tanto en el ovario como en los testículos. En el macho joven, los estrógenos son sintetizados en las células de Sertoli y en adultos se sintetizan tanto en las células de Leydig, como en las de Sertoli (Hess 2003).

Dada su naturaleza, estas hormonas atraviesan la membrana plasmática por difusión y una vez en el citoplasma se unen a una proteína específica (receptor) formando un complejo hormona-receptor. Esta unión induce un cambio en la conformación del receptor de tal suerte que dominios que estaban ocultos ya sea por el arreglo que permanece estable en la estructura terciaria o por la unión a otras proteínas como serían las de choque térmico permite que surjan y se hagan funcionalmente activos. Este es el caso de una secuencia de aminoácidos cercana al extremo amino terminal y que ha sido nombrada “secuencia de localización nuclear” o NLS por sus siglas en inglés. La NLS permite al receptor interactuar con proteínas transportadoras que llevan el complejo hormona-receptor al complejo de poro en la envoltura nuclear. En este complejo, la interacción con las diversas proteínas que lo conforman lo transportan direccionalmente para que alcance el nucleoplasma (Pérez-Rivero *et al.*, 2005).

Una vez dentro del núcleo, la unión del complejo hormona-receptor a secuencias específicas denominadas “elementos de respuesta” localizadas dentro del promotor de los genes que se transcribirán en respuesta a la estimulación hormonal permite el ensamble de un complejo que incluye a la RNA polimerasa II (RNAPol II) que es quien finalmente realiza la síntesis del mRNA (Pérez-Rivero *et al.*, 2007). Además de estos efectos que alteran la expresión de los genes, la unión de esteroides a receptores de membrana llevan a cabo otras acciones que no implican la síntesis de RNA por lo que se han denominado efectos no genómicos. Dentro de ellos, la síntesis de óxido nítrico (NO), activación de fosfolipasas y transporte de iones mono y divalentes, son los mejor caracterizados (Pérez-Rivero *et al.*, 2005).

La unión de la hormona al receptor puede tener una temporalidad diferente, dependiendo de varias circunstancias algunas de las cuales aún no han sido totalmente dilucidadas. Sin embargo, podemos indicar que el efecto puede durar horas o días e influyen en el crecimiento y diferenciación de tejidos específicos como el del testículo, en donde las hormonas son sintetizadas por las células de Leydig y en las células germinales (Rommerts & Brinkman, 1981). También juegan un papel importante en el mantenimiento de los huesos, en el sistema nervioso central y en el sistema cardiovascular en el que juega un papel cardioprotector (Kuiper et. al., 1998).

Se ha reportado la existencia de dos isoformas de receptores a estrógenos, ER α y ER β , estructuralmente similares, pero con diferencia en la región carboxílica de unión al ligando y en el dominio amino terminal de transactivación mediante el cual interactúan con otras proteínas, incluyendo los factores generales de la transcripción, la RNAPol II, proteínas activadoras y co-represores (Kuiper et. al., 1998). En la figura 2 se puede observar el esquema estructural de las dos variantes de ER α y ER β .

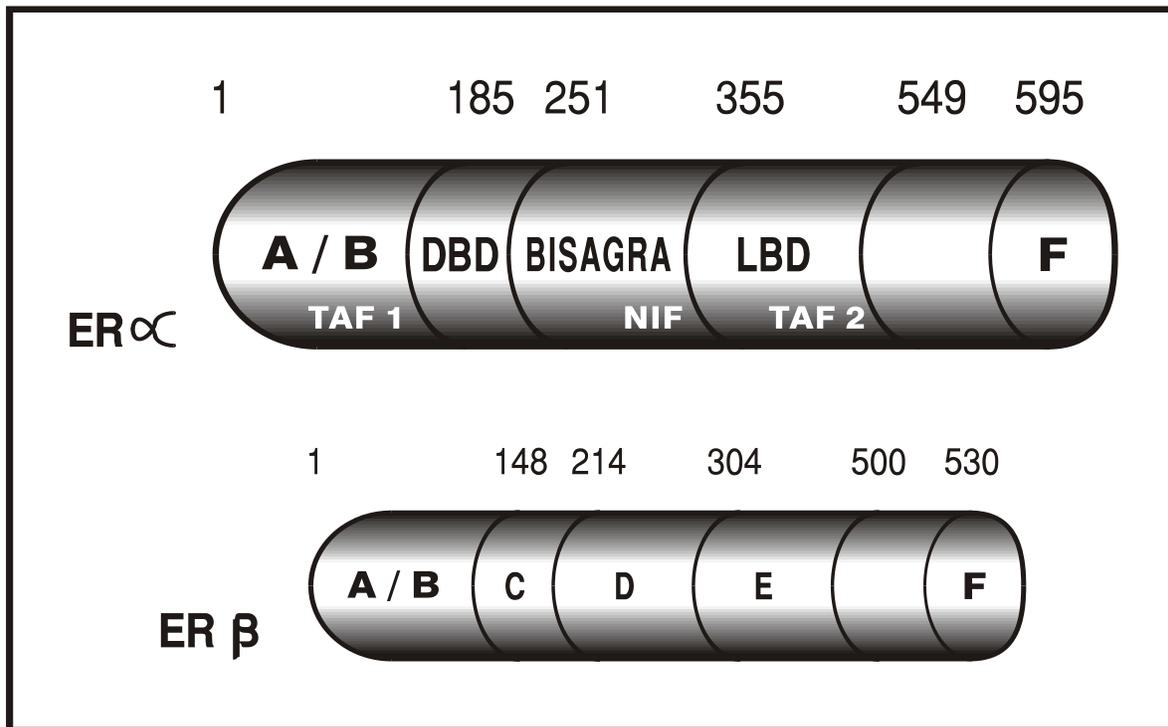
Distribución de los ER α y ER β en el organismo

Los estudios de Northern Blot, RT-PCR e hibridación *in situ* permitieron determinar los sitios de expresión de los ER; se encontró que receptores ER β se expresan en la próstata, ovario, epidídimo, testículos, vejiga, útero, pulmón, timo, colon, intestino delgado, epitelio que recubre los vasos sanguíneos (endotelio), pituitaria, hipotálamo, cerebelo y corteza cerebral (Kuiper et. al., 1998).

Métodos similares han mostrado que la expresión de los ER α es más limitada pues se encuentran en el útero, hígado, mama y riñón, así como en el ovario, cerebro, hueso, sistema cardiovascular y mama (Navarro, 2001)

Se han encontrado que existe homología entre el ER α y ER β en la rata, el ratón y el humano (Kuiper et al, 1998). Su distribución es abundante en el epitelio del conducto eferente en especies como ratón, rata, macho cabrío, borrego, perro, entre otros. En algunas especies, los ER α están presentes en el epidídimo y en la mayoría de ellas y los ER β se presentan tanto en el epidídimo como en los vasos deferentes. La estructura modular de los receptores se muestra en la figura 2. Como puede observarse, la longitud de ambos es diferente. Sin embargo, mantienen regiones en común como son los dominios en los cuales se une el ligando (LBD) que si comparamos su secuencia de aminoácidos y por supuesto la de nucleótidos es la menos conservada y que por ende le brinda especificidad y características diferenciales a cada uno de ellos permitiendo que la interacción con diferentes moléculas pueda tener un efecto análogo o como competidor con el ligando específico (Pérez-Rivero et. al., 2007).

Fig 2. Representación esquemática de la estructura modular de los receptores estrogénicos (ER). Los números colocados encima de cada uno indican los residuos de aminoácidos que abarcan los dominios de los receptores para estrógenos. La region de unión al ADN (DBD) es la más conservada entre ambos receptores; la bisagra (D) contiene la secuencia de localización nuclear (NIF), el cual guía al receptor desde el citoplasma hacia el núcleo. La región de unión al ligando (LBD) es la menos conservada entre los dos receptores (Modificada de Pérez-Rivero *et. al.*, 2007).



Por otro lado, la región con mayor grado de conservación es el dominio de unión al DNA (DBD). Esto indica la razón por la cual no es necesario que los elementos de respuesta no tengan variaciones mayores además de una secuencia consenso corta y la distancia respecto al sitio de inicio de la transcripción en la región del promotor para que pueda llevarse a cabo la expresión de los genes que son regulados por estas proteínas (Pérez-Rivero *et. al.*, 2007). En términos generales, la estructura de estas regiones se han caracterizado como del tipo de los dedos de Zinc por la disposición espacial que adquieren para poder interactuar con el DNA y que depende de los aminoácidos serina e histidina que mantienen a los residuos de aminoácidos básicos expuestos gracias a la unión de un átomo de zinc (Pérez-Rivero *et. al.*, 2007).

Considerando las evidencias de investigaciones recientes sobre los efectos de los fitoestrógenos sobre la morfofisiología sexual de algunas animales, nuestro grupo de investigación ha propuesto el uso de este tipo de compuestos a fin de controlar la reproducción de especies que puedan tener un potencial o de facto impacto en la Salud Pública, como ocurre con el perro, evitando así, las consecuencias que surgen de la falta de control en la capacidad reproductiva y de natalidad de ésta y otras especies.

Consecuencias de la sobrepoblación canina

En los últimos años la sobrepoblación canina no domiciliada representa un problema de salud pública. El 75% de la población canina del Distrito Federal deambula por las calles (Galván Pérez et. al., 1994) y considerando que cada perro secreta aproximadamente 500 ml de orina, además de defecar un promedio de 200 gramos de heces, se generan cientos de toneladas de ellas diariamente (Faulkner, 1994). Además del inconveniente que representan las heces y orines frescos, en regiones urbanas de ciudades de países en vías de desarrollo, así como en islas o en aquellos lugares en los cuales las condiciones sanitarias no permiten su remoción inmediata, las bacterias o esporas de varios patógenos se dispersan por el aire y pueden ser aspiradas o engullidas por el hombre en quien pueden producir enfermedades zoonóticas como la leptospirosis o la enteritis eosinofílica, causando graves daños a nivel gástrico y respiratorio (Fernández Campos y Cantú Alarcón, 2002). En el cuadro 3 se muestran algunos ejemplos de las consecuencias de la sobrepoblación canina. Existen más de 65 enfermedades que afectan al hombre como consecuencia de la sobrepoblación de animales no domiciliados, tales como rabia, leptospirosis, anquilostomiasis, brucelosis, erliquiasis, cestodiasis, toxocarosis, salmonelosis, como se muestra en el cuadro 4, entre las que afectan principalmente nuestro país, (Ortega- Pacheco et. al., 2000; Ortega-Pacheco, 2001).

El control de esta problemática en México y en otras partes del mundo se ha llevado a cabo básicamente mediante la esterilización quirúrgica y el sacrificio humanitario de animales que deambulan libremente (Howe, 2006). A pesar de ello, y de la gran cantidad de recursos económicos que se destinan anualmente a ellos, los logros son limitados. En regiones en las cuales los recursos son capitalizados a programas prioritarios, la situación y el peligro latente es aún mayor.

Otro inconveniente de estas estrategias es su poca eficacia, pues los nichos que quedan vacíos por la eliminación de animales, corren el riesgo de ser ocupados por otros animales que incluso podrían ser portadores de enfermedades más graves y dañinas para el hombre (Meltzer y Rupprecht, 1998).

Cuadro 3. Efectos de la sobrepoblación canina en las grandes ciudades sobre la Salud Pública humana.

| CAUSA | EFEECTO |
|--|---|
| Contaminación ambiental por materia fecal y orina | Transmisión de enfermedades |
| Ambulantaje por las calles | Intimidación y agresión física (mordeduras) |
| | Riñas entre perros |
| | Condición de vida deplorables evidentes (desnutrición, sarna, heridas, etc) |
| | Contaminación por ruptura de bolsas de basura en busca de alimentos |
| | Arrollamiento por vehículos en movimiento; accidentes automovilísticos |

Cuadro 4. Principales enfermedades zoonóticas asociadas a la sobrepoblación canina.

| ENFERMEDAD (Agente causal) | CAUSA | AFECCION | REFERENCIA |
|--|-----------------------------------|------------------|---------------------|
| Brucelosis (<i>Brucella canis</i>) | Contacto con tejidos contaminados | Seroaglutinación | Ramirez-Lopez, 2005 |

| | | | |
|--|---|--|---|
| Cestodiasis | Ingesta de alimentos contaminados por el aire por microorganismos desprendidos de excretas. | Sistemas Gastrointestinal, inmune y nervioso | López_Moreno, 2002 |
| i) Cisticercosis (<i>Taenia solium</i>) | | | |
| ii) Hidatidosis (<i>Echinococcus multilocularis</i>) | | | |
| Leptospirosis (<i>Leptospira spp.</i>) | Contacto con la orina o tejidos de animales infectados o agua o lodos contaminados | Sistema respiratorio y reproductivo | Brown y Prescott, 2008. |
| Rabia (<i>Lissavirus, fam. Rhabdoviridae</i>) | Por mordedura de perro hacia la persona | Sistema nervioso central | Takayama, 2008. Schneider, et. al., 2005. Loza Rubio et al, 1999. |
| Toxocariosis (<i>Toxocara canis</i>) | Vía aérea o contacto con materia fecal de animales infectados | Afección entero-hepática | Burgio et al, 2009. |

Antecedentes del control reproductivo en perros

Se han desarrollado diferentes estrategias para tratar de ayudar en el control de la sobrepoblación canina. Dentro de las más destacadas se encuentran aquellas que utilizan moléculas propias de los gametos para regularla. Desde hace varias décadas, se ha demostrado que inyecciones con componentes aislados o purificados de la zona pelúcida son capaces de inducir un estado de infertilidad en las hembras. En este sentido los trabajos en roedores (Millar et. al., 1989), conejos (Skinner et. al., 1984) o en yeguas (Liu et. al., 2005), constatan una disminución en la fertilidad en las hembras tratadas. Este efecto puede deberse a los daños inducidos en los ovarios, como ocurre en la perra (Serrano y García-Suárez, 2001), y/o a la infiltración leucocitaria (Mahi-Brown et. al., 1982).

El estado de infertilidad inducido por la inmunización con componentes de la zona pelúcida, principalmente porcina se mantiene en relación directa a la presencia de anticuerpos circulantes. Cuando estos disminuyen, es necesaria la aplicación de una nueva dosis de inmunógeno, lo cual lo hace poco útil cuando se trata de controlar de poblaciones cuyo radio de distribución es muy amplio (Liu et. al., 2005) o en aquellas especies en las cuales se desarrolla resistencia a la inoculación posterior. En la perra, se ha demostrado la utilidad limitada de la inmunización contra proteínas de la zona pelúcida, pues si bien es cierto que hay un daño en la ultraestructura ovárica asociado a la inmunización (Serrano y García-Suárez, 2001), así como un aumento en la cantidad de anticuerpos circulantes cuando se inyectan las proteínas aisladas (Mahi-Brown et. al., 1985) o tejido ovárico particulado, la fertilidad se recupera después de un tiempo (Mahi-Brown et al, 1989). El uso de proteínas expresadas mediante técnicas de ingeniería genética parecía hasta hace unos años una opción factible. Sin embargo, es necesario delimitar el modelo en el cual se está haciendo la expresión. En bacterias, las modificaciones post-traduccionales son limitadas y en la mayoría de los casos, diametralmente opuestas a las que se realizan en las células eucariontes.

Desde hace varias décadas se demostró que los receptores para espermatozoides radican en las porciones glucosídicas de los componentes de la zona pelúcida. El receptor primario al cual se unen los espermatozoides intactos son los carbohidratos con uniones O de la proteína ZP₃. Esta unión induce a su vez la reacción acrosomal de los espermatozoides unidos. Por su parte, los espermatozoides que han llevado a cabo la reacción acrosomal se unen a los carbohidratos presentes en la glucoproteína ZP₂. Finalmente, el sustrato que rompe la acrosina es la glucoproteína ZP₁ (Wassarman y Leitscher, 2009).

Las proteínas de la zona pelúcida expresadas en sistemas de células eucariontes *in vitro* requieren del desarrollo de compuestos estabilizadores que les permitan inducir de manera eficiente la respuesta inmune en los animales en los cuales se van a inyectar. Así pues, se han desarrollado sistemas diferentes al aceite mineral básico del adyuvante de Freund como liposomas para tratar de hacer más eficientes las capacidades inductoras de las proteínas ZP₃ (Wassarman, 2008)

Ante estas dificultades para el desarrollo de estrategias de control de las poblaciones, se requieren de alternativas que puedan ser exploradas. Una de ellas es atacando a las hormonas responsables del desarrollo y funcionamiento gonadal: la FSH y la LH. Dado que su función depende de su liberación, la estrategia lógica es disminuir o inutilizar a la GnRH, hormona responsable de la liberación de estas gonadotropinas. Esta estrategia se ha explorado mediante el reconocimiento de autoanticuerpos dirigidos contra una de las cadenas polipeptídicas que la constituyen (Noble et. al., 2007) o utilizando análogos de ella.

En ambos casos, el éxito es muy inferior al esperado por lo que aún en modelos experimentales, los resultados son marginales restringiendo de esta forma su aplicación en poblaciones naturales.

La inyección intratesticular de compuestos como el Neutersol, glicerol o soluciones saturadas de Calcio también han sido exploradas con resultados variables. Presentan el inconveniente de los efectos colaterales que dependen más de la forma y habilidad con la cual se aplican que de la naturaleza propia de los compuestos activos.

Estudios del efecto del coumestrol en el tejido testicular *in vivo*

Recientemente se ha desarrollado como estrategia alterna la administración oral de coumestrol, fitoestrógeno natural presente en cantidades apreciables en el germen de soya y cuya síntesis se puede inducir en la alfalfa cuando se inocula el hongo *Pseudopeziza medicaginis* (Romero et. al., 1997). Utilizando cuatro dosis semanales de 300 µg/Kg de peso en perros adultos sanos, es posible inducir estados de oligospermia y aztenozoospermia cuya duración es superior a un año y que están asociadas con importantes alteraciones en la citoarquitectura testicular (Pérez-Rivero et. al., 2008). El blanco aparente de esta acción son los receptores estrogénicos (Serrano et al, 2008). Se ha demostrado que el tratamiento con coumestrol brinda resultados similares en otras especies aunque se requiere de cantidades mayores si se aplica por vía parenteral (Tarragó-Castellanos et. al., 2006).

Hasta el momento se desconoce su mecanismo de acción y las subsecuentes alteraciones a nivel molecular que pueda inducir el tratamiento con coumestrol, por lo que una aproximación en este sentido es utilizar un sistema *in vitro* capaz de mantener en contacto de manera permanente al tejido con el compuesto. Para aquellas sustancias que son solubles en agua, su simple adición al medio de cultivo es suficiente para poder hacer su evaluación. Sin embargo, cuando los compuestos son pobremente solubles o insolubles en soluciones acuosas, se requiere de otro tipo de vehículos que hagan eficiente el tratamiento. En este trabajo, exploramos la posibilidad de que sea el alginato de sodio la alternativa para este tipo de tratamientos.

Antecedentes del proceso de microencapsulamiento

El microencapsulamiento es un proceso en que se desarrollan partículas sólidas poliméricas, semipermeables, utilizadas para envolver materiales bioactivos con el fin de protegerlos al mismo tiempo de mantener contacto selectivo con el medio que los rodea,

permitiendo la entrada de nutrientes y oxígeno, así como la salida de productos proteínicos y terapéuticos (Chang, 1972).

En busca de un mejor diseño de encapsulamiento, se han estudiado varios tipos de polímeros sintéticos y naturales. Uno de biomateriales más comúnmente usados para la elaboración de microcápsulas es el alginato por su biocompatibilidad, alta afinidad al agua y por su capacidad de formar geles bajo condiciones moderadas de iones de calcio (Heise *et al.*, 2005).

Con el objeto de mejorar la calidad del encapsulado, recientemente se han desarrollado diversas combinaciones de alginato con sustancias policatiónicas como la poli-L-lisina y polianiónicas que interactúan con los residuos de ácidos manurónico y gulurónico constituyentes del alginato además de otros compuestos como el polimetileno-co.guanidina, citosano o polivinil-amina (Gorka *et al.*, 2004).

Renken u Hunkeler (2007) elaboraron cápsulas multicomponentes hechas de alginato de sodio, celulosa-sulfato de sodio, y cloruro de calcio preparadas con polivinilamina que mostraron propiedades muy diferentes comparadas a las cápsulas del mismo tamaño hechas con polimetileno-co-guanidina. Las cápsulas eran generalmente más opacas lo cual sugiere más densidad en la barrera selectivo -permeable. Las cápsulas realizadas con poli-vinil-amina también presentan una resistencia a la deformación, en particular a bajo potencial iónico.

La selección de materiales usados para el encapsulamiento está enfocada en asegurar la permeabilidad y difusión en estudios *in vivo*, así como los parámetros de permeabilidad a ser probados *in vitro*. También se evalúa la resistencia y degradación de la microesfera (Gorka *et al.*, 2004).

Los parámetros evaluados para calificar la calidad del microencapsulado es el diámetro necesario, el potencial electrostático, la fluidez de la solución de alginato, concentración iónica de gelificación, la concentración del alginato, la viscosidad así como la composición del alginato (Klokk & Melvik, 2002).

Propiedades físicas y químicas del Alginato

El alginato ($C_6H_8O_6$)_n, o ácido algínico, es un carbohidrato poliurónico, hidrofílico y coloidal, compuesto principalmente de residuos de ácido monofónico con enlaces beta 1-4, obtenido de la desecación y pulverización de algas pardas (Moe *et al.*, 1995). La consistencia gelatinosa característica de las feofíceas se debe a este compuesto. Es utilizado

como aditivo en la industria alimentaria y farmacéutica. Las soluciones de alginato son sumamente estables a temperatura ambiente (Santacruz *et al.*, 2005). La compactación de estas soluciones depende de la presencia de elementos polivalentes como el calcio, bario, plomo y, en general, metales. Dependiendo del tipo de iones con los cuales se formen los complejos, varía la dureza y consistencia de la cápsula que se forme (Misirli, 2005).

Las propiedades del alginato están dadas por las proporciones relativas de sus residuos de ácido-D-manurónico y ácido L-gulurónico y de su secuencia en la cadena. Los residuos monoméricos M y G se unen en secciones homopoliméricas de bloques M (MMMMMM) y bloques G (GGGGGG), o bloques heteropoliméricos con cadenas alternantes (MGMGMG). Los monómeros tienden a encontrar la estructura energética más favorable dentro de la cadena de los polímeros. De ésta forma el bloque G-G forma un enlace glicosídico α -1,(4) y el bloque M-M forma un enlace glicosídico β 1-4, esto significa que un polímero G-G con estructura en forma de zig-zag, por sus ángulos de enlace, son más favorables para la unión electrostática con cationes polivalentes y con mayor tendencia a formar geles, a diferencia de los bloques M-M que forman cadenas lineales; las regiones de bloques M-G presentan una linealidad intermedia (Armisen, 2000). Las interacciones de iones multivalentes como el Ca^{2+} con el grupo carboxilo de las cadenas poliméricas de los polisacáridos resultan en la formación de un gel insoluble (Srnidel *et al.*, 2008).

El uso de un polímero biocompatible como el alginato lleva al mantenimiento de los niveles óptimos de viabilidad celular tanto en sistemas *in vivo* como en sistema *in vitro* (Lim, 1980), por lo cual es frecuentemente usado en alo y xeno transplantes.

Utilización del Alginato en el encapsulamiento de distintos tejidos para estudios *in vitro*

El primer reporte que describió el principio de bioencapsulamiento de tejidos o células importantes en el proceso reproductivo fue el de Chang (1964) en el que se describe el desarrollo de microcápsulas artificiales dentro de las cuales se mantenía la actividad biológica normal de enzimas o proteínas que entraban en ellas (Torre 2007).

Fundamentadas en esta metodología, se han elaborado nuevas técnicas de encapsulado con el fin de generar gotas de tamaño controlado seguido de un proceso de estabilización de la interface y la creación de una membrana alrededor de un núcleo (Torre 2007).

El primer ensayo en el que se aplicó el método de Chang usando por primera vez al alginato fue en el encapsulado de islotes de Langerhans con el fin de evitar el rechazo de células transplantadas (Lim & Sun, 1980).

Nebel y su grupo de investigación (1985) realizaron dos ensayos de encapsulamiento de espermatozoides utilizando alginato de sodio al 1 %. En el primero encapsularon diferentes concentraciones de espermatozoides en dos diferentes tamaños de cápsulas demostrando que ni el tamaño de las esferas ni la concentración de espermatozoides después de un tiempo de incubación de 24 hrs., afectaba la viabilidad de las células. Posteriormente en ese mismo experimento encapsularon semen previamente congelado y enfriado utilizando como diluyente una solución de citrato de sodio con glicerol y yema de huevo al 5, 10 y 15%. La integridad de la cápsula no se veía afectada por ninguno de los componentes. Sin embargo, al evaluar la viabilidad de los espermatozoides, se encontró que ésta se veía reducida principalmente en las muestras de espermatozoides congelados con yema de huevo al 5% (Nebel *et al.*, 1985). El segundo experimento consistió en un sistema de liberación controlada, de altas concentraciones de espermatozoides encapsuladas, las cuales se mantuvieron en el útero de una vaca durante la ovulación, con un incremento en la cantidad de óvulos fertilizados y embriones implantados. Con este ensayo se demostró que el alginato no altera la viabilidad de los espermatozoides (Nebel, 1996).

Huang y su grupo de investigación, realizaron un estudio de encapsulado en espermatozoides concluyendo que el alginato de calcio mantiene la fertilidad de los espermatozoides lográndose un buen apareamiento en la cerda y buen tamaño de la cría (Huang *et al.*, 2005).

Heise y colaboradores (2005), realizaron un ensayo en el que utilizó alginato de calcio para encapsular folículos intactos de ratas Sprage-Dawley, para determinar las tasas de crecimiento en respuesta a diferentes métodos de liberación de FSH, descubriendo que el encapsulamiento puede limitar el acceso al FSH a menos que éste esté incluido en la esfera de alginato.

Herrler *et al.*, demostraron que microcápsulas de alginato de calcio conteniendo semen humano, pueden ser criopreservadas, resultando en una disminución en la motilidad comparada a los protocolos estándares, pero con alta viabilidad de espermatozoides inmóviles, por lo que esta técnica se sugiere en el caso de realizar un proceso de ICSI (siglas en inglés de Inyección Espermática Intracitoplásmica) (Torre, 2007).

Matchluf y sus colaboradores (2003), reportaron el uso de alginato.poli-L-lisina para encapsular células de Leydig las cuales fueron estimuladas con hCG, descubriendo que éstas secretaron altos niveles de testosterona, a diferencia de aquellas células que no habían sido encapsuladas quienes no produjeron testosterona aun con la estimulación de hCG, proponiéndolo como un nuevo método para la liberación de testosterona *in vivo*.

En caso de nuestro estudio uno de los objetivos principales fue el de optimizar la preparación de esferas de alginato como modelo de polisacárido con iones de Ca^{2+} , conteniendo fracciones de túbulos seminíferos, brindándole al tejido la difusión selectiva de nutrientes y otras sustancias del medio externo.

RESUMEN:

El control de la sobrepoblación canina no domiciliada en zonas urbanas y rurales se ha realizado mediante la esterilización quirúrgica y el sacrificio humanitario. En ambos casos se requiere de una inversión y a juzgar por los resultados, son poco eficientes, por lo que se ha sugerido, entre otras alternativas, el uso de fitoestrógenos con efectos específicos sobre el funcionamiento reproductivo. El tratamiento de hembras y machos de algunas especies con genisteína o coumestrol induce alteraciones histológicas y funcionales en el aparato reproductor. La administración oral en perros induce alteraciones en la morfología y número de espermatozoides eyaculados, en la histoarquitectura testicular e incluso en la capacidad de respuesta de los perros tratados a la estimulación con el moco vaginal de hembras en estro, funciones en las que intervienen los receptores estrogénicos sin que se tengan indicios del mecanismo molecular que subyace en las alteraciones reproductivas. Estudiar los efectos en el organismo completo implica la interacción de rutas muy variadas por lo que es necesario el desarrollo de un sistema aislado que brinde respuestas a cuestionamientos simples y potencialmente pueda ser utilizado en la integración funcional del efecto iniciado por el tratamiento. Considerando los estudios previos del grupo de investigación y en el intento de abundar en el conocimiento de la acción de los fitoestrógenos sobre la transcripción global del testículo, se diseñó un sistema de estimulación *in vitro* en el que se evaluaron diferentes concentraciones de alginato de sodio, CaCl_2 y EDTA para encapsular y liberar fragmentos de tejido testicular. La concentración adecuada para el encapsulado de los tejidos de testículo fue con alginato de sodio al 1.5% y CaCl_2 100 mM en proporción 1/1, con un tiempo de encapsulamiento de 4 segundos; la disolución de las esferas, después de la incubación de los tejidos encapsulados, se realizó con EDTA 5 mM, pH 8. Para evaluar la eficiencia del sistema para ser utilizado en el tratamiento *in vitro*, se aisló el RNA de los tejidos. Sin embargo la calidad del RNA obtenido no fue de calidad suficiente que permitiera su análisis en metodologías posteriores como en la hibridación por microarreglos por lo que es necesario estandarizar la metodología con pruebas complementarias, como el cambio del uso del agente gelificante, evaluación a diferentes tiempos de incubación de la integridad y viabilidad del tejido, amén de utilizar métodos alternos de extracción de RNA para que el sistema pueda ser utilizado posteriormente en la estimulación con compuestos hidrofóbicos.

ABSTRACT.

Reproductive control of stray dog population in urban and rural communities has been made mainly by surgical sterilization and humanitarian sacrifice. In both approaches, it is necessary a major investment with a reduced population impact. It has been indicated that phytoestrogen treatment can be used as a complementary strategy. Male and female treatment with phytoestrogens induces morphological and functional reproductive alterations. In dogs, oral administration of coumestrol modifies the histomorphology of the testis, reduces the number, concentration and normal mature sperm morphology and even on the response to the vaginal discharges from estrous females, functions regulated by the estrogen receptors. Studies on the whole organism are difficult due to the diversity of metabolic pathways that are altered by the phytoestrogen so the most logical alternative to elucidate the molecular mechanism at the target tissue is to develop an isolated system that could answer simple questions and that can be used to study the functional integration due to the stimulation. In order to abound on the research interest of our group, an in vitro stimulation system was developed. Here we evaluated different concentrations of sodium alginate, CaCl₂ and EDTA to encapsulate and liberate pieces of testis tissues. 1.5% sodium alginate and 100 mM CaCl₂ combination give the best consistency, coverage and handling conditions for tissue encapsulation that is stable after 24 hs under tissue culture conditions; 5 mM EDTA, pH8 effectively liberate the included tissue. To evaluate the possible use of the system in downward methods, RNA was isolated from the encapsulated tissues. RNA quality and mRNA integrity was not desirable for use in robust downward methods like microarray analysis. It is necessary to improve the methods in certain aspects like the use of alternative gelling agents, evaluate the viability and integrity of the included tissue along with the use of alternative RNA isolation methods so the system could be used for in vitro hydrophobic compound stimulation.

JUSTIFICACION:

La implementación de una técnica de encapsulamiento con Na-Alginato de tejido de testículo es una herramienta útil para ver el efecto del coumestrol en la expresión de algunos genes de los túbulos seminíferos

Tomando en cuenta resultados previos obtenidos en estudios realizados *in vivo* sobre el efecto del coumestrol en tejidos reproductivos de distintas especies (Pérez-Rivero *et al.*, 2007), es necesario ampliar el campo de investigación realizando estudios que complementen el conocimiento previamente obtenido, definir los genes o grupos de genes que pudiesen responder al tratamiento con el coumestrol y explicar de esta forma su efecto sobre la fisiología reproductiva. Con esto en mente, se propone utilizar técnicas de encapsulamiento con Na-alginato. Se ha demostrado que los geles de este compuesto protegen la integridad funcional de la célula. Estos conocimientos nos permitirán desarrollar nuevas estrategias no tóxicas y no invasivas, con el fin de controlar la función reproductiva de los cánidos no domiciliados, que actualmente en muchos países presentan el problema de la sobrepoblación de esta especie.

HIPÓTESIS:

El encapsulamiento con Na- Alginato de tejidos de túbulos seminíferos del perro tratados *in vitro* con coumestrol, permite evaluar los posibles efectos del coumestrol sobre la expresión de algunos genes de este tejido.

El uso del alginato de sodio permite la incorporación de compuestos hidrofóbicos que puedan estar en contacto con los túbulos seminíferos. El tratamiento con coumestrol de tejidos encapsulados en alginato de sodio permite evaluar la expresión de genes en los túbulos seminíferos encapsulados.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones generales de encapsulamiento de tejido los túbulos seminíferos que permitan evaluar los efectos en la expresión de algunos genes de fragmentos de testículo de perro en respuesta al tratamiento *in vitro* con diferentes concentraciones de coumestrol.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar las condiciones óptimas para el encapsulamiento in vitro, que permitan la sobrevivencia de segmentos de túbulos seminíferos.
- Determinar las condiciones de concentración de alginato y Ca^{2+} para la inclusión de los túbulos seminíferos.
- Establecer las condiciones de aislamiento de mRNA con características de pureza e integridad.
- Evaluar la alteración en la expresión de genes, principalmente aquellos que están regulados por los receptores estrogénicos $\text{ER}\beta$.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Todos los procesos utilizados en nuestro estudio, se realizaron bajo condiciones de esterilidad y asepsia, en un cuarto de cultivo, para evitar cualquier contaminación con microorganismos y que pudieran interferir en los resultados.

Animales

Se utilizaron tres perros criollos domiciliados machos, de entre uno y dos años de edad, con nutrición adecuada, sin antecedentes de enfermedades graves y con las vacunas pertinentes, con experiencia sexual y reproductiva previa y una evaluación física externa de los testículos positiva, por lo que fueron considerados reproductivamente sanos.

Obtención del tejido testicular

La orquidectomía se llevó a cabo después de un ayuno de sólidos y líquidos de 6 a 8 horas, aplicándose xilazina al 2% (1mg/kg) intramuscular como agente preanestésico para proporcionar sedación y analgesia, seguido de ketamina (6mg/kg) endoveneosa como anestésico general disociativo. Cuando el perro estuvo bajo los efectos del anestésico, previa antisepsia de la zona quirúrgica, se procedió a extraer los testículos mediante incisión por línea media, basada en la técnica de orquidectomía preescrotal cerrada (Birchard, 1994). Los testículos contenidos dentro de la túnica albugínea y con el epidídimo adherido, se colocaron en 100 mL de Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)+HAM F-12 adicionado con 100 µL de solución de antibióticos (penicilina, estreptomycin y anfotericina, Microlab, México), y fueron trasladados al laboratorio en una cámara térmica a 37°C, en donde se inició el proceso de inclusión de tejidos.

Metodología de encapsulamiento de tejidos

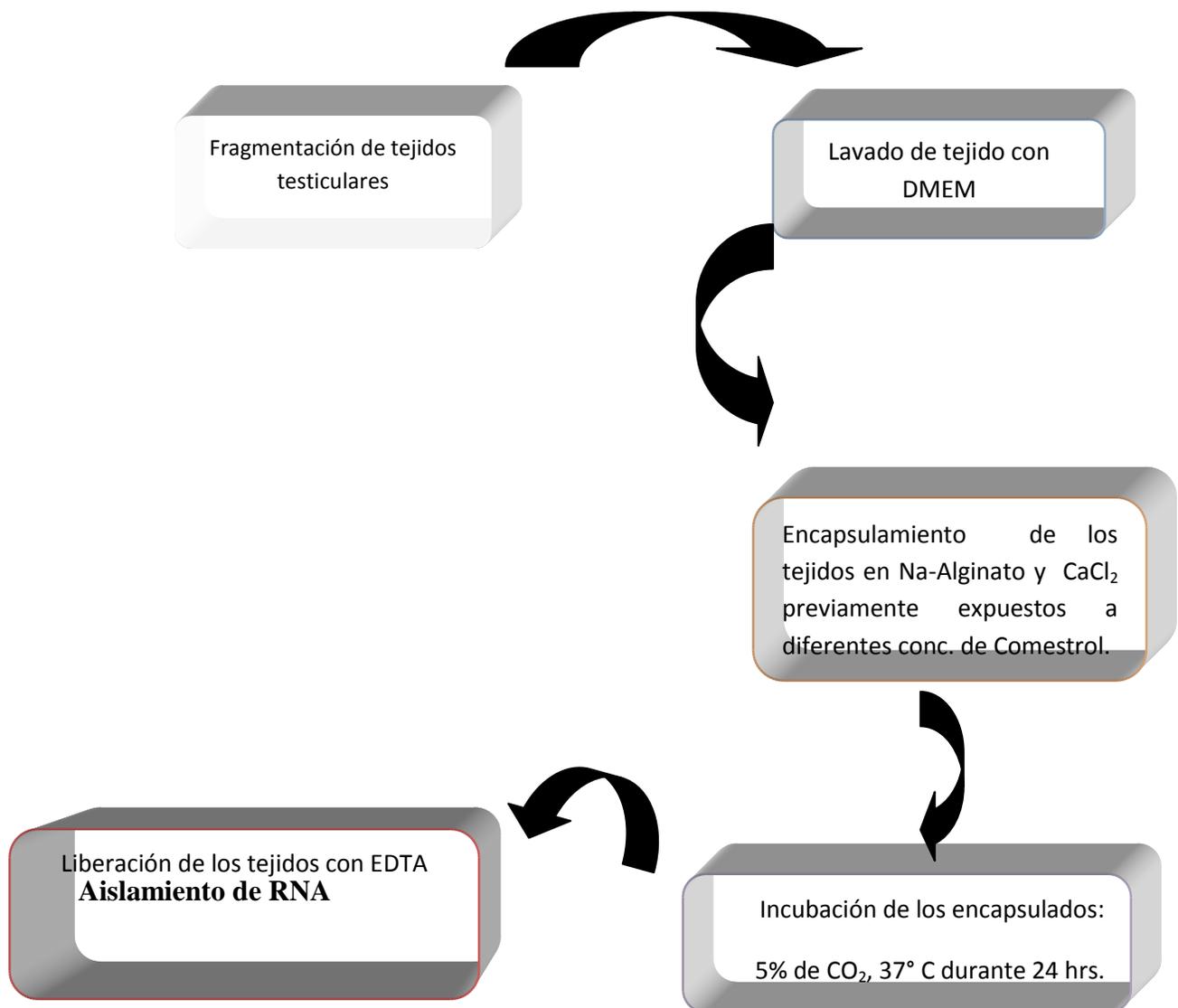
En condiciones estériles, los tejidos se fragmentaron dejando piezas de entre 2 y 3 mm³ que se colocaron individualmente en cámaras multipozos (Nunk, Suecia). Se removió la mayor parte de la sangre contenida en los tejidos lavando 3 o 4 veces con 1 ml de DMEM fresco, cada vez en pozos nuevos. En la figura 3 se muestran las etapas principales de este proceso.

Los trozos de túbulos seminíferos se pusieron en contacto con la solución de Alginato de sodio estéril conteniendo diferentes concentraciones de coumestrol (0 a 4µg en cada cápsula) y se sumergieron de manera controlada en pozos conteniendo 1 mL de solución de CaCl₂. Las concentraciones de Na-Alginato y CaCl₂ que se probaron fueron 0.5% a 1.5% para el alginato y 0.5 a 1.5 mM para el CaCl₂.

La formación de la microcápsulas se supervisó por observación directa. Se utilizaron solo aquellas que cubrían de manera uniforme y al 100% los fragmentos de tejido. Las cápsulas se colocaron en pozos nuevos y se incubaron por 24h en incubadora con 5% de CO₂ en aire humidificado a 37°C (Fig. 4).

Para determinar las condiciones que permiten la liberación de los túbulos seminíferos, se tomó el tiempo en que el polímero se disolvía por efecto de diferentes concentraciones de EDTA. Para esto, se retiró el DMEM con pipeta, se agregó una cantidad equivalente de EDTA a 0.01, 0.1 y 1 M y se cronometró el tiempo hasta que los túbulos seminíferos estuviese totalmente libre. Se tomó como punto final de la disolución cuando macroscópicamente el tejido no presentaba trazas de la microcápsula. El tejido se lavó con DMEM y se procedió a hacer la extracción de RNA (Chomczynsky & Sacchi, 1987).

Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de encapsulamiento de tejidos de testículo con Na-Alginato-CaCl₂.



Las muestras de túbulos seminíferos se depositaron en tubos de vidrio y se homogenizaron en 1 ml de reactivo de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, Ca) con un homogenizador de acero inoxidable (Politrón, Tekmar Heidolph). Las muestras individuales se procesaron con ciclos de 20 golpes del homogeneizador con el estator colocado a máxima velocidad. Para evitar el calentamiento de la muestra que podría ocasionar la degradación del RNA, el procedimiento se realizó en un baño de hielo. Cuando la solución de homogeneización no mostró restos de tejido, el homogenado se decantó en tubos estériles y se procedió a seguir el protocolo del fabricante (Chomczynsky & Sacchi, 1987).

El homogenado se incubó a temperatura ambiente y se le agregó cloroformo para propiciar la separación de fases. Para definir las, se centrifugó a 13 000 Xg a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y de ella se precipitó el RNA con alcohol isopropílico. Las fibras del RNA se colectaron por centrifugación a 12 000 Xg y se lavaron con etanol. Una vez lavado, se retiró el etanol por centrifugación a 12 000 Xg y se disolvió el RNA en agua tratada con Dietil-pirocabonato (DEPC) (Chomczynsky & Sacchi, 1987).

La cuantificación del RNA y la evaluación de su pureza se realizó mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2. Perkin-Elmer (Sambrook et al, 1989).

La evaluación de la integridad del RNA se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa conteniendo formol. El gel de agarosa se preparó al 1% (W/V) en amortiguador MOPS 20 mM al cual se le adicionó 1.2 mL de formol. Una vez que el gel se solidificó, se sumergió en amortiguador MOPS 20 mM. Las muestras se incluyeron en una solución de carga con Ficoll y conteniendo 1 µg de Bromuro de etidio. Las muestras se corrieron a 4 V/cm por 30 min a temperatura ambiente en amortiguador MOPS 20 mM (Sambrook *et al.*, 1989b).

El análisis propositivo para la elaboración de los microarreglos se realizó utilizando una columna de sílice (Invitrogen, Carlsbad, Ca) para remover y concentrar la muestra. Después del aislamiento de rutina, se evaluó nuevamente la calidad del RNA en geles de agarosa al 1% en geles reductores con 2.4 mL de formol (Sambrook *et al.*, 1989a). Como punto de referencia, se incorporó una muestra estándar de RNA de levadura.

RESULTADOS

Durante el proceso de microencapsulamiento de los tejidos de epidídimo con Na-Alginato, se observó que la mejor formación de las esferas se llevó a cabo con una concentración de Na-Alginato al 1.5% con CaCl_2 100mM (Cuadro 5). Se determinó que las esferas lograban mejor consistencia depositando primero el volumen de CaCl_2 para cada tejido en el pozo de la placa multipozos, y posteriormente vertiendo una parte del volumen del Na-Alginato al mismo tiempo que se sumergía el tejido en la solución de calcio, lo cual permitió que se formara la cápsula. En la figura 4 se muestran las características de las microcápsulas obtenidas. En ambas fotografías es evidente el contraste que presenta la microcápsula formada por Alginato de Calcio conteniendo los fragmentos del tejido.

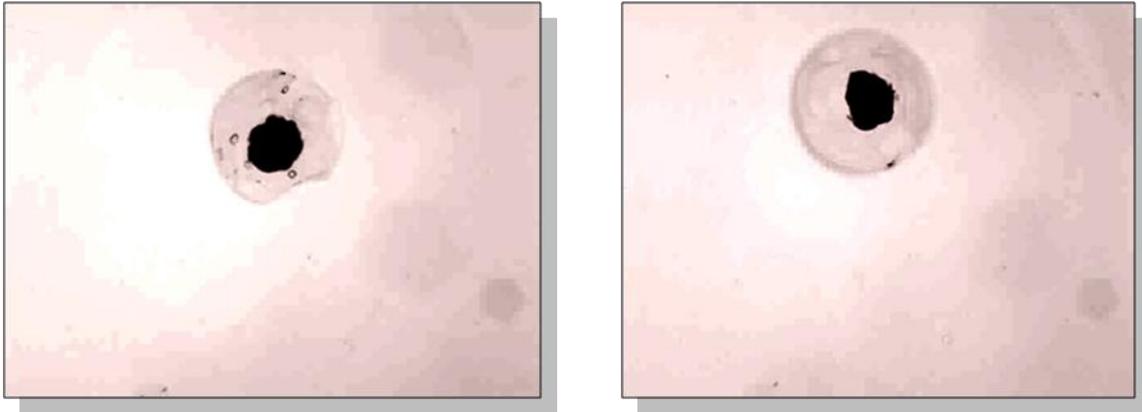


Figura 4. Fragmentos de testículo de dos perros, encapsulado con Na-Alginato 1.5%- CaCl_2 100mM. De las dos concentraciones de Na-Alginato utilizadas (1.0 y 1.5 %), las microcápsulas con mayor consistencia formadas con CaCl_2 (25, 50, 100 mM), fueron las de Na- Alg 1.5% + CaCl_2 100mM.

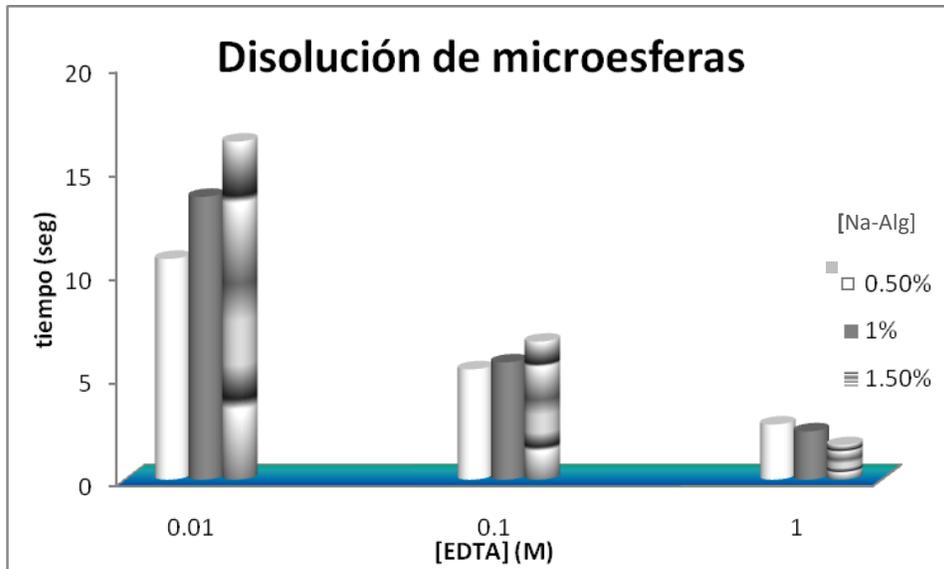
El tiempo necesario para la polimerización se siguió por observación directa tomando como punto final aquel en el cual el gel cubriese de manera homogénea al tejido. El cuadro 5 muestran los resultados obtenidos en esta etapa.

Cuadro 5. La formación de las cápsulas de Ca-Alginato depende de la concentración de los reactivos. Se utilizaron diferentes concentraciones de Na-Alginato y CaCl_2 para la formación de microcápsulas. Se muestra la duración (min) necesaria para su formación. Los valores son el promedio y desviación

estándar de tres experimentos independientes por triplicado. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

| | | Concentración de CaCl_2 (M) | | |
|---------------|--|--|-----------------------------|-----------------------------|
| [Na-Alginato] | | 0.5 | 1.0 | 1.5 |
| % | | | | |
| 0.5 | | $1.067_{\text{min}} \pm 0.02^{\text{a}}$ | $0.694 \pm 0.02^{\text{d}}$ | $0.222 \pm 0.01^{\text{f}}$ |
| 1.0 | | $0.922_{\text{min}} \pm 0.02^{\text{b}}$ | $0.639 \pm 0.03^{\text{d}}$ | $0.217 \pm 0.02^{\text{f}}$ |
| 1.5 | | $0.761_{\text{min}} \pm 0.02^{\text{c}}$ | $0.556 \pm 0.04^{\text{e}}$ | $0.211 \pm 0.03^{\text{f}}$ |

Figura 5. Tiempo requerido para la disolución de las microcápsulas conteniendo porciones de tejido al utilizar diferentes concentraciones de EDTA y Alginato. Se utilizaron volúmenes similares de soluciones de EDTA en diferentes concentraciones y dependiendo de la concentración de Alginato utilizado en la elaboración de las microcápsulas.



Transcurrido el tiempo de incubación, las microcápsulas se disolvieron agregándoles EDTA (figura 5). El tiempo de disolución de las microcápsulas es dependiente de la concentración

El RNA total aislado de los túbulos seminíferos de los animales se cuantificó espectrofotométricamente. Partiendo de muestras de 50 mg de tejido total, se obtuvieron $870 \pm 182 \mu\text{g/ml}$ de RNA (rango de 552 a $1072 \mu\text{g/ml}$). A pesar de la variabilidad en las cantidades, el rendimiento global fue de $4.92205 \mu\text{g RNA/mg}$ de tejido.

Para determinar la calidad del RNA total se hizo una separación electroforética en geles conteniendo formol. En primera instancia, la calidad de esta macromolécula parecía ser adecuada (figura 6a). Sin embargo, cuando se evaluó en condiciones de astringencia mayor, como normalmente se hace previo al inicio del análisis de microarreglos, la calidad no fue adecuada para realizar este procedimiento. En el panel de de la derecha de la figura -6- puede observarse el resultado del corrimiento electroforético de varias muestras de RNA extraído por el método descrito en el cual no pueden observarse las bandas del rRNA que sirven de indicadores internos de un RNA aceptable para microarreglos, como ocurre con la muestra de RNA de levadura utilizada como control de calidad.

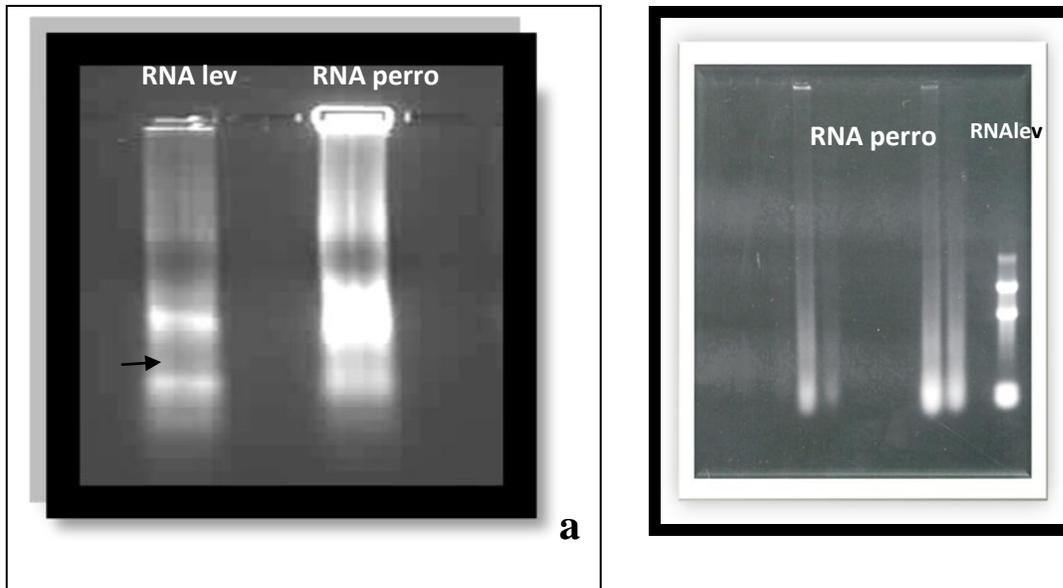


Figura 6. Evaluación electroforética del RNA aislado de túbulos seminíferos encapsulados. Las muestras de RNA separado en geles de agarosa conteniendo formol (a) muestran el patrón típico del RNA incluyendo el mRNA distribuido entre el rRNA. Sin embargo, cuando se aumenta las condiciones de astringencia de los geles, la calidad del RNA es pobre comparada con el RNA de levadura (carril de la extrema derecha) utilizado como estándar previo al inicio del procedimiento de microarreglos.

DISCUSIÓN

En una revisión efectuada recientemente (Dixon, 2004), el autor enfatiza el creciente interés por los fitoestrógenos y sustancias relacionadas, utilizando como argumento el también creciente número de artículos científicos publicados entre 1990 y 2002 donde se citan las palabras fitoestrógenos, genisteína, lignano y combinaciones de éstas. En la revisión antes citada es evidente que en 1990 los artículos fueron menos de 50; en cambio del 2000 al 2002 se publicaron cerca de 600 artículos por año con las características mencionadas. Es fácil comprender la popularidad de esta temática, ya que los fitoestrógenos y sustancias asociadas se encuentran en un gran número de plantas comúnmente utilizadas en la alimentación tanto de humanos (Benlhabib *et al.*, 2002) como de animales (Pocock *et al.*, 2002). Existen evidencias que al ingerir elevadas cantidades de fitoestrógenos, tanto las funciones reproductivas como el desarrollo sexual de las hembras se ven afectados negativamente (Rasier *et al.*, 2006; Woclawek-Potocka *et al.*, 2005). Pruebas similares indican que también estas sustancias afectan la capacidad reproductiva en machos (Cardoso y Báó, 2007). En contraste con lo anterior, se han generado pruebas que apoyan la posibilidad de efectos benéficos de los fitoestrógenos sobre la salud; por ejemplo las isoflavonas contenidas en algunas leguminosas reducen el riesgo de adquirir cáncer de mama o enfermedades cardiovasculares, además de mejorar las condiciones óseas y reducir

la severidad de síntomas típicos de mujeres menopáusicas (Pocock et al., 2002). Lo anterior explica el interés de científicos y público en general por los usos potenciales de los fitoestrógenos, ya sea como herramientas promotoras de salud, o como métodos más refinados que los actualmente en uso para el control reproductivo de animales.

Uno de los campos del conocimiento en que se han manifestado las propiedades potenciales de los fitoestrógenos, es en el control poblacional de mamíferos, por ejemplo el perro, los que por su elevada prolificidad y disminución de predadores, se han convertido en plagas que atentan contra el bienestar de los humanos y de diversos animales, domésticos y silvestres (Pocock et al., 2002). Uno de los fitoestrógenos evaluados con dicho propósito es el cumestrol, mismo que al ser administrado en la dieta de murciélagos-vampiro (Pérez-Rivero *et al.*, 2005.) y de perros (Serrano *et al.*, 2008; Pérez-Rivero *et al.*, 2008), produce alteraciones morfológicas y funcionales en el aparato reproductor de hembras y machos.

Con relación a los perros de origen doméstico, ya sea porque son inadecuadamente atendidos por sus propietarios, o que por haber sido abandonados se han convertido en animales ferales, representan una amenaza creciente para los pobladores de ciudades y del campo, humanos y animales por igual. Existen estimaciones que indican una población de 172 millones de perros en los diez países que se supone presentan las mayores poblaciones caninas y de un poco más de 400 millones a nivel mundial. Tan solo en Estados Unidos de América se mantiene una población de 61 millones de perros; de los cuales se calcula que un 10% ingresa a centros de protección y se cuenta con registros que indican la aplicación de eutanasia a 3-4 millones de perros y gatos por año (Palika, 2004). En México no se tiene una idea clara de la población canina, pero aún en medios de información masiva se indica que en el año 2007 había en el valle de México una población canina cercana a los 3 millones de los cuales 1,981,000 estaban en Distrito Federal, de acuerdo con datos de diversos Centros Antirrábicos y de Control Canino para el Control de la Zoonosis en el Distrito Federal. Si bien el problema de las poblaciones de perros que vagan libremente no ha sido dimensionado con precisión, resulta claro que el problema de la sobrepoblación canina ha rebasado la capacidad de los sistemas de control en la mayoría de los países; de tal modo que ha sido necesario crear una coalición de las asociaciones mundiales relacionadas con este tema para establecer la Guía de Manejo Humanitario de la Población Canina (AWC-ICAMC Coalition, 2007). En esta guía se enfatizan los principales procedimientos para llevar a cabo una campaña exitosa y sustentable de la población canina en el mundo; entre estos aspectos se recomienda el desarrollo de métodos no quirúrgicos para inhibir la reproducción, particularmente en los perros machos.

El estudio a nivel molecular del tratamiento con COU está pobremente desarrollado. En primer término, debido a la característica hidrofóbica del fitoestrógeno. Si se tratara de aplicar en un medio de cultivo simple como el habitual, el contacto que habría entre el compuesto y el tejido sería limitado. Al tratar de solubilizarse, la presencia de otros compuestos puede no solo ocultar sino alterar la respuesta al COU, como ocurre con el rojo

fenol, el indicador común que se utiliza en los medios de cultivo celular comercial (Gehm et al., 1997).

Es necesario entonces, diseñar un sistema de cultivo que permita el contacto del fitoestrógenos con el tejido. Es en este sentido es que se enmarca el presente trabajo. La inclusión de los tejidos en alginato de sodio sigue una dinámica simple. La formación de las microcápsulas está basada en la interacción entre iones divalentes y el polisacárido. De esta forma, al utilizar una combinación de alginato y CaCl_2 , la polimerización se lleva a cabo de manera espontánea y rápida con un tiempo menor a 30 segundos en la combinación 15%/1.5 M (Alginato/ CaCl_2) que es menor al que se ha reportado en la literatura para sistemas similares BaCl_2 permite la estructuración de microcápsulas de mayor consistencia (Bang et al., 2009). El uso de metales pesados incluiría una variable adicional pues este estaría potencialmente en contacto con el tejido y, como es conocido, la presencia de cantidades bajas de este tipo de compuestos altera el metabolismo de la célula, incluyendo procesos importantes como la replicación y la transcripción. Consideramos que el uso de CaCl_2 brinda microcápsulas de consistencia adecuada para un manejo fácil y cuyo efecto pueda ser mínimo en los tejidos incluidos, siempre y cuando no se evalúen aspectos de conductancia de la membrana o de transducción de señales pues la presencia de concentraciones relativas de Ca^{2+} en la vecindad del tejido, alteraría las condiciones de la evaluación.

La facilidad en el manejo de los tejidos incluidos en las microcápsulas permite que sean sumergidos en soluciones de composición diferente. Este aspecto es importante pues aunque se puedan combinar condiciones de cultivo diferentes a las del encapsulamiento, los componentes incluidos dentro de la microcápsula se mantienen en contacto con el tejido y, si son hidrofílicos, mantener las condiciones de transporte simples que implican la distribución a favor del gradiente de concentración.

Esta facilidad metodológica es superior al que ofrecen otros sistemas como serían las microgotas, cuya utilidad es indiscutible en algunas metodologías de reproducción asistida (Lee et al., 2004). Sin embargo, su uso es cuestionable en la difusión de gases a través del aceite mineral que las recubre, en las microcápsulas la difusión depende de las condiciones de presión parcial de cada uno de los gases considerados y su uniformidad es equivalente a un cultivo simple. Está altamente documentado el efecto del estrés aeróbico al que son sometidas las células en sistemas de evaluación *in vitro* de compuestos hidrofóbicos como aceites y pesticidas en los cuales no es posible determinar los efectos reales del compuesto a evaluar y el inducido por las condiciones del cultivo, limitando entonces la utilidad y simplicidad aparente de la prueba *in vitro* (Bleil, 1993)

Al igual que en la manufactura, la liberación del tejido encapsulado se realiza de manera simple (Figura 5) con EDTA que quela los iones Ca^{2+} necesarios para el mantenimiento de las microcápsulas y con ello restringe la presencia de iones bivalentes necesarios para la

actividad de las enzimas que degradan el RNA (Sambrook et. al., 1989), preparando las condiciones de la etapa subsecuente.

La extracción de RNA utilizando el método de Trizol es una metodología que permite el aislamiento consecutivo de las tres macromoléculas importantes en estudios que implican la expresión de genes (Sambrook et. al., 1989). Sin embargo, en nuestro caso y a pesar de que en apariencia podría tratarse de una metodología útil para explorar la posibilidad de conocer la expresión de genes en tejidos tratados con fitoestrógenos, los resultados son controversiales. Por un lado, el análisis con bajas condiciones de astringencia muestran que tanto el mRNA como el rRNA están presentes en las muestras extraídas de tejidos que se incluyeron en microcápsulas (figura 6a), cuando se aumenta el grado de astringencia, los resultados son pobres en cuanto a la calidad del mRNA (figura 6) y por ende, no es posible realizar el análisis de expresión de los genes, por ejemplo aquellos que codifican para ER β en los tejidos tratados de túbulos seminíferos.

En suma, a pesar de que la inclusión de tejidos en microcápsulas de alginato es simple y potencialmente permite el tratamiento de estos con compuestos hidrofóbicos, la obtención del RNA para poder ser utilizado en metodologías subsecuentes es de dudosa calidad. Esto puede deberse al método de extracción en el cual la presencia de compuestos fenólicos pudieran disminuir la calidad de este tipo de macromoléculas. Es necesario utilizar un método alternativo que permita aislar el RNA con las características adecuadas para el análisis de la expresión de genes en tejidos tratados de túbulos seminíferos. Dadas la facilidad y sencillez en el manejo de las muestras y los reactivos, el sistema de encapsulamiento *in vitro* pareciera ser la primera etapa hacia el desarrollo de estrategias de investigación que evalúen directamente el efecto de los fitoestrógenos sobre los tejidos blanco. Es necesario hacer estudios posteriores para la optimización de las etapas de extracción y análisis de la expresión global de genes en los tejidos tratados en este sistema.

REFERENCIAS:

1. Adams NR. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci.*73:1509-1515.
2. Armisén R. 2002 (Citado en: Santacruz I, Nieto MI, Moreno R. 2005. *Bol. Soc. Esp.* V. 44:45-52).
3. Atanassova N, Mc Kinnell, C, Turner K, Walker M, Fisher S, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen level. *Endocrinology* 141:3898-3907.
4. Bang SH, Yu YM, Hwang IC, Park HJ. 2009. Formation of site-controlled nano carrier systems by self-assembly. *J. Microencapsul.* 26:722-733.
5. Benlhabib Elhabib. 2002. Composition, red blood cell uptake, and serum protein binding of phytoestrogen extracted from commercial kudzu-root and soy preparations. *Journal of Medicinal Food.* 5:109-103
6. Birchard, Sherding. 1994. *Manual Clínico de pequeñas especies.* Vol. 2. Ed. McGraw-Hill, Interamericana. Pp.1048-1052.
7. Bleil JD. 1993. In vitro fertilization In: *Guide to techniques in mouse development.* (P. Wassermann, M.L. DePamphilis, eds). *Meth. Enzymol.* 225:253-263.
8. Cardoso JR, Bão SN. 2007. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. *Animal Reproduction Science.* 97:237-245.
9. Dixon RA, Phytoestrogens. 2004. *Annu. Rev. Plan Biol.* 55:225-261.
10. Brown L, Kroon PA, Das DK, Das S, Tosaki A, Chan V, Singer MV, Feick P. 2009. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcohol Clin Exp Res.* 33:1513-1523.
11. Brown K, Prescott J. 2008. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. *Can MAJ.*178:399-401.
12. Burgio F, Sabalette-Moya T, Fariñas-Guerrero F. 2009. Zoonosis frecuentes por parásitos helmínticos caninos y felinos. *Agos* 113:52-54.
13. Campagna M, Rivas C. 2003. Antiviral activity of Resveratrol. *Biochem. Soc. Trans.* 38:50-53.

14. Chang TMS. 1964. Semipermeable microcapsules. *Science* 146:524-525.
15. Chomczynsky P, Sacchi N. 1987. Single-step Method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-Phenol-choloform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159
16. Esquivel-Lacroix C. 2007. Evaluation of a Single Intratesticular Injection of Zinc Gluconate Neutralized by Arginina (Neutersol[®]) as a Chemical Sterilant in Sexually Mature, Male Dog. Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control. Alexandria, VA: 1-7.
17. Faulkner L. 1994. Dimensions of the pet population problem. *J Am Vet Med Assoc* 166:477-478.
18. Fernández Campos F, Cantú Alarcón GJ. 2002. Frecuencia de helmintos intestinales en perros callejeros sacrificados en la Ciudad de Querétaro, Qro. *Vet. Mex.* 3:247-253.
19. Friary J, Levy J, Miller L, Fagerstone K. 2007. Evaluation of a GnRH vaccine for the human control of female cats. 3rd. Int. Symp. Non-surg Contracept. Meth. Pet Pop. Control. Alexandria. VA.3.
20. Galván Pérez E, Páramo Ramírez RM, Esquivel Lacroix C, Valencia Méndez J. 1994. Esterilización en el perro por inyección del metilcianoacrilato en la cola del epidídimo. *Vet. Mex.* 25:261-265.
21. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad.* 94:14138-1414.
22. Gorka O, Hernández RM, Rodríguez-Gascón A, Calafiore R, Min-Swi Chang T, de Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacik I, Pedraz JL. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. 2004. *Trends in Biotechnology* 22:87-92.
23. Gualo-Soberanes NG. 2010. Efecto del coumestrol sobre la conducta sexual de perros (*Canis familiaris*) machos. Tesis de Mestría. Fac Med Vet Zootecnia, UNAM, México. Pp.1-31.
24. Hess RA. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Rep Biol Endoc.* 1:1-14.
25. Heise M, Koepsel R, Rusell AJ, McGee EA. 2005. Calcium alginate microencapsulation of ovarian follicles impacts FSH delivery and follicles morphology.

26. Howe LM. 2006. Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*. 66:500-509.
27. Huang SY, Tu CF, Liu SH, Kuo YH. 2005. Motility and fertility of alginate encapsulated boar spermatozoa. *Ani Reprod Sci*. 87: 111-120.
28. Human dog population management guidance. International Companion Animal Management Coalition 2007.
29. Jacob DA, Temple JL, Patisaul HD, Youg LJ, Rissman EF. 2001. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor. *Exp Biol Med*. 226:301-306.
30. Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME. 1985. Structure-activity relationships of strogens. *Eviromental Health Perspectives*. 61:97-110
31. Kaul R, Afzalpurkar A, Gupta SK. 1996. Strategies for designing an immunocontraceptive vaccine based on zona pellucid synthetic peptides and recombinant antigen. *J Reprod Fertil*. 50:127-134.
32. Klokk TI, Melvik JE. 2001. Controlling the size of alginate gel beads by use of high electrostatic potential. *J. Microencapsulation* 19:415-424.
33. Kuiper G, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe S, Van de Saag PT, Van der Burg B, Gustaffsoston JA. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogens receptor β . *Endocrinology* 139:4252-4263.
34. Lee DR, Kaproth MT, Parks E. 2001. *In vitro* production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. *Biol. Reprod*. 65:873-878.
35. Lee S, Cho M, Kim E, Lie C, Han J, Lim J. 2004. Renovation of a drop embryo culture system by using refined mineral oil and the effect of glucose and/or hemoglobin added to a serum-free medium. *J Vet Med Sci*. 66:63-66.
36. Levy J, Clifford E. 2007. Use of Neutresol in the Galapagos. 3rd. Int. Symp. Non-surg Contracept. Meth. Pet Pop. Control. Alexandria. VA.7.
37. Lewin B. 2004. Genes VIII. Activating Transcription. Ed. Pearson-Prentice Hall. 642-652.
38. Lim F, Sun AM. 1980. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210:908-910.
39. Liu, IK, Turner JW, VanLeewen EM, Flanagan DR, Hedrick JL, Murata K, Lane VM, Morales-Levy MP. 2005. Persistence of anti-zonae pellucidae antibodies

following a single inoculation of porcine zonae pellucidae in the domestic equine. *Reproduction* 129: 181-190.

40. López-Moreno HS. 2002. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. *Salud Pública Mex.* 44:145-152.
41. Loza Rubio E, Aguilar Setien A, Bahloul C, Brochier B, Pastoret PP, Tordo N. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.* 30:144-149.
42. Mahi Brown CA, Huang TTF, Yanagimachi R. 1982. Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zona pellucida. *J Exp Zool.* 222:89-95.
43. Mahi-Brown CA, Yanagimachi R, Hoffaman JC, Huang TTF. 1985. Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zonae pellucidae: Use of different adjuvants and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biol. Reprod.* 32:761-772.
44. Mahi-Brown CA. 1989. Prospects for control of fertility in female dogs by active immunization with zona pellucid proteins. *Cell Immunol*; 124: 368-379.
45. Machluf M, Orsola A, Boojian S, Kershner R, Atala A. 2003. Microencapsulation of Leydig Cells: A system for Testosterone Supplementation. *Endocrinology* 144:4975-4979.
46. McClain RM, Woltz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Bausch J. 2006. Subchorionic, chorionic safety studies with ginestein in dogs. *Foot and Chemical Toxicology* 66:500-509.
47. Mc Garvey C, Cates C, Brooks A, Swanson IR, Milligan W. 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endochrinology* 142:1202-1208.
48. Meltzer MI, Rupretcht CE. 1998. A Review of the Economics of the Prevention and Control of Rabies. Part 2: Rabies en the Dogs, Livestock and Wildlife. *Pharmacoeconomics.* 14:481-498.
49. Millar SE, Chamow SM, Oliver C, Robey F, Dean J. 1989. Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produce long-term contraception in female mice. *Science* 246:935-938.
50. Misirli Y, Öztürk H, Kuşaklıoğlu, Denkaş EB. 2005. Preparation and characterization of Mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres for chemoembolization. *J Encapsulation.* 2005. 22:167-178.

51. Moe ST .1995. (Citado en: Klock TI, Melvik. 2002. Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potencial. J. Microencapsulation. 19:415-424).
52. Navarro DA. 2001. Fitoestrógenos y su utilidad para el tratamiento del síndrome del climaterio. Rev. Cubana Endocrinol 12:118-131.
53. Nebel RL, Bame RG, Lim Saacke & Franklin.1985. Microencapsulation of Bovine Spermatozoa. J Anim Sci. 60:1631-1639.
54. Nebel RL, Vishwanath R, McMillan WH, Pitt CJ. Microencapsulation of bovine spermatozoa viability and fertility. 1996. Anim Reprod Sci 44: 79-89.
55. Kneel RL, Viswanath R, McMillan WH, Pitt CJ. 1996. Microencapsulation of bovine spermatozoa viability and fertility. Anim Reprod Sci. 44:79-89.
56. Noble T, Waite K, Saleem N, Sriranganathan N, Baker H, Boyle, S.2007. Production of a fusion protein containing GnRH as a contraceptive antigen. 3rd. Int. Symp. Non-surg Contraceptiv meth. Pet .
57. Ortega-Pacheco A. 2001. La sobrepoblación canina: un problema con repercusiones potenciales para la salud humana. Rev Biomed. 12:290-291.
58. Ortega-Pacheco A, Rodríguez-Buenfil JC, Leal-Ortega JA. 2000. Actividad estral de las perras callejeras en la ciudad de Mérida, Yucatán y su relación con la edad, tamaño y condición corporal. Rev Biomed. 11:107-111.
59. Palika L. 2004. Purebred rescue dog adption rewards and realities. Wiley Publishing Inc. Hoboken, New Jersey.
60. Pérez Rivero JJ, Aguilar Setién A, Martínez Maya JJ, Pérez Martínez M, Serrano H. 2007. Los Fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas. Agr Tec (Chile). 67:325-331.
61. Pérez Rivero JJ, Martínez Maya JJ, Pérez Martínez M, Aguilar Setién A, García Suárez MD, Serrano H. 2008. Phytoestrogen treatment induces testis alteration in dogs. Potential use in population control. Vet Res Commun. 33:87-95.
62. Pérez Rivero JJ, Aguilar Setién, Villa-Godoy A. 2005. Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos Vet. Mex. 36: 437-452
63. Pérez-Rivero JJ, Villa-Godoy A, Serrano H. 2005. Detección de receptores estrogénicos beta (ER β) en testículo de *Desmodus rotundus* mediante el uso de coumestrol. Vet Mex. 36: 479-474.

64. Pike ACW, Brzowskosky AE, Hubbard RT, Bonn A, Thorsell O, Engström, et al. 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and full antagonist. *EMBO J.* 18:4608-4618.
65. Popcock VJ, Sales GD, Miligan SR. 2002. Comparison of the oestrogenic effects of infant milk formulae oestradiol and phytoestrogen delivered continuously in the drink water to ovariectomised mice. *Food and Chemical Technology.* 40:643-651.
66. Ramírez-López H. 2005. Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la Provincia del Calláo. Tesis profesional Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Mayor de San Marcos (Lima, Perú).
67. Rasier G, Toppari J, Parent AS, Borgvignon JP. 2006. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogen and endocrine disrupting chemicals: A review of rodent and human data. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 254-255:187-201.
68. Renken A, Hunkeler D. Polyninylamina-based capsules: A mechanistic study of the formation using alginate and cellulose sulphate. 2007. *Journal of Microencapsulation* 24:323-336.
69. Romero C, Tarragó R, Muñoz R, Arista R, Rosado A. 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfa con grandes cantidades de coumestrol. *Vet Mex* 28:25-29.
70. Rommerts FFG, Brinkman AO. 1981. Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. *Molec. Endocrinol.* 21:15-28.
71. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Second Edition. 1: a) 6.9-6.13; b)17.3-7.87.
72. Santacruz I, Nieto MI, Moreno R. 2005. Nuevas aplicaciones de los alginatos en el conformado cerámico. *Bol Soc. Esp. Ceram. V.* 44:45-52.
73. Schneider MC, Belloto A, Adé P, Leanes LF, Corréa E, Tamayo H, Medina G Rodríguez MJ. 2005. Epidemiologic situation of human rabies in 2004. *Epidemiological Bulletin PAHO.* 26:1-16.
74. Shaw I, Mc Cully. 2002. A review of the potential of dietary endocrine disrupters on the consumer. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:471-476.
75. Serrano H, García-Suárez MD. 2001. Alteraciones en ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocitos de cerdo. *Vet. Méx.* 32:221-224.

76. Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién A, de Paz O, Villa-Godoy A. 2007. Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. *Rep Fertil. Development* 19:470-472 .
77. Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Setién A, Pérez-Martínez M, García-Suárez MD. 2008. Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptor in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuroendocrinol Lett* 29:101-104.
78. Simms D, Cizdziel PE. 1993. Trizol a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Foccus* 15:99102.
79. Skinner SM, Mills T, Kirchick HJ, Dunbar BS. 1984. Immunization with Zona Pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotrophins- induce steroid secretion. *Endocrinology*. 115:2418-2432.
80. Smrdel P, Bogataj M, Zega A, Planinsšek. 2008. Shape optimization of polisaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *J Microencapsulation* 25:90-105.
81. Takayama N. 2008. Rabies: a preventable but incurable disease. *J Infect Chemother*. 14:8-14.
82. Tarragó-Castellanos CR, García Lorenzana CM, Díaz Sánchez V, Velázquez-Moctezuma J. 2006. Gonadotrophine levels and morphological testicular features in rats after different phytoestrogen coumestrol. *NeuroEndocrinol. Lett*. 27:487-492.
83. Torre ML, Faustini M, Ettore-Attilio KM, Vigo D. 2007. Cell encapsulation in mammal reproduction. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*.1:81-85.
84. Wassarman PM. 2008. Zona Pellucida glycoproteins. *J. Biol. Chem*. 283: 24285-24289.
85. Wassarman PM, Lietscher ES. 2009. Mammalian fertilization. The egg's multifunctional zona pellucid. *Int J Dev Biol*52:665-676.
86. Whitten PL, Lewis C, Naftolin F. 1991. Dietary plant estrogen: a biologically active background for estrogen action. In: *The new Biology of steroid hormones* (Hochberg R, Naftolin F, eds.), Raven Press, New York, NY. pp 155-167
87. Whitten PL, Lewis C, Rusell E, Naftolin F. 1995. Potential adverse effects of Phytoestrogens. *J Nutrition* 125: 771-776.
88. Woclaved-Potocka I, Okuda K, Acosta TJ, Korsekwa A, Pilawski W, Skarzynski DJ. 2005. Phitoestrogen metabolites are much active than phytoestrogens themselves

in increasing prostaglandin F_{2x} synthesis via prostaglandin synthase-like
2stimulation in bovine endometrium. 78:202-217.