



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

“EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CICLO Y MUERTE CELULAR
EN EL PERIODO CRÍTICO DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA
Y SU IMPACTO EN LA ETAPA ACTIVACIONAL DE LA RATA”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ALICIA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

TUTORES:

DR. EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA - FMVZ-UNAM

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA – FMVZ-UNAM

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO – UAM-I

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

ABRIL 2017.



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.

DEDICATORIA

A mi familia y a mis grandes amores: Valeria, Gael y Salvador.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones y enseñanzas que me ha dado en la vida.

Al Dr. Álvaro Aguilar Setien, por las facilidades otorgadas para trabajar en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología.

Al Dr. Everardo González Padilla, por su confianza, su apoyo infinito y la dirección para realizar esta tesis.

A la Dra. Marcela Vergara Onofre, por el apoyo y la guía para realizar este trabajo.

A la Dra. Clara Ortega Camarillo, por la asesoría y el apoyo en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Mónica Salas Rojas y al Dr. Leonardo Perea Martínez, por su asesoría técnica en biología molecular.

Al Dr. Juan José Pérez Rivero, por su apoyo en el análisis histomorfológico y estadístico. Por ayudarme a ver la vida más simple.

A la Dra. María del Carmen Espejel del Moral, por su apoyo en el análisis histomorfológico.

A la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y al Dr. Francisco Fierro Fierro, por los comentarios y sugerencias.

A los miembros de mi Jurado y al Dr. Jorge Luis Tortora Pérez, por su tiempo y por las aportaciones para esta tesis.

Al CONACYT por la beca que me otorgo durante mis estudios de Doctorado.

A mis amigos y compañeros de los distintos laboratorios: Guillermo, Martha, Carmen, Ángel, Alejandra y Nayeli, por su ayuda, por los momentos compartidos y por aceptarme como un miembro más del equipo.

RESUMEN

Para estudiar algunos procesos asociados con la diferenciación sexual del cerebro en ratas Wistar, se midieron en el hipotálamo los cambios y la temporalidad en la expresión de algunos genes relacionados con neuroprotección (*G6pd*, *Bcl2*, *Esr1* y *Cyp19a1*), sinaptogenesis (*Ptgs2* y *Ptger2*), y apoptosis (*Bax*, *Fas* y *Esr2*), durante las siete primeras horas posnacimiento. Se midieron además los cambios histomorfológicos gonadales y uterinos en la edad adulta. Se utilizaron 42 machos y 42 hembras, que fueron asignados al azar a uno de tres tratamientos para cada sexo: testigo, vehículo del tratamiento [aceite de soya, SO (20 μ L)] y tamoxifén [Tx (200 μ g) + SO (20 μ L)] a los machos y propionato de testosterona [TP (30 μ g) + SO (20 μ L)] a las hembras. Los tratamientos se aplicaron por vía subcutánea una hora después del nacimiento. Para medir expresión de genes obtuvieron hipotálamos a 1, 3 y 6 horas post tratamiento (n=3 en casa grupo) y a partir de ellos el RNA total. Mediante QPCR se determinaron los niveles de mRNA de los genes antes mencionados utilizando β actina como gen de referencia. Para la evaluación histomorfológica, las ratas se pesaron y sacrificaron a los 90 días post-tratamiento (n=5 en cada grupo). Los testículos, los ovarios y el útero se extrajeron, se pesaron y se procesaron para tinción con Hematoxilina-Eosina. Los tratamientos con Tx (machos), TP (hembras) y/o SO, aplicados a 1 hora posnacimiento modifican la expresión de genes hipotalámicos a partir de una hora después: en los relacionados con apoptosis; en las hembras en las horas postratamiento 1 y 3, la expresión tendió ser mayor en las tratadas y en los machos la expresión de *Esr2* aumentó con el tiempo, manteniendo valores mayores a Tx. En el grupo de genes de neuroprotección la tendencia fue a que los tratados tendieran a reducir su expresión con relación a lo que ocurrió con los animales testigo en el caso de las hembras y aumentarla en los machos. Para sinaptogenesis las variaciones en la expresión de *Ptgs2* y *Ptger2* no fueron significativas entre grupos en las hembras, pero tendieron a valores mayores en los grupos tratados en los machos. En el trabajo se discuten las diferencias en el comportamiento de la expresión de los genes estudiados entre machos y hembras no tratados y entre tratados solo con SO. En los animales adultos, los tratamientos posnacimiento alteraron permanentemente la histomorfolología testicular y utero-ovarica. El Tx en machos generó vacuolización; reducción del número de espermatogonias y de células de Sertoli; redujo el peso testicular, el diámetro y área de los túbulos seminíferos y la altura del epitelio germinal e incrementó el espacio intertubular. El SO por sí solo redujo el número de espermatoцитos y espermátides, incluso más que Tx. En hembras, el TP incrementó significativamente ($P < 0.05$) el peso corporal y el número de folículos terciarios; evitó la presencia de cuerpos lúteos y redujo el número de glándulas endometriales. En los ovarios, el SO solo incrementó el número de folículos primordiales, secundarios y cuerpos luteos, y redujo el número de glándulas endometriales. En este trabajo se describe la temporalidad en el posnacimiento temprano de la expresión de algunos genes hipotalámicos, relacionados con mecanismos que pueden determinar las diferencias sexuales a nivel cerebral, y

los cambios que ocurren a nivel gonadal y uterino en la edad adulta, cuando se modifica el ambiente hormonal en el período crítico de diferenciación sexual hipotalámica. Los resultados resaltan la importancia de prevenir la exposición a disruptores endocrinos durante los periodos críticos del desarrollo, y realizar estudios específicamente diseñados para analizar el papel de productos de consumo generalizado, como el aceite de soya y otras fuentes de fitoestrógenos. Los resultados obtenidos pueden promover nuevas líneas de investigación sobre control de la reproducción de animales no deseables en algunas circunstancias.

Palabras clave: Diferenciación sexual del hipotálamo; Tamoxifen; propionato de testosterona; aceite de soya; expresión de genes; disruptores endocrinos; histomorfología gonadal.

ABSTRACT

To study some processes associated with sexual differentiation of the brain in Wistar rats, the changes and temporality in the expression of some genes related to neuroprotection (*G6pd*, *Bcl2*, *Esr1* and *Cyp19a1*), synaptogenesis (*Ptgs2* and *Ptger2*) and apoptosis (*Bax*, *Fas* and *Esr2*) were measured in the hypothalamus, during the first seven hours post birth. The gonadal and uterine histomorphological changes were also measured in adulthood. Forty-two male and 42 female rats were used, which were randomly assigned to one of three groups for each sex: control; vehicle, soybean oil (SO), 20 μ L s.c.; treatment: tamoxifen [Tx (200 μ g) + SO (20 μ L)] to males and testosterone propionate [TP (30 μ g) + SO (20 μ L)] to females. The treatments were administered subcutaneously one hour after birth. To measure gene expression, hypothalami were obtained at 1, 3 and 6 hours post-treatment (n=3 in each group) and from them total RNA. The levels of mRNA of the aforementioned genes using β actin as the reference gene were determined by Q-PCR. For histomorphological evaluation, rats were weighed and sacrificed at 90 days post-treatment (n=5 in each group). The testes, ovaries and uterus were removed, weighed and processed for Hematoxylin-Eosin staining. Treatments with Tx (males), TP (females) and/or SO, applied at 1 hour after birth modify the expression of hypothalamic genes from an hour later: in those related to apoptosis; In females at hours 1 and 3 post-treatment, the expression tended to be higher in the treated and in males *Esr2* expression increased over time, maintaining values higher than Tx. In the group of neuroprotection genes the trend was that the treated tended to reduce their expression in relation to what occurred with the control animals in the case of the females and to increase it in the males. For synaptogenesis, variations in the expression of *Ptgs2* and *Ptger2* were not different between groups in females, but tended to be higher in the groups treated in males. In the paper we discuss the differences in the behavior of the expression of the genes studied between untreated males and females and between those receiving SO only. In adult animals, postnatal treatments permanently altered testicular and uterus-ovarian histomorphology. Tx in males generated vacuolization; reduction in the number of spermatogonies and Sertoli cells; reduced the testicular weight, the diameter and area of the seminiferous tubules and the height of the germinal epithelium and increased the intertubular space. SO alone reduced the number of spermatocytes and spermatids, even more than Tx. In females, TP significantly increased body weight and number of tertiary follicles; prevented the presence of corpora lutea and reduced the number of endometrial glands. In the ovaries, SO only increased the number of primordial, secondary follicles and corpora lutea, and reduced the number of endometrial glands. In this paper we describe the temporality in the early postnatal expression of some hypothalamic genes, related to mechanisms that can determine sexual differences at the cerebral level, and changes occurring at the gonadal and uterine levels in adulthood, when modifying the hormonal environment in the critical period of hypothalamic sexual differentiation. The results highlight the importance of

preventing exposure to endocrine disruptors during critical developmental periods, and conduct studies specifically designed to analyze the role of generalized consumer products such as soybean oil and other sources of phytoestrogens. The results obtained can promote new lines of research on control of the reproduction of undesirable animals in some cultures.

Keywords: Sexual differentiation of the hypothalamus; Tamoxifen; Testosterone propionate; soybean oil; Gene expression; Endocrine disruptors; Gonadal histomorphology.

TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS

ARTÍCULOS EN REVISTAS INDEXADAS

González GA, González PE, Fierro FF, Juarez-Mosqueda MDL, Perez-Rivero JJ, Ortega CC, Salas RM, Vergara OM. 2016. A single neonatal administration of soybean oil and/or tamoxifen permanently affects testis histomorphology in adult rats. *Veterinaria Mexico Open Acces*. 3(2):1-13.

EN PRAPARACIÓN

González GA, González PE, Fierro FF, Juarez-Mosqueda MDL, Perez-Rivero JJ, Ortega CC, María del Carmen Espejel DMMC, Vergara OM. 2016. Effect of a single neonatal administration of testosterone propionate and/or soybean oil on reproductive tract histomorphology in adult female rats.

González GA, González PE, Fierro FF, Juarez-Mosqueda MDL, Perez-Rivero JJ, Ortega CC, Vergara OM. 2016. Changes in gene expression, induced by a single administration of tamoxifen (males), testosterone propionate (females) and/or soybean oil, in the critical period of hypothalamic sexual differentiation in rats.

TRABAJOS EN CONGRESOS

González GA, González PE, Fierro FF, Juarez-Mosqueda MDL, Perez-Rivero JJ, Ortega CC, Salas RM, Vergara OM. LI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Cambios histomorfológicos en el testículo de rata en la edad adulta, ocasionados por la administración durante el periodo crítico de diferenciación sexual hipotalámica con tamoxifén (tx) y/o aceite de soya (as). Hotel Del Rey Inn. Toluca Estado de México. Noviembre del 2015.

González GA, González PE, Fierro FF, Juarez-Mosqueda MDL, Perez-Rivero JJ, Ortega CC, Salas RM, Vergara OM. XLII Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y la Seguridad Alimentaria, A.C. (AMPA) 2015. Cambios histomorfologicos en el testículo de rata adulta, ocasionados por la administración de tamoxifén y/o aceite de soya, durante la diferenciación sexual hipotalámica de la rata. Colegio de posgraduados Campus Montecillos. Chapingo, Estado de México. Octubre del 2015.

XL XXIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Perfil de expresión de genes relacionados con ciclo y muerte celular durante la diferenciación sexual hipotalámica de la Rata. Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba. Octubre de 2014.

VII Congreso de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Exposición Oral. Perfil de expresión de genes relacionados con ciclo y muerte celular durante la diferenciación sexual hipotalámica de la Rata. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. Ciudad Universitaria. Agosto del 2012.

Segundo Congreso de Alumnos de Posgrado. Cartel. Perfil de expresión de genes relacionados con ciclo y muerte celular durante la diferenciación sexual hipotalámica de la Rata, inducida mediante la administración de Propionato de Testosterona en hembras y Tamoxifén en machos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. Ciudad Universitaria. Abril del 2012.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Diferenciación Sexual	4
Diferenciación sexual cromosomal	4
Diferenciación sexual gonadal	5
Diferenciación sexual del SNC	6
El hipotálamo	7
Efecto del estrés sobre la regulación hipotalámica	8
Periodo critico	10
Hormonas que influyen en la diferenciación sexual del SNC	10
Andrógenos	10
Estrógenos y la enzima P450 aromatasa	11
Prostaglandina E2 y la enzima Ptgs2	13
Tamoxifén	13
Mecanismos de acción del estradiol	14
Neurogénesis	16
Neuroprotección	16
Producción de neurotransmisores	17
Apoptosis	18
Cambios morfológicos	19
Vías de señalización	20
Vía intrínseca	20
Vía extrínseca	21
Reguladores de apoptosis	22
CAPITULO I	24
Cambios en la expresión de genes, inducidos por una sola administración de tamoxifen (machos), propionato de testosterona (hembras) y/o aceite de soya, en el periodo crítico de la diferenciación sexual hipotalámica en la rata.	24
Resumen	24
Introducción	25
Materiales y Métodos	27
Resultados	32
Discusión	44
Conclusión	49
Agradecimientos	50
Referencias	50

CAPITULO II	57
A single neonatal administration of soybean oil and/or tamoxifen permanently affects testis histomorphology in adult rats	57
Abstract	57
Introduction	57
Materials and Methods	58
Results and discussion	60
Conclusions	64
Acknowledgements	65
References	65
CAPITULO III	70
Efecto de una sola administración neonatal de propionate de testosterona y/o aceite de soya sobre la histomorfología del tracto reproductivo en ratas hembra adultas.	70
Resumen	70
Introducción	71
Materiales y Métodos	73
Resultados	76
Discusión	86
Conclusión	90
Referencias	90
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL	97
REFERENCIAS GENERALES	110

EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CICLO Y MUERTE CELULAR, EN EL PERIODO CRÍTICO DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA Y SU IMPACTO EN LA ETAPA ACTIVACIONAL DE LA RATA.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, las diferencias entre machos y hembras se establecen durante el proceso de diferenciación sexual, que inicia a nivel cromosómico durante la fertilización del ovocito, continúa a nivel gonadal durante la gestación y finalmente a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) en etapas perinatales. Por ello, además de las diferencias en el sistema reproductivo, también ocurren a nivel cerebral.

La diferenciación sexual es un proceso que involucra cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y conductuales, conocidos en su conjunto como “dimorfismo sexual” (Raisman y Field, 1973; Gorsky, 1985), que determina estereotipos de conducta, orientación sexual, cortejo y de cópula característicos de cada sexo, y que son necesarios para la adecuada reproducción sexual de los individuos.

La diferenciación sexual en el SNC ocurre durante el desarrollo neural, en una etapa temprana conocida como “periodo crítico”, un lapso de sensibilidad hormonal donde el estradiol, proveniente de la aromatización de la testosterona de origen gonadal, es el principal inductor de este proceso. En el que las neuronas de ciertas áreas dimórficas del hipotálamo, deben reorganizarse y sufrir un reajuste poblacional mediante apoptosis. Los cambios en los núcleos o circuitos cerebrales están asociados al desarrollo cognitivo y a la fisiología cerebral, lo que establece el patrón hormonal y la conducta reproductiva propia de cada sexo. Es por ello que la presencia o ausencia de hormonas esteroides

durante el periodo crítico de diferenciación sexual cerebral, delimita la congruencia entre la genética, el fenotipo y el comportamiento sexual del individuo (McEwen y Alves, 1999; Roberts y col., 2008).

La unión de los estrógenos con sus receptores alfa (α) o beta (β), pueden inducir la transcripción de genes implicados en los mecanismos que establecen el dimorfismo sexual del SNC, entre los que se encuentran: sinaptogénesis; neurogénesis; o apoptosis. A través de estos mecanismos el estradiol podría inducir la expresión de genes que modifican el número de neuronas y/o las conexiones sinápticas durante el desarrollo de los núcleos hipotalámicos. Sin embargo, dependiendo de la sensibilidad del tejido neural hacia esta hormona durante el “periodo crítico”, el estradiol puede tener un efecto diferente en hembras y en machos (Yonehara y col., 2003).

La rata se ha utilizado como un modelo para estudiar la diferenciación sexual cerebral. El “periodo crítico” de esta especie se extiende desde el día 18 de la vida gestacional hasta el día 10 post-nacimiento. En el caso de los machos, al final de la vida gestacional y principalmente a las 2 horas posteriores al nacimiento se elevan los niveles de testosterona, lo que desencadena el proceso de “masculinización” del hipotálamo (Anne y col., 2011). Por el contrario, en los fetos hembra las alfa-feto-proteínas circulantes, que se sintetizan en el hígado fetal, se unen al estradiol y protegen al cerebro de su efecto masculinizante. Durante el “periodo crítico” la testosterona gonadal en el macho intacto, o la administración exógena a una hembra o macho castrado masculiniza de manera permanente el cerebro (Weis y Gunsalus, 1973; Babichev y col., 1990).

El estradiol es importante para el dimorfismo sexual. Esto se ha corroborado a través del uso de tamoxifén (Tx), un antiestrógeno que interfiere en la interacción del estradiol con su receptor en el hipotálamo, y que además inhibe a

la aromatasa, enzima encargada de la transformar a los andrógenos testiculares en estrógenos. La administración de Tx a ratas macho dentro de este mismo periodo, feminiza de manera permanente el hipotálamo (Barraclough, 1967; Dörner y Hinnz 1967; Herrera y col., 2005)

Además del Tx (en machos) y el propionato de testosterona (PT; en hembras), existen otros productos químicos que pueden alterar el efecto hormonal, afectando el crecimiento, el desarrollo sexual y el comportamiento. Los compuestos que imitan o antagonizan el efecto de los estrógenos y/o andrógenos son conocidos como disruptores endocrinos (DECs; Wilson and Davies, 2007) y pueden enviar mensajes contradictorios al cuerpo causando anomalías en el desarrollo con efectos irreversibles. La presencia de EDCs durante el periodo crítico, conlleva repercusiones funcionales en el cerebro en la edad adulta (Abbott y col., 2005).

Esta demostrado que la capacidad funcional del cerebro de la rata en la vida adulta depende del ambiente hemócrino en el que se encuentra el hipotálamo durante el período crítico, y que los tratamientos hormonales en esta etapa modifican el desarrollo normal de la conducta y la fisiología reproductiva. Décadas atrás se reporto el uso indiscriminado de Tx y de PT con fines terapéuticos (referencia). Sin embargo, poco se ha enfatizado sobre sus efectos negativos.

La diferenciación sexual cerebral es un proceso complejo del que aún hay poca información. Para conocer los mecanismos que pueden estar participando en este proceso, el objetivo de este trabajo fue determinar la temporalidad en la expresión de algunos genes relacionados con: neuroprotección (*G6PD*, *Bcl2*, *Esr1* y *Cyp19a1*), neurogénesis (*Ptger2*), sinaptogénesis (*Ptgs2*) y apoptosis (*Bax*, *Fas* y *Esr2*) en hipotálamos de ratas macho y hembra, en etapas tempranas del nacimiento (2, 4 y 7 horas) y los cambios histomorfológicos en el tracto

reproductivo que tienen lugar en la edad adulta (90 días de edad) cuando se modifica el ambiente hormonal hipotalámico durante el “periodo crítico”.

REVISIÓN DE LITERATURA

Diferenciación sexual

La diferenciación sexual es el proceso en el que se determinan las diferencias sexo específicas entre machos y hembras, término conocido como “dimorfismo sexual”. El cual ocurre de manera secuencial en tres etapas: la cromosomal; la gonadal; y la del SNC.

En los mamíferos, las interacciones entre señales genéticas, hormonales y celulares, parecen definir la formación del fenotipo masculino o femenino (Morelli y Cohen, 2005), cuyo propósito es desarrollar características sexo-específicas (morfología, funcionalidad y de comportamiento) relacionadas con la anatomía y fisiología apropiadas para la reproducción sexual (Wilhelm y col., 2007).

Diferenciación sexual cromosomal

En esta etapa se determina el sexo genético. Comienza con la entrada del cromosoma X o Y del núcleo espermático dentro del núcleo del ovocito, durante la fertilización (Marshall Graves, 2000; Mittwoch, 2000). El cromosoma sexual es el que define la diferenciación sexual en mamíferos (Fleming y Valain, 2004). Específicamente, el cromosoma Y presente en los genitales embrionarios interviene en el desarrollo testicular y la espermatogénesis (Marshall Graves, 2000). Los pares cromosomales del fenotipo femenino son XX y los del fenotipo masculino son XY, por lo que se considera que el fenotipo masculino se expresa y diferencia a partir del femenino (Casper y Van Doren, 2006).

Diferenciación sexual gonadal

El gen determinante sexual *Sry* contenido en el cromosoma Y induce la expresión de genes como *Sox9*, el cual participa en la diferenciación de las células de Sertoli en lugar de las células de la granulosa, y con ello, en la determinación de los genitales masculinos en el embrión, durante la formación testicular. Sin embargo, *Sox9* también participa en procesos como: la formación del esqueleto, cerebro, piel, páncreas y riñones entre otros órganos (Gonen y col., 2017).

Los genes *GATA4*, *LHX9*, *L1M1*, *WNT1* y *SF1* regulan positivamente la expresión del gen *Sry*, y una vez ocurrida la diferenciación de la cresta genital, los niveles decaen. El gen *Sry* activo se puede detectar en la cresta genital y en células cerebrales (Park y Jameson, 2005).

El estudio del desarrollo del tracto reproductivo femenino ha sido muy limitado, principalmente porque se considera que la diferenciación sexual femenina es un proceso que ocurre por default. Los genes de diferenciación sexual *Sry* y *Sox9*, al parecer no participan en la diferenciación de la hembra; pero, la expresión de algunos genes masculinos se suprime durante este proceso. Este es el caso del gen *DAX1*, que inhibe los genes masculinos e incrementa los genes reguladores del desarrollo y crecimiento ovárico, como el *SF1* y *SOX9* (Wilson y Davies, 2007). El gen *DAX1* está presente en ambos sexos hasta la mitad de la gestación (aproximadamente hasta el día 12 en el ratón). Posteriormente *DAX1* y *WNT4* solo se expresan en la hembra. *DAX1* inhibe la expresión de genes que masculinizan el tracto reproductor, como *Sry*, *WT1* y *SF1*. Asimismo, actúa directamente sobre *WNT4* y regula la expresión de *WNT7* para controlar el desarrollo de los conductos müllerianos hacia oviducto, útero, cérvix y vagina (Rey y col., 2003). La formación y el desarrollo de las células de la granulosa y los ovocitos, son controlados por los genes *FOXL2* y *FIGX* (Loffler y Koopman, 2002; Fleming y Vilain, 2004).

Diferenciación sexual del SNC

Es el proceso mediante el cual se establecen las diferencias entre machos y hembras a nivel del SNC, incluyendo: el número de neuronas, la morfología y sus interconexiones, asociados con la fisiología cerebral y el tamaño de los núcleos cerebrales (Barraclough, 1967; Neil y col., 1981). Estas diferencias son debido a la secreción de hormonas testiculares durante el periodo crítico del desarrollo. En el caso de la rata, este periodo ocurre en las etapas prenatal y post-natal, específicamente desde el día 18 de la vida gestacional hasta el día 10 posterior al nacimiento. En los machos, la secreción de testosterona de origen testicular a la hora 2 post-nacimiento desencadena el proceso de masculinización del SNC. La presencia o ausencia de testosterona puede influir sobre los esteroides adrenales, los factores de crecimiento y los neurotransmisores para generar cambios permanentes en la organización neuronal, y en consecuencia, al establecimiento de características específicas en el desarrollo y el comportamiento entre machos y hembras, relacionadas con la anatomía y fisiología apropiada para la reproducción sexual (Wilhelm y col., 2007).

Dörner y Hinz (1967) encontraron que en el periodo crítico, la presencia de testosterona proveniente de los testículos en un macho intacto, o debido a la administración exógena en una hembra o macho castrado, masculiniza permanentemente a estos animales. Años más tarde, Jost y col. (1973), demostró la importancia de los esteroides sexuales en la diferenciación sexual cerebral al comparar a machos castrados al inicio de la vida neonatal con hembras tratadas con testosterona en edad neonatal; ambos sexos, en la vida adulta presentaron masculinización, funciones endocrinas y comportamiento similar.

El término masculinización, se refiere a la capacidad para exhibir características y patrones propios de los machos. Tal es el caso de: la secreción tónica de gonadotropinas; conductas copulatorias (Gorski y Warner, 1965; Castro y McCann, 1975), marcaje de territorio, postura de micción (Beach, 1976), conducta

social y reacción a los estímulos sensoriales (Beatty, 1979). Por otro lado, la desfeminización es el término que se refiere a la pérdida del desarrollo de características femeninas como: lordosis por la presencia del macho; y patrones cíclicos de ovulación y secreción de gonadotropinas (Christensen y Gorski, 1978).

Las diferencias sexuales a nivel cerebral: morfológicas; neuroquímicas; fisiológicas (Pfaff, 1980; Allen, 1989); y de los circuitos neuronales, en su conjunto se denomina “dimorfismo sexual”. Los núcleos dimorficos sexuales relacionados con la función reproductiva son: el ventromedial; supraquiasmático y preóptico; la amígdala; el órgano vomeronasal y la estría terminal (Goy y McEwen, 1980; Robinson y col., 1986; Döhler y col., 1986). Los cuales, establecen las bases de la adecuada función cerebral, por la que, tanto los machos como las hembras tienen patrones conductuales de orientación sexual, cortejo y cópula (Gorski, 1985) propios de su sexo, y donde la coordinación entre la función gonadal y estos patrones conductuales, fisiológicos y ambientales, es importante para asegurar el éxito reproductivo de los individuos y la transmisión de sus genes a la siguiente generación.

El Hipotálamo

Una de las estructuras más importantes y complejas en el SNC es el hipotálamo, conocido como el centro regulador vegetativo, nervioso y neuroendocrino. (Schneeberger y Claret, 2012). Además, regula el consumo de alimentos y el peso corporal (Bakker y col., 1993; Schneeberger y Claret, 2012); la conducta de agresividad (Barr y col., 1976) y marcaje de territorio; la postura de la micción (Beach, 1976), la conducta (Dawson y col., 1975) y el comportamiento (Ehrhardt, 1974) ante los estímulos. También está relacionado con la fisiología y la conducta reproductiva (Goy y McEwen, 1980; Robinson y col., 1986), ya que posee la mayor concentración de receptores a hormonas sexuales (andrógenos,

estrógenos y progesterona) en el cerebro (Pfaff y Schwartz, 1988). Su estructura anatómica y su composición, son muy similares en todos los mamíferos. Además, su proximidad con la hipófisis favorece la coordinación de los procesos homeostáticos.

El hipotálamo esta dividido nucleos (conjuntos de neuronas con características y funciones similares), en los cuales se secretan factores liberadores o inhibidores de la síntesis y secreción hormonal, como las hormonas secretadas por la glándula pituitaria: la hormona de crecimiento (GH); la hormona estimulante de la tiroides (TSH); la hormona adrenocorticotropica (ACTH); la hormona folículo estimulante (FSH); la hormona estimulante de los melanocitos (MSH); la hormona luteinizante (LH); y la prolactina (PRL). Por lo que participa en diversos procesos, entre los que se encuentran: parto; lactancia; y metabolismo hídrico entre otros. En ratas adultas, la secreción de hormonas gonadotrópicas es distinta entre hembras y machos. En hembras, la FSH y LH son secretadas de manera cíclica cada 4 o 5 días. De hecho, durante el proestro incrementan los niveles de LH (Campbell y Schwartz 1977) debido al aumento de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (Castro y McCann, 1975). En los machos, la secreción de estas hormonas es tónica. La diferencia en el tipo de secreción, al parecer esta determinada por el dimorfismo sexual del área preoptica medial (MPOA), que en el caso de los machos además de presentar una mayor densidad neuronal, tiene un tamaño de 3-6 veces mayor en comparación con las hembras (Gorski, 1978).

Efecto del estrés sobre la regulación hipotalámica

La activación del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (HHA) es un mecanismo que se da como respuesta a los estímulos estresantes, con la finalidad de generar ciertos cambios encaminados a mejorar la adaptabilidad de los individuos. Comienza con la secreción de la hormona liberadora de corticotropinas (CRH) en el hipotálamo,

estimulando la secreción de la ACTH en la hipófisis, y a su vez, la secreción de glucocorticoides desde la corteza adrenal. Actualmente se sabe que la activación del eje HHA ejerce un efecto negativo sobre la reproducción. Esto, se debe a la alteración en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) a nivel hipotalámico (Rivier y Rivest, 1991); por lo tanto, también se inhibe la secreción de gonadotropinas, principalmente de LH, a nivel de la hipófisis; y finalmente, a nivel gonadal se altera la función folicular, lutea y testicular (Tilbrook y col., 2000) y con ello, la producción de hormonas como testosterona y estradiol.

La GH es secretada por células acidófilas en la adenohipófisis, pero su producción y liberación se regula principalmente en el hipotálamo, por la interacción entre las hormonas liberadora (GHRH) y la inhibidora GHIH) de la hormona del crecimiento (por las siglas en inglés: Growth Hormone-Releasing Hormone y Growth Hormone-Inhibiting Hormone, respectivamente).

La GH estimula procesos como la osteogénesis, la mitosis y el crecimiento celular. Esta hormona puede actuar directa o indirectamente. De manera directa, esta hormona se une a sus receptores de membrana específicos en las células de tejidos en crecimiento. De manera indirecta, actúa mediante los IGFs (factores de crecimiento insulínicos), también llamados somatomedinas, que son producidos por los hepatocitos. De los cuales, el IGF-1 incrementa la síntesis de proteínas y estimula la división celular. Sin embargo, algunas situaciones estresantes como el transporte, la sujeción o el aislamiento de los animales, puede activar el eje HHA. Si el estrés es prolongado o excesivo, incluso se puede inhibir la reproducción (Charmandari y col., 2005; Chrousos y col., 1998; Dobson y Smith, 2000; Dobson y col., 2001), el crecimiento y la ganancia de peso, para disminuir la demanda metabólica de los animales (Alvarez 2008).

Periodo crítico

De manera fisiológica el periodo en el cual se lleva a cabo la diferenciación sexual del SNC, depende del grado de maduración del cerebro al momento del nacimiento, así como del tiempo de sensibilidad a las hormonas gonadales. Por ello, este evento puede ocurrir en etapas perinatal, prenatal, o postnatal temprana, según la especie de que se trate (Christensen y col. 1978). Este periodo de sensibilidad hormonal se conoce como “periodo crítico” de la diferenciación sexual cerebral. En el caso de la rata, ocurre durante el post-nacimiento temprano y se extiende hasta los días 7 al 10 en hembras, y sólo hasta el día 5 en los machos (Gorsky, 1985).

Durante el periodo crítico, sin manipular las gonadas, se pueden administrar tratamientos para modificar los ambientes hormonales e inducir la diferenciación sexual cerebral (Arnold y Gorski 1984). Sin embargo, es importante conocer que los tratamientos deben ser dosis-dependiente, es decir, que a medida que la sensibilidad sea mayor, menores serán los requerimientos hormonales (Swanson y Van, 1965).

Hormonas que influyen en la diferenciación sexual del SNC

Diversos estudios han permitido conocer y definir los periodos críticos para la diferenciación sexual cerebral, así como el tipo de esteroides y la manera en la que actúan para organizar las estructuras hipotalámicas y la función del SNC.

Andrógenos

Los primeros estudios realizados por Pleiffer, (1936) con injertos ováricos, en ratas macho adultas y recién nacidas, permitieron conocer que las hormonas gonadales en los neonatos, participan en la regulación de las funciones

neuroendocrinas en la vida adulta. Pero fue hasta 1959 que Phoenix y col., propusieron que estas hormonas actuaban sobre el hipotálamo, y que, la testosterona, a través de su metabolito, el estradiol, establecía las conductas copulatorias en los machos (Gorski y Warner, 1965).

Los andrógenos, estimulan el desarrollo de las características sexuales secundarias en los machos que inician la transición hacia la madurez sexual. Los sitios de producción son los testículos (principalmente testosterona), la corteza de las glándulas suprarrenales (dihidroepiandrosterona) y los ovarios (androstenediona, como precursor de los estrógenos). Sin embargo, al final de la gestación y principalmente a las dos horas después del nacimiento, durante el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral, en el cerebro de la rata macho se incrementan los niveles de testosterona de origen testicular (Anne y col., 2011). En esta etapa los andrógenos, sean endógenos o exógenos como el PT, desencadenan cambios permanentes en la funcionalidad del cerebro y conducen a la masculinización cerebral (Gorski, 1968). Las hembras por su parte, también son sensibles a la testosterona, pero no son expuestas a altos niveles como los machos (McCarty, 2016).

El dimorfismo sexual respecto a la conducta masculina es menos marcado en la rata. Las hembras pueden exhibir conducta de monta (Whalen, 1968) de manera normal. Sin embargo, la exposición a PT exógena incrementa la conducta masculina (Christensen y Gorski, 1978).

Estrógenos y la enzima P450 aromatasa

Los estrógenos son las hormonas sexuales femeninas. La aromatasa es la enzima que cataliza la conversión de androgenos a estrógenos en los ovarios, testículos, cerebro, placenta (durante la la gestación) y en las glándulas

adrenales. Durante la diferenciación sexual cerebral, en las neuronas del hipotálamo, la testosterona es convertida a estrógenos y estos a su vez pueden actuar en dos etapas diferentes: en una fase de "organización" durante el periodo prenatal y postnatal temprano, y en una fase de "activación" en la edad adulta (Phoenix y col., 1959). El efecto organizacional del estradiol es indispensable para el establecimiento del dimorfismo sexual en el hipotálamo (Lauber y col., 1996) y los circuitos neuronales que regulan la secreción de gonadotropinas y el comportamiento reproductivo característico de los machos (Simerly, 2002).

Los estrógenos, en el cerebro en desarrollo y en el adulto, ejercen diversas funciones: cognitivas; dolor; habilidades motoras finas; susceptibilidad para convulsionar, estado de ánimo, regulación de la temperatura y el sueño (Beyer, 1997).

Un solo gen (*Cyp19*) codifica la aromatasa, por lo que la inhibición de dicho gen, impide la producción de estrógenos en el cuerpo entero (Jones y col., 2006). El gen de la aromatasa (*Cyp19a1*) se expresa en distintas neuronas del hipotálamo, hipocampo y la amígdala. En el hipotálamo, se localiza en el área preoptica medial y en el núcleo ventromedial y su expresión es inducida por el estradiol a manera dosis-dependiente (Bertan y col., 2009). Asimismo, sus efectos son inhibidos por los antagonistas del estradiol.

Aun se desconoce la vía de señalización o el mecanismo molecular que regula al promotor de la aromatasa en el cerebro. Al parecer las proteínas cinasas A y C y el AMPc regulan su expresión y su actividad (Lavaque y col., 2006). Sin embargo, investigadores como Zhao y col. 2007, señalan que la testosterona incrementa el RNAm de la aromatasa y la actividad enzimática en el cerebro.

Prostaglandina E2 y la enzima Ptgs

Las prostaglandinas son sustancias lipídicas derivadas de los eicosanoides que funcionan como mediadores celulares. Especialmente la prostaglandina E₂ (PGE₂) puede inducir el incremento de las prolongaciones dendríticas al igual que el estradiol durante el periodo crítico de la diferenciación sexual hipotalámica en la rata. Esto permite suponer que el gen de la ciclooxigenasa (COX), la enzima que se requiere para transformar el ácido araquidónico en PGE₂, es uno de los factores que regulan el efecto del estradiol durante el proceso de masculinización del hipotálamo, y que el sistema COX-PGE₂ es necesario en este proceso, pero no influye en la desfeminización de los mecanismos de conducta (Amateau y McCarthy., 2004).

La ciclooxigenasa es conocida también como prostaglandina-endoperoxido sintetasa (Ptgs), es la enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas. Existen dos isoformas de la enzima: la Ptgs1 que es constitutiva; y la Ptgs2 que es inducible. Por ello, la expresión y distribución de Ptgs2 en los tejidos varía, y su expresión es regulada por inductores como la inflamación.

Durante la diferenciación sexual del hipotálamo, la lisofosfolipasa A2 libera el ácido araquidónico de los triglicéridos y, después, la PGE-sintetasa lo transforma en PGE. El aumento de PGE permite la liberación de glutamato en los astrocitos (Rocca B., 2006) y esto induce el incremento en la formación de espinas dendríticas (Amateau y McCarthy 2004).

Tamoxifén

El papel de los estrógenos en la reproducción sexual se ha confirmado con el uso de antiestrógenos como el tamoxifen (Tx; Z-1-[4-(2-dimethylamino-ethoxy)-phenyl]-1, 2-diphenyl-1-butane) (Barraclough, 1967; Dörner y Staudt, 1968; Döhler

y col.,1984), un fármaco sintético comúnmente utilizado contra el cáncer de mama, que ejerce diversos efectos biológicos, y puede actuar como un agonista o antagonista de los estrógenos dependiendo de la dosis, el órgano blanco, el sexo y la especie (Gill-Sharma y col.,1993; Furr y Jordan, 1984; Macnab y col.,1984).

En ratones macho, la administración neonatal (24 horas post-nacimiento; 20 o 100 µg/día por 5 días; Iguchi y Hirokawa, 1986) de Tx afecta el desarrollo de los testículos y de las glándulas accesorias, además de generar infertilidad (Taguchi, 1987). El Tx impide la interacción del estradiol con su receptor en el hipotálamo, e inhibe a la enzima aromatasa, conduciendo a la feminización cerebral (Döhler y col.,1985). En adultos, afecta de manera irreversible el eje hipotálamo-hipófisis (Gill-Sharma y col.,1993). Balasinor y col., (2001) encontraron una reducción-dosis dependiente en la fertilidad debido a la pérdida de embriones, en hembras apareadas con ratas macho tratadas con Tx.

En ratas macho, la administración posnatal de 10 µg y 100 µg de tamoxifén, interfiere con el crecimiento y diferenciación del APO del hipotálamo y reduce entre el 26% y el 40% el volumen de este núcleo (Döhler y col., 1984). Además, que una sola dosis sc de Tx (200 µg) a una hora después del nacimiento modifica la expresión de algunos genes hipotalámicos (Herrera y col., 2013). En hembras, el tratamiento posnatal con tamoxifén induce esterilidad anovulatoria en forma permanente y una reducción del APO (Döhler y col., 1984).

Mecanismos de acción del estradiol

En las células hipotalámicas, el efecto del estradiol depende de la interacción con los dos tipos de receptores: alfa (ER α) o beta (ER β), los cuales presentan la misma afinidad por los estrógenos, pero su respuesta es diferenciada (Shughrue y col., 1998), pudiendo tener un efecto neuroprotector (ER α o heterodímeros ER α -

Er β) o inductor de muerte celular por apoptosis (ER β , en ausencia del ER α) (Nielsen y col., 2000).

El estradiol induce la expresión de genes en el hipotálamo (Simerly, 2002; Tobet , 2002) que determinan el desarrollo y crecimiento neuronal, y la interacción sináptica entre los diversos núcleos, necesarios para el funcionamiento neuronal adecuado.

Los genes *Esr1* y *Esr2* codifican los receptores α y β , respectivamente. Estos receptores pueden formar homodímeros o heterodímeros que al unirse a los estrógenos forman el complejo hormona-receptor (E₂RE) y se unen al elemento de respuesta a los estrógenos (ERE) en el ADN (ácido desoxiribonucleico). Al complejo E₂-RE-ERE se unen proteínas coactivadoras que estabilizan los factores de transcripción y promueven el ensamble del complejo de iniciación de la transcripción (Beato, 1989; Klinge, 2000). De esta manera los estrógenos podrían organizar la morfología y la funcionalidad del hipotálamo (Pelletier y col., 1988).

Los RE1 y RE2 se encuentran distribuidos en el cerebro anterior, el hipotálamo y la amígdala, así como en las subdivisiones de estas regiones, principalmente en los núcleos involucrados en las funciones reproductivas (Tobet, 2002). En la rata hembra durante el desarrollo y en la vida adulta, los niveles de ARNm y la proteína del receptor α son más altos (Zhou y col., 1995; Yokosuka y col., 1997), mientras que en el macho los niveles del RNAm del RE β son más altos que en las hembras en el periodo del día 17 de vida gestacional hasta los 15 días después del nacimiento. En este periodo ocurre la mayor síntesis de estradiol en el SNC (Karolczak y Beyer, 1998). Lo cual podría indicar que la sobre expresión del RE β , los niveles altos de estradiol, y la expresión de la aromatasa en el APO del macho, son necesarios para la diferenciación sexual (Patrone y col., 2000).

Neurogénesis.

La neurogénesis se refiere a la producción de células del SNC. Este proceso está relacionado con proliferación y diferenciación celular, que determinarán el número de neuronas. La diferenciación neuronal también se encuentra ligada al ciclo celular, ya que las células que salen de éste en fases tempranas exhiben características distintas a las que salen en fases tardías. Por ello, aunque estén regulados por distintos procesos, debe existir una coordinación entre el ciclo celular y la diferenciación neural. La neurogénesis ocurre durante la etapa prenatal. Posiblemente, la migración neuronal, la diferenciación neural y la sinaptogénesis ocurran de manera simultánea. En la rata, la neurogénesis del APO medial ocurre alrededor del día 16 de la vida gestacional (Gorski, 1978; Althman y Bayer, 1978; Goldstein y col., 1990). La administración de timidina tritiada a hembras en diferentes días de gestación, para evaluar el tiempo de incorporación de este marcador en fase S del ciclo celular, permitieron corroborar que la neurogénesis en el APO media termina a los 16 días de gestación. En otro experimento donde se utilizaron marcadores de proliferación celular como la bromodexosuridina (BrdU), administrados a ratas durante los días 13 y 18 de la gestación, permitieron conocer que la neurogénesis ocurre en este lapso de gestación en el área preóptica de la rata (Nishizuka y col., 1993).

Neuroprotección

Las hormonas esteroideas ejercen un efecto neuroprotector en la diferenciación sexual cerebral. Sin embargo, los estrógenos pueden tener diferente efecto en hembras y en machos, debido a la distinta sensibilidad que presenta el tejido neural hacia estas hormonas, al tipo de receptor y a su localización, así como a la disponibilidad de hormonas (Green y col., 2000).

Trabajos realizados “*in vitro*” con células hipotalámicas de rata, demostraron que para que los estrógenos ejerzan su acción neuroprotectora, las células deben presentar receptores α y β (Nielsen y col., 2000; Temple y col., 2001). La presencia sólo del receptor β activa procesos de muerte celular. El efecto neuroprotector de los estrógenos en células hipotalámicas, se debe a que este esteroide actúa sobre el receptor α para inducir la sobreexpresión de genes antiapoptóticos de la familia de bcl-2, mientras que en el caso de las células que sólo expresan el receptor β , el estradiol activa el sistema primario de inducción de apoptosis Fas-Fas ligando (FasL) (Mor y col., 2000).

Producción de neurotransmisores

Las hormonas gonadales activan la conducta sexual en las estructuras del sistema nervioso, lo cual sugiere la interacción entre las hormonas gonadales y los neurotransmisores, que actúan como mediadores químicos en la comunicación interneuronal. Los neurotransmisores podrían participar en el desarrollo de las diferencias sexuales del SNC. Se ha observado que la administración prenatal de drogas que afectan a los sistemas adrenérgicos, colinérgicos (McEwen, 1982), serotoninérgicos, dopaminérgicos y gabaérgicos (Segovia y col., 1991), influyen en el desarrollo del dimorfismo sexual cerebral y por lo tanto de las conductas reproductivas. Entre machos y hembras, se han encontrado diferencias en el contenido de neurotransmisores y de la actividad enzimática en los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y colinérgico (De Vries y col., 1984). También, en el número de sus receptores (Segovia y col., 1991, Avissar y col., 1981; Orensanz y col., 1983). Esto sugiere un dimorfismo sexual funcional y estructural en los núcleos donde se sintetizan estos neurotransmisores, y en los patrones de distribución de las fibras que los liberan.

Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada, donde la célula participa de forma activa. En el desarrollo y la homeostasis de los organismos, este proceso ocurre bajo condiciones fisiológicas. La apoptosis puede ser iniciada por señales de muerte como: ligandos y la interacción con sus receptores; alteraciones en el metabolismo energético y el potencial redox; producción de ceramidas; movilización de calcio (Ca^{2+}); y activación o inactivación de proteínas de la familia Bcl-2 (Chen y col., 2003). Las señales de muerte alteran el balance entre moléculas pro y anti- apoptóticas, desencadenando este proceso (Lu y col., 2005).

El estradiol puede regular la apoptosis durante el establecimiento del dimorfismo sexual del SNC, y en procesos fisiológicos y patológicos (Nielsen y col., 2000).

Durante el desarrollo del SNC se genera un número excesivo de neuronas, pero mueren aquellas que no establecen correctamente sus conexiones (Oppenheim, 1991). En el hipotálamo, durante la diferenciación sexual, muere entre el 50 y 70% de la población neuronal generada durante las etapas tempranas de la neurogénesis (Oppenheim y col., 1991; Mooney y col., 2000). Las neuronas que mueren en este periodo presentan signos de apoptosis, y este tipo de muerte determina el tamaño y forma del SNC (Chia y col., 2000). Esta pérdida posiblemente sea necesaria para afinar la función neuronal e incrementar la especialización de las funciones cerebrales en diferentes regiones. Sin embargo, las neuronas necesitan de una serie de factores de crecimiento para sobrevivir, entre los más conocidos se encuentran: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina (NT-3) y el factor de crecimiento insulínico del tipo 1 (IGF-1) (Díaz-Horta y col., 2002), los cuales promueven la proliferación y diferenciación celular.

Los receptores de estrógenos α y β están distribuidos en el hipotálamo y otras áreas dimórficas del cerebro. En los machos, debido a los ER α durante la etapa sensible al estradiol se reduce el índice apoptótico, lo cual, permite que el APO sea de mayor tamaño comparado con las hembras. Sin embargo, en otras áreas como el núcleo PVN el índice apoptótico puede ser mayor, lo que ocasiona un PVN de menor tamaño (Murakami y Ari, 1989).

Cambios morfológicos

La apoptosis se caracteriza por una serie de alteraciones nucleares y citoplasmáticas, tales como la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA, la desorganización del citoesqueleto, la formación de cuerpos apoptóticos, la activación de caspasas, la presencia de marcadores fagocíticos en la superficie celular, etc. Otra característica fundamental de la apoptosis es la activación de endonucleasas dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} (DNAasa activada por caspasas conocida como CAD) que rompen el DNA de manera específica en el espacio internucleosomal, produciendo fragmentos de 180-200 pares de bases o sus múltiplos. Finalmente, las células se separan en pequeños pedazos esféricos de doble membrana que contienen fragmentos nucleares, referidos como cuerpos apoptóticos (Willingham; Lu y col., 2005), que son fagocitados por macrófagos o células adyacentes para evitar una respuesta inflamatoria (Quin y col., 2005).

Bioquímicamente la apoptosis se caracteriza por las alteraciones en la homeostasis de iones intracelulares, la activación de proteasas y endonucleasas que degradan proteínas y DNA respectivamente, la generación de ceramidas y la pérdida de la asimetría de la membrana, es decir cambios en la orientación de fosfolípidos. Por ejemplo, cuando las células inician el proceso apoptótico, la

fosfatidilserina es expuesta hacia la cara externa de la membrana plasmática (Blake y Gores, 1997).

Vías de señalización

En células de mamíferos, la muerte por apoptosis puede ser inducida por un mecanismo extrínseco (mediado por la unión de moléculas de muerte a sus receptores en la superficie celular) (Zacks y col., 2004) o intrínseco (mediado por señales en el interior de la célula) (Hussein y col., 2003). Ambos finalmente desestabilizan la función mitocondrial y activan a las pro-caspasas (caspasas inactivas). Una vez que las procaspasas son activadas adquieren el nombre de caspasas (por sus siglas en inglés *c*itosolic *a*spartate specific *p*roteases) y son capaces de reconocer residuos de ácido aspártico y romper diversos sustratos tales como proteínas inhibidoras de caspasas de DNA activas, DNA polimerasas, proteínas Bcl-2, lamininas y otras proteínas de unión al citoesqueleto.

Las caspasas se pueden clasificar como iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y efectoras (3, 6 y 7). Las iniciadoras son activadas por autoproteólisis en respuesta a señales de muerte, mientras que las efectoras, que inician la digestión proteolítica de la célula, son activadas por las iniciadoras, culminando con fragmentación del DNA, inhibición de síntesis y reparación del DNA, daño a la membrana nuclear, condensación de la cromatina y colapso del citoesqueleto (Lu y col., 2005).

Vía intrínseca

Los estímulos estresantes para las células, que se traducen como señales de muerte, pueden ser extracelulares (insuficiencia de nutrientes, de factores tróficos y/o de supervivencia, radiación, drogas y estrés físico) o intracelulares (estrés

oxidativo, daño del DNA y proteínas malformadas) Las señales de muerte ocasionan que proteínas de la familia Bcl-2, especialmente Bax y Bak se ensamblen en el poro en la membrana mitocondrial externa (Hussein y col., 2003) y permitan la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo c, la proteína Smac/Diablo y el factor inductor de apoptosis (AIF), desde el espacio intermembranal de la mitocondria hasta el citoplasma. Este evento puede ser antagonizado por proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x_L (Crow y col., 2004). El citocromo c activa directamente al factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1), que unido a la caspasa 9 (iniciadora) y a adenosina trifosfato (ATP), forman el “apoptosoma” y éste activa a las caspasas efectoras 3 y 7, conduciendo así a la apoptosis. Dentro del citosol las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) mantienen inactivas a las caspasas efectoras, pero cuando Smac/Diablo es liberada, separa a las IAPs de las caspasas, dejándolas nuevamente activas para culminar con la apoptosis (Hussein y col., 2003).

Vía extrínseca

En esta vía, la apoptosis inicia con la unión de ligandos de muerte a sus receptores. Entre ellos que se encuentran: FasL/Fas; factor de necrosis tumoral α y su receptor-1 (TNF- α /TNFR-1); ApoL/receptor de muerte 3 (DR3); y Apo2L/receptor de muerte 4 y 5 (DR4 Y DR5) (Lu y col, 2005). Fas es una proteína citoplásmica asociada a proteínas con dominios de muerte (FADD). La unión de FasL con su receptor, permite el ensamble de un complejo de señalización inductor de muerte (DISC) en la membrana plasmática. La proteína adaptadora denominada dominio de muerte asociado a Fas (FADO) lleva a las caspasas iniciadoras 8 y 10 hacia DISC para activarlas. La caspasa 8 activa a las pro-caspasas-3 y 7. Además, la caspasa 8 rompe el fragmento C-terminal de Bid, formando tBid (Bid trucado), que se transloca a la membrana mitocondrial externa

e induce la apertura del poro de permeabilidad, y con ello la liberación de factores pro-apoptóticos (Yan y Shi, 2005).

Reguladores de apoptosis

La muerte celular por apoptosis está regulada por un conjunto de genes, entre los que destacan las caspasas, Apaf-1, y los miembros de la familia Bcl-2/Bcl-XL/Bax. Las proteínas Bcl-XL y Bax regulan la liberación mitocondrial del citocromo c, que desencadena la apoptosis (Liu X, 1997).

La proteína anti-apoptótica Bcl-XL es un miembro de la familia Bcl-2 que se encuentra altamente expresado en el desarrollo del SNC (González-García y col., 1995). Los ratones mutantes homocigóticos (*bcl-x^{-/-}*) mueren durante la vida embrionaria (día 13.5), debido al alto índice de apoptosis en las zonas intermedia y marginal del cerebro, que contienen neuronas postmitóticas inmaduras. Los animales mutantes para Bax presentan menor índice de apoptosis en las neuronas inmaduras de las zonas intermedia y marginal. Ratones mutantes *bcl-x^{-/-}* y *bcl-2^{-/-}* presentan un fenotipo más acentuado, lo que apunta a una función anti-apoptótica conjunta entre estos dos genes (Shimizu y col., 1999).

Los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 como la proteína Bax, interactúan con los miembros antiapoptóticos para regular la liberación del citocromo c mitocondrial y por lo tanto la muerte celular. La proteína Bax, al igual que las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL, se expresa altamente en el cerebro embrionario y adulto, y es capaz de heterodimerizar con Bcl-XL.

La función de proteínas como Bax y Bcl-XL es controlada por Apaf-1 y por las caspasas 9 y 3. La activación de las caspasas conduce a la proteólisis de las proteínas que participan en la reparación celular, en la homeostasis y en el

mantenimiento del citoesqueleto. La caspasa-3 se encuentra altamente expresada en el cerebro durante el desarrollo embrionario. y su activación regula la apoptosis neuronal. Esta caspasa se ha detectado en células de la zona intermedia del cerebro embrionario y dentro de la zona ventricular, la cual posee actividad mitótica (Rudel y Bokoch, 1997). La caspasa-3 se encuentra sobre-expresada en los ratones deficientes en la proteína Bcl-XL y reducida en los animales deficientes en la proteína Bax. Lo cual sugiere que su activación en la apoptosis neuronal durante el desarrollo está asociada con las proteínas Bax y Bcl-XL. Asimismo, la activación de la caspasa-3 depende de la expresión de Apaf-1 y de la caspasa-9, ya que no se encuentra activada en los ratones deficientes de Apaf-1 (apaf-1^{-/-}) o en la caspasa-9 (caspasa-9^{-/-}) (Rudel y Bokoch 1997). Además, la deficiencia en cualquiera de estas moléculas pro-apoptóticas (apaf-1, caspasa-9 o caspasa-3), al igual que con los animales deficientes en la proteína Bax, evita la activación de la caspasa-3 y la muerte apoptótica en las neuronas inmaduras de los embriones deficientes en la proteína Bcl-XL. Las proteínas Apaf-1, caspasa-9 y caspasa-3, además de su función pro-apoptótica en las neuronas inmaduras, desempeñan un papel importante en la regulación de la muerte celular programada de las células precursoras neurales, independientemente de la función de la proteína bax (Deckwerth y col., 1996).

La muerte celular programada es un proceso necesario en la morfogénesis cerebral y en la histogénesis neuronal, durante el desarrollo neural normal de los vertebrados. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan estos procesos son aún desconocidos (Dewing y col., 2003).

CAPITULO I

Cambios en la expresión de genes, inducidos por una sola administración de tamoxifen (machos), propionato de testosterona (hembras) y/o aceite de soya, en el periodo crítico de la diferenciación sexual hipotalámica de la rata.

Alicia González-González¹, Everardo González-Padilla¹, Francisco Fierro², Ma. De Lourdes Juarez-Mosqueda³, Juan José Perez-Rivero⁴, Clara Ortega-Camarillo⁵, Marcela Vergara Onofre⁶.

¹Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán. CP. 04510. Ciudad de México.

²Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina. 19340. Del. Iztapalapa. Ciudad de México.

³Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán. CP. 04510. Ciudad de México.

⁴, ⁶Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa quietud. CP. 04960. Del. Xochimilco. Ciudad de México.

⁵Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330. Col. Doctores. CP. 06720. Del. Cuauhtémoc. Ciudad de México.

*Autor para correspondencia: mvergara@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

Para analizar los cambios y la temporalidad en la expresión de algunos genes relacionados con neuroprotección (*G6pd*, *Bcl2*, *Esr1* y *Cyp19a1*), sinaptogenesis (*Ptgs2* y *Ptger2*), y apoptosis (*Bax* y *Fas*) en ratas Wistar, se utilizaron 27 machos y 27 hembras, que fueron asignados al azar a uno de tres tratamientos para cada sexo: Testigo, vehículo del tratamiento (aceite de soya, SO) y tamoxifén (Tx) a los machos y propionato de testosterona (TP) a las hembras (n=3 en cada grupo). Los tratamientos se aplicaron por vía subcutánea una hora después del nacimiento. Se obtuvieron hipotálamos a 1, 3 y 6 horas post tratamiento y a partir de ellos el RNA total. Mediante QPCR se determinaron los niveles de expresión de mRNA de: *G6pd*, *Bcl2*, *Bax*, *Fas*, *Esr1*, *Esr2*, *Cyp19a1*, *Cox2* y *Ptger2*, utilizando β actina como gen de referencia. Los tratamientos con Tx (machos), TP (hembras) y SO, aplicados a 1 hora post-nacimiento modifican la expresión de genes hipotalámicos relacionados con: apoptosis (ambos sexos); neuroprotección (en hembras reducen la expresión de genes y en machos la incrementan) y sinaptogenesis (sólo en los machos). Los resultados resaltan la importancia de prevenir la exposición a disruptores endocrinos durante los periodos críticos del desarrollo y realizar más estudios sobre el aceite de soya, por ser un alimento de consumo generalizado.

Palabras clave: diferenciación sexual hipotalámica; genes; apoptosis; neuroprotección; propionato de testosterona; tamoxifen; aceite de soya.

INTRODUCCIÓN

La diferenciación sexual cerebral en la rata ocurre en etapas perinatales, durante el llamado “periodo crítico”, que es una fase temprana del desarrollo neural donde el Sistema Nervioso Central (SNC) es altamente sensible a las hormonas esteroides. En la rata macho, la testosterona de origen gonadal es convertida en estradiol por la enzima P450aromatasa en las neuronas del hipotálamo, induciendo la organización cerebral (etapa organizacional), mediante diversos mecanismos como: neurogénesis; neuromigración; diferenciación celular (Jacobson y col., 1985; Tobet y col., 1994); y apoptosis, que determinan el fenotipo masculino en regiones específicas principalmente del hipotálamo (Phoenix y col., 1959; Gorski and Warner, 1965) y establecen circuitos neuronales permanentes que determinan la fisiología reproductiva y el comportamiento dimórfico sexual en la vida adulta (etapa activacional) (Arnold and Breedlove, 1985). La apoptosis es uno de los mecanismos más importantes en este proceso (Chung y col., 2001).

De manera fisiológica, el cerebro de la rata macho es expuesto a altos niveles de testosterona que es transformada en estradiol, aumentando a finales de la gestación, principalmente a las dos horas después del nacimiento. Por el contrario, en la rata hembra, la circulación de estradiol es consistentemente baja debido a que las alfa-fetoproteínas circulantes, se unen de manera específica al estradiol y en el caso del cerebro, éstas lo protegen del efecto masculinizante (Anne y col., 2011). No obstante, concentraciones bajas de testosterona también pueden inducir la masculinización hipotalámica (Weis and Gunsalus, 1973; Babichev y col., 1990; Lauber y col., 1997).

La testosterona de origen testicular en el macho, o la administración de propionato de testosterona (TP) a una hembra o macho castrado durante el periodo crítico, induce la masculinización permanente (Dörner and Hinnz, 1967).

El papel de los estrógenos en la diferenciación sexual se ha identificado mediante el uso de antiestrógenos como el tamoxifen (Barraclough, 1967; Dörner and Staudt, 1968; Döhler y col., 1984 y 1985; Herrera y col., 2013), un fármaco sintético antiestrógeno utilizado en el tratamiento de cáncer de mama. El tamoxifen (Tx) puede actuar como agonista o antagonista de los estrógenos, su efecto depende de la dosis utilizada, el órgano blanco, el sexo y la especie [Gill-Sharma, 1993; Macnab y col., 1984]. En la rata macho, el Tx administrado neonatalmente impide la interacción de estradiol con su receptor en el hipotálamo, además inhibe la actividad de la enzima aromatasa. De esta manera conduce a la feminización cerebral (Döhler, 1985).

Además del TP o el Tx, existen otras sustancias que pueden alterar el efecto de los esteroides sexuales (estrógenos y/o andrógenos), los llamados disruptores endocrinos (EDCs, por sus siglas en inglés, endocrine-disrupting chemicals; Ankley and Johnson, 2004).

En un estudio con microarreglos de DNA realizado por nuestro grupo (Herrera y col., 2013), se encontró que los tratamientos con Tx en ratas macho y TP en hembras, aplicados desde la primera hora posnatal, modifica la expresión de genes hipotalámicos. Además, en hembras se encontró mayor expresión de genes relacionados a procesos como apoptosis, diferenciación celular y ciclo celular. Los machos con Tx expresaron un patrón de genes similar al de las hembras testigo, mientras que en las hembras el TP no modifico la expresión. Los estudios para determinar los mecanismos celulares que determinan las bases neurológicas de la fisiología y el comportamiento dimórfico sexual, sugieren que de manera fisiológica el estradiol regula la síntesis de prostaglandinas, la liberación de glutamato, los cambios postsinápticos en los receptores de glutamato y cambios en las moléculas de adhesión celular. Por otro lado, la muerte celular está regulada por la modulación hormonal entre factores de supervivencia y muerte, tales como TNF-alfa y Bcl-2/Bax.

Para avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos que conducen a la diferenciación sexual del hipotálamo, el presente trabajo se desarrolló con la finalidad de conocer la temporalidad, en las siete primeras horas de vida, en la expresión de algunos genes relacionados con neuroprotección (*G6pd*, *Bcl2*, *Esr1* y *Cyp19a1*), sinaptogénesis (*Ptgs2* y *Ptger2*), y apoptosis (*Bax*, *Fas* y *Esr2*).

MATERIALES Y METODOS

Animales

Los animales se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, y se alojaron en la misma, bajo un ambiente controlado (21°C) con ciclos invertidos de 12 horas de luz-oscuridad (luces apagadas a las 4:00 AM) así como alimento (Rodent Diet 5001, LabDiet) y agua *ad libitum*.

Veinte ratas Wistar (dieciséis hembras y cuatro machos) se utilizaron como reproductores. Los machos fueron mayores de 90 días de edad con un peso superior de 400g. Su capacidad reproductiva fue evaluada mediante el comportamiento copulatorio, la presencia de tapón seminal en las hembras después de la cópula y la confirmación de la gestación.

Las ratas hembra tenían 60 días de edad con un peso mayor a 200 g. Se monitoreo diariamente su ciclo estral mediante citología vaginal por un mínimo de tres ciclos para confirmar la normalidad endócrino-reproductiva. Las ratas en estro se colocaron en una jaula con un macho para permitir una primera gestación y corroborar la capacidad reproductiva. Después de la primera camada, se llevó a cabo una segunda selección de acuerdo con el comportamiento materno observado. Finalmente, solo se seleccionaron ratas con ciclo estral, gestación y camadas normales, así como un comportamiento materno adecuado.

Dos semanas después del primer parto, se realizó de nuevo el seguimiento del ciclo estral. Una hembra y un macho se colocaron una vez más en una jaula durante tres horas. El inicio de la gestación se verificó por la presencia de espermatozoides mediante citología vaginal y por la formación de tapón seminal. Las ratas gestantes fueron alojadas en jaulas bajo las condiciones antes descritas. Como el objetivo fue analizar el efecto de la administración temprana (1 hora después del nacimiento) de Tx (machos), TP (hembras) y su vehículo que fue aceite de soya (SO), sobre los niveles de mRNA de genes hipotalámicos en tiempos muy cercanos al nacimiento. Fue necesario un estricto testigo del tiempo de apareamiento y vigilancia constante de las madres, principalmente al final de la gestación para identificar la hora exacta del nacimiento.

El momento del nacimiento de cada animal se consideró como hora cero. Las ratas recién nacidas se asignaron al azar de acuerdo al sexo en uno de tres tratamientos formar seis grupos: tres de machos y tres de hembras (n=3 ratas cada uno). Los tratamientos se aplicaron a cada animal a una hora de su nacimiento. Un grupo de hembras y otro de machos fue tratado por vía s.c. únicamente con 20µL de SO. Otros dos grupos (machos - hembras) se trataron por la misma vía como sigue: los machos fueron inyectados con 200µg de Tx (Herrera y col., 2013) utilizando 20µL de SO como vehículo; las hembras fueron inyectadas con 30µg de TP (Rodríguez y col., 2001) diluida en 20µL SO. Finalmente, para conocer el patrón fisiológico de expresión de genes, dos grupos testigo (machos y hembras) no recibieron ningún tratamiento. El Tx se administró con el propósito de inducir feminización cerebral, y el TP para inducir masculinización cerebral, mientras que el aceite de soya sólo, fue para evitar confundir el efecto de los tratamientos con el de su vehículo. Las ratas tratadas se devolvieron con sus madres hasta el momento del sacrificio.

Colección y procesamiento de los hipotálamos

Las ratas se sacrificaron por decapitación a 1, 3 y 6 horas post-tratamiento. Los hipotálamos se extrajeron y disecaron inmediatamente bajo el método modificado de Vangala (Vangala y col., 1973), considerando los siguientes límites: anterior, el quiasma óptico; posterior, los cuerpos mamilares y lateral los surcos hipotalámicos. Los hipotálamos se almacenaron a -70°C hasta el aislamiento del RNA.

Aislamiento del RNA

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo TriPure (Roche) con en el método de Chomczynski y Sacchi (1987), siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro Epoch de la marca BioTek. Se colocaron 2µL de cada muestra de RNA sobre una placa de micro volúmenes Take3 y se realizaron lecturas de absorbancia a 260nm y 280nm. Las lecturas se analizaron con el software Gen5 para obtener el resultado de la concentración en ng/µL, así como la relación de absorbancia a 260/280nm para conocer su calidad. La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Retro-Transcripción

Para la Retro-Transcripción, de cada muestra se utilizaron 2 µg de RNA total como templado en un volumen final de 20µL, utilizando el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega (Madison, WI, USA) siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor. Posteriormente los tubos de reacción se colocaron en un termociclador MAXIGENE-AXIGEN bajo las siguientes condiciones: 25°C por 5 min; 4°C por 10 min; 42°C por 60 min; 70°C por 15 min y finalmente, un enfriamiento a 4°C.

Real Time- PCR (Q-PCR)

Se utilizó DNA complementario (cDNA) para amplificar los genes hipotalámicos con fragmentos entre 188 y and 282 bp. La Q-PCR se realizó con un volumen final de mezcla de reacción de 20µL utilizando el kit Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche) en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche). Las secuencias de los primers utilizados en este experimento fueron previamente reportados por otros investigadores y se muestran en el Cuadro1. Se utilizaron a una concentración de 0.5 µM. El primer de *Actb* fue utilizado como control interno. Cada ensayo se realizó por duplicado bajo las siguientes condiciones: pre-incubación a 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 10s en la fase de desnaturalización, alineamiento durante 7s a 60°C para *G6pd*, *Bax*, *Esr1*, *Esr2*, *Cyp19a1*, *Ptgs2*, *Ptger2* y *Fas*, y a 64°C para *Bcl2*, extensión a 72°C por 10s. Las corridas de Q-PCR se validaron mediante el análisis de curvas de la temperatura de fusión (curva melting) bajo las condiciones siguientes: desnaturalización a 95°C por 0s, alineamiento a 65°C durante 15s y extensión a 95 °C por 0seg. Los controles negativos se corrieron en paralelo sin cDNA. El peso molecular de los amplicones se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. La cuantificación de los genes expresados como niveles relativos de mRNA comparados con los grupos controles, se calcularon después de la normalización de *Actb* siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Kenneth y col., 2001).

Cuadro 1.- Secuencia de primers utilizados de *Rattus norvegicus*

Gene (Símbolo oficial)	Secuencias	Gene ID	Referencia
Actin beta (<i>Actb</i>)	F5'-CAAAAGCCACCCCACTCCTAAGA-3' R5'-GCCCTGGCTGCCTCAACACCTC-3'	NM_001135008.1	Torres Ramírez y col., 2013.
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (<i>G6pd</i>)	F5'- CTGGAACCGCATCATAGTGGAG-3' R5'-CCTGATGATCCCAAATTCATAAATAG-3'	NM_017006.2	
Estrogen receptor 1 (<i>Esr1</i>)	F5'- CTTCAGTGCCCAACAGCCT-3' R5'-GACAGTCTCTCTCGGCCAT-3'	AB_560752.1	Singh y col., 2009.
Estrogen receptor 2 (<i>Esr2</i>)	F5'- GCCAACCTCCTGATGCTTCTTT-3' R5'-TTGTACCCTCGAAGCGTGTGA-3'	NM_012754.1	
Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1 (<i>Cyp19a1</i>)	F5'- TGTGTTGACCCTCATGAGACA-3' R5'-CTTGACGGATCGTTCATACTTC-3'	NM_017085.2	Yilmaz y col., 2009.
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (<i>Ptgs2</i>)	F5'- ACACCTATCACTGGCATCC-3' R5'-GAAGGGACACCCTTTCACAT-3'	NM_017232.3	Myung-Soon Yang y col., 2005.
Prostaglandine receptor 2, subtype EP2 (<i>Ptger2</i>)	F5'- CCTGCCGCTGCTCAACTACG-3' R5'-GTCTCCTCTGCCATCGAAGTCCTC-3'	NM_031088.1	Vennemann y col., 2012.
TNF receptor superfamily, member 6 (<i>Fas</i>)	F5'- CCCAGTGTGACCAAGCACGCC-3' R5'-GCGCTGGAGCACAAAGGAACGC-3'	X_62889.1	Gosmain y col., 2005.
B-cell CLL/lymphoma 2 (<i>Bcl2</i>)	F5'- CTGGTGGACAACATCGCTCTG-3' R5'-GGTCTGCTGACCTCACTTGTG-3'	NM_016993.1	Imaizumi y col., 1999.
Bcl2-associated X protein (<i>Bax</i>)	F5'- TCCAGGATCGAGCAGA-3' R5'-AAGTAGAAGAGGGCAACC-3'	NM_017059.2	

F: Forward y R: Reverse. Los primers utilizados fueron previamente reportados en la literatura.

Análisis Estadístico

Los datos cuantitativos de expresión de RNA se presentan como valores promedio \pm Error estándar (SE) de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado. La comparación multi-grupos se hizo mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las diferencias de medias entre grupos se estimaron utilizando una prueba de Tukey. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el Software PAST (Paleontological Statistics)- Paquete para Educación y Análisis de Datos (Huang y col., 2013). Las diferencias con valor de *p*

<0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas y se marcaron con literales a, b, c y d.

RESULTADOS

En hembras

En la Figura 1 se muestran los niveles de RNAm de genes asociados con neuroprotección. En los niveles del RNAm de la *G6pd*, los grupos Testigo y los tratados mantuvieron el mismo patrón de expresión sin cambios significativos durante el período estudiado. Respecto al gen de *Bcl2*, en los animales testigo se observó un comportamiento similar al del gen *G6pd* aumentando en valores a las tres horas y volviendo a su nivel de una hora post-tratamiento en la hora 6, en tanto que los SO+TP tuvieron valores en descenso a partir de la tercera hora y los SO mantuvieron en el lapso de estudio sus valores basales de la hora 1, siempre inferiores al testigo.

En cuanto a los niveles del RNAm del gen *Esr1*, en los animales tratados con SO hubo un aumento significativo en la hora 1 post-tratamiento y de allí disminuyó y se mantuvo en los valores más bajos hasta la hora 6; los animales testigo mantuvieron niveles intermedios hasta la hora 3, con un descenso a la hora 6 donde se igualó con los de los otros tratamientos. Los animales tratados con SO y SO+TP solo mostraron valores menores a los testigos en la hora 3; a la hora 6, desaparecieron las diferencias significativas entre tratamientos. Respecto a *Cyp19a1*, sólo el grupo tratado con SO incrementó de manera significativa a dos unidades en la hora 1 post-tratamiento. Durante el resto de muestreos, los valores fueron inferiores a uno en todos los grupos, sin diferencia entre ellos.

En general, para este grupo de genes, la tendencia fue a que los tratamientos tendieran a reducir su expresión con relación a lo que ocurrió con los animales testigo.

En la Figura 2 se muestran los niveles de RNAm de genes asociados con sinaptogénesis. Las variaciones en la expresión de *Ptgs2* no fueron significativas ($P=0.18$).

Respecto al RNAm del gen *Ptger2*, los tratamientos no modificaron la expresión de este gen. Los valores en los tres grupos y en los tres tiempos evaluados permanecieron sin cambios significativos.

En la Figura 3 se muestran los niveles de RNAm de genes asociados con apoptosis. Respecto al gen *Bax*, los grupos tratados presentaron un incremento significativo en desde la primera hora post-tratamiento. El grupo tratado con SO presentó una tendencia a disminuir mientras que el tratado con SO+TP y los grupos Testigo expresaron valores más altos a la hora 3 y después un decremento a la hora 6. Sin embargo, a la hora 6 los grupos tratados presentaron una caída significativa, teniendo niveles significativamente inferiores que el grupo control.

No hubo cambios en los niveles del RNAm de *Fas* en el grupo testigo durante los tiempos estudiados. Los grupos tratados mostraron la misma tendencia y un incremento significativo en la hora 3 manteniéndose hasta la hora 6 post-tratamiento.

Respecto a los niveles del RNAm de *Esr2*, sólo el grupo tratado con SO presentó un incremento mayor a la hora 1 post-tratamiento. En los demás grupos y tiempos las variaciones no fueron significativas.

En machos

Para el gen *G6pd*, los niveles del RNAm fueron mayores en los hipotálamos de los tratados con SO+Tx (dos a tres veces más que el testigo) a 1 y 3 horas post

tratamiento, con una tendencia descendiente que se empató con lo observado en los otros dos grupos en la hora 6.

En cuanto al RNAm del *Bcl2*, en el grupo testigo solo se registró un incremento significativo a la hora 6 post-tratamiento. Los niveles del RNAm en el grupo tratado con SO a la hora 1 post-tratamiento fueron iguales que el grupo testigo. En este tiempo, sólo el grupo tratado con SO+Tx registró valores superiores de manera significativa. A las horas 3 y 6 post-tratamiento no hay diferencia significativa entre los grupos tratados y los niveles decaen de manera importante. En los niveles del RNAm del gen *Esr1* el grupo testigo mostro un incremento significativo a las 6 horas post-tratamiento. El grupo tratado con SO no presento cambios en los tres tiempos evaluados. Mientras que en el grupo tratado con SO+Tx se encontró que desde la primera hora post-tratamiento incrementa 2.5 veces más los niveles de este RNAm. Los niveles se reducen de manera significativa a la hora 3 post-tratamiento y se mantienen sin cambios hasta la hora 6.

En lo que respecta a *Cyp19a1*, los niveles del RNAm del grupo testigo y del tratado con SO permanecen sin cambios significativos en los tres tiempos evaluados. Sólo el grupo tratado con SO+Tx incrementó de manera significativa de 1 a 3 unidades en la hora 1 post-tratamiento. Estos niveles incrementaron hasta 7.5 unidades a la hora 3, pero disminuyeron a la hora 6 hasta valores similares a los de 1 hora post- tratamiento.

Respecto al gen *Ptgs2*, en los grupos Testigo y SO+Tx los niveles se incrementaron significativamente sólo a la hora 6 post-tratamiento. El grupo SO no presento cambios en los tiempos estudiados.

En cuanto al gen *Ptger2*, los grupos SO y SO+Tx en la primera hora post-tratamiento incrementaron al doble los niveles del RNAm comparado con el grupo

testigo. En este último grupo los niveles se mantuvieron sin cambios importantes en las horas 3 y 6 posteriores al tratamiento. Entre los grupos tratados hubo diferencias significativas a la hora 3 post-tratamiento: en el grupo tratado con SO los niveles se mantuvieron en un promedio de 5 unidades hasta la hora 6, mientras que en el grupo tratado con SO+Tx a la hora 3 los niveles fueron similares al grupo testigo. A la hora 6 ya no hubo diferencias entre los grupos tratados con SO y SO+Tx.

Respecto a los niveles del RNAm de *Bax*, desde la hora 1 el grupo tratado con SO+Tx presentó 4 unidades más que el grupo testigo y el grupo SO. Este último grupo mostró una tendencia a incrementar de manera significativa a la hora 3 y más aun a la hora 6. Por el contrario, los niveles del grupo SO+Tx disminuyeron a la hora 3, pero incrementaron nuevamente a la hora 6. En el grupo testigo, a la hora 6 los niveles incrementaron al doble de manera significativa. Sin embargo, los valores más altos fueron de los grupos tratados.

Desde la hora 1 post-tratamiento, los niveles del RNAm de *Fas* incrementaron alrededor de 50 veces en el grupo SO+Tx. Estos niveles decaen drásticamente a la hora 3, no habiendo diferencias con el grupo SO. Sin embargo, en el grupo SO+Tx estos valores nuevamente incrementan significativamente a la hora 6 post-tratamiento. El grupo SO presentó valores intermedios a la hora 3 y 6, mientras que en el grupo testigo los niveles permanecieron constantes en los tiempos evaluados.

Respecto al gen *Esr2*, desde la primera hora post-tratamiento el grupo SO presentó significativamente niveles más altos, los cuales incrementaron a la hora 3 y disminuyeron a la hora 6. Los niveles del grupo testigo mostraron una tendencia a incrementar significativamente respecto al tiempo. En el grupo tratado con SO+Tx los niveles permanecieron constantes desde la primera hora post tratamiento.

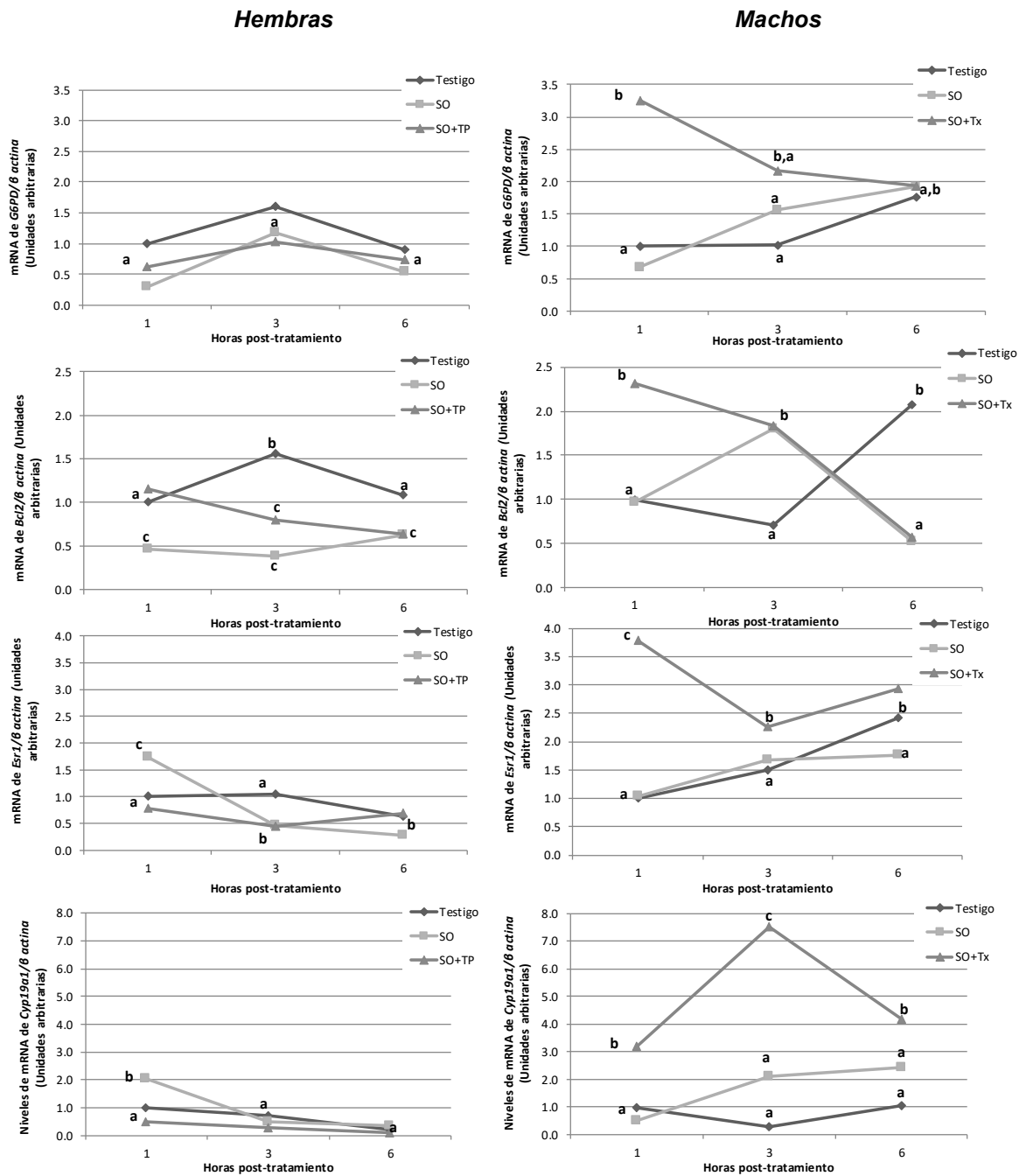


Figura 1.- Niveles de RNAm de genes relacionados con neuroprotección en hipotálamo de ratas tratadas a 1 hora post-nacimiento con: aceite de soja (SO) y/o propionato de testosterona (TP; en hembras) y tamoxifén (Tx; en machos), sacrificadas a 1, 3 y 6 horas post-tratamiento. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

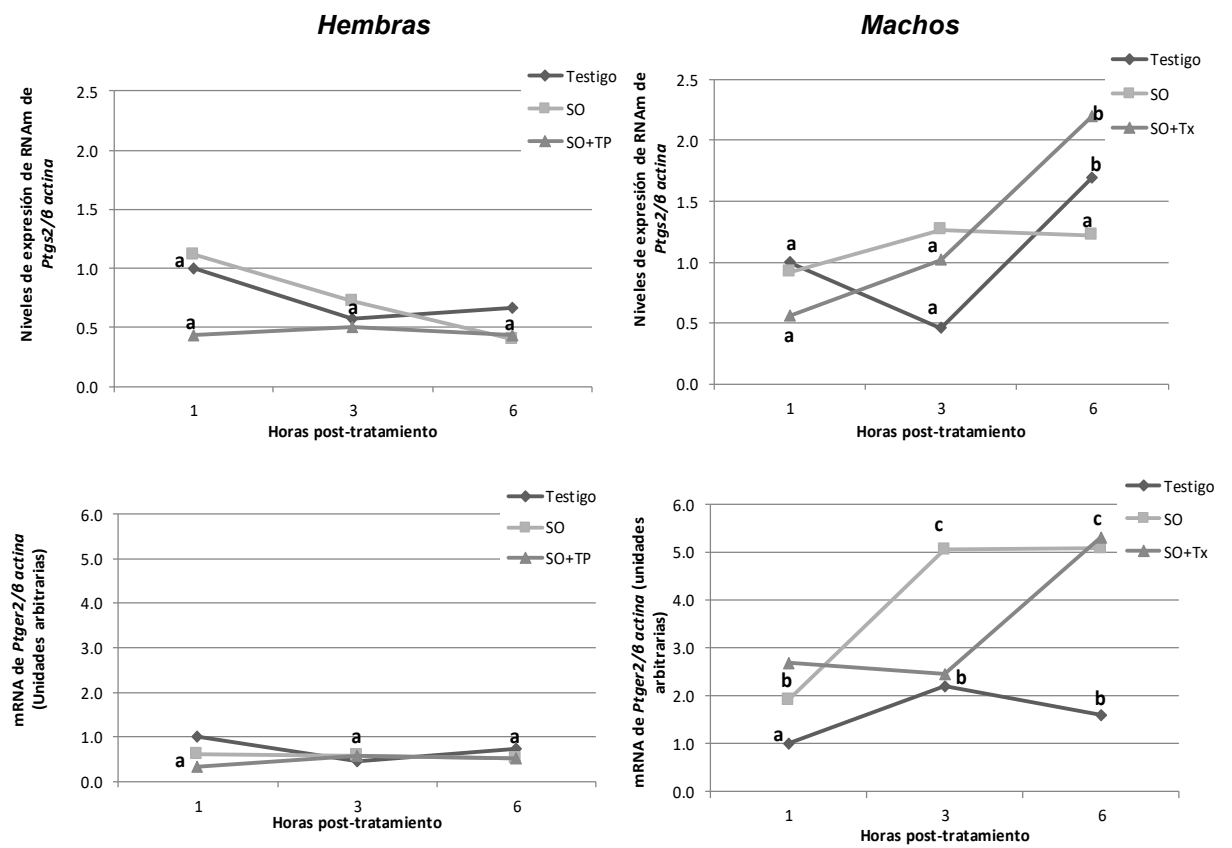


Figura 2.- Niveles de RNAm de genes relacionados con sinaptogénesis en hipotálamo de ratas tratadas a 1 hora post-nacimiento con: aceite de soya (SO) y/o propionato de testosterona (TP; en hembras) y tamoxifén (Tx; en machos), sacrificadas a 1, 3 y 6 horas post-tratamiento. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

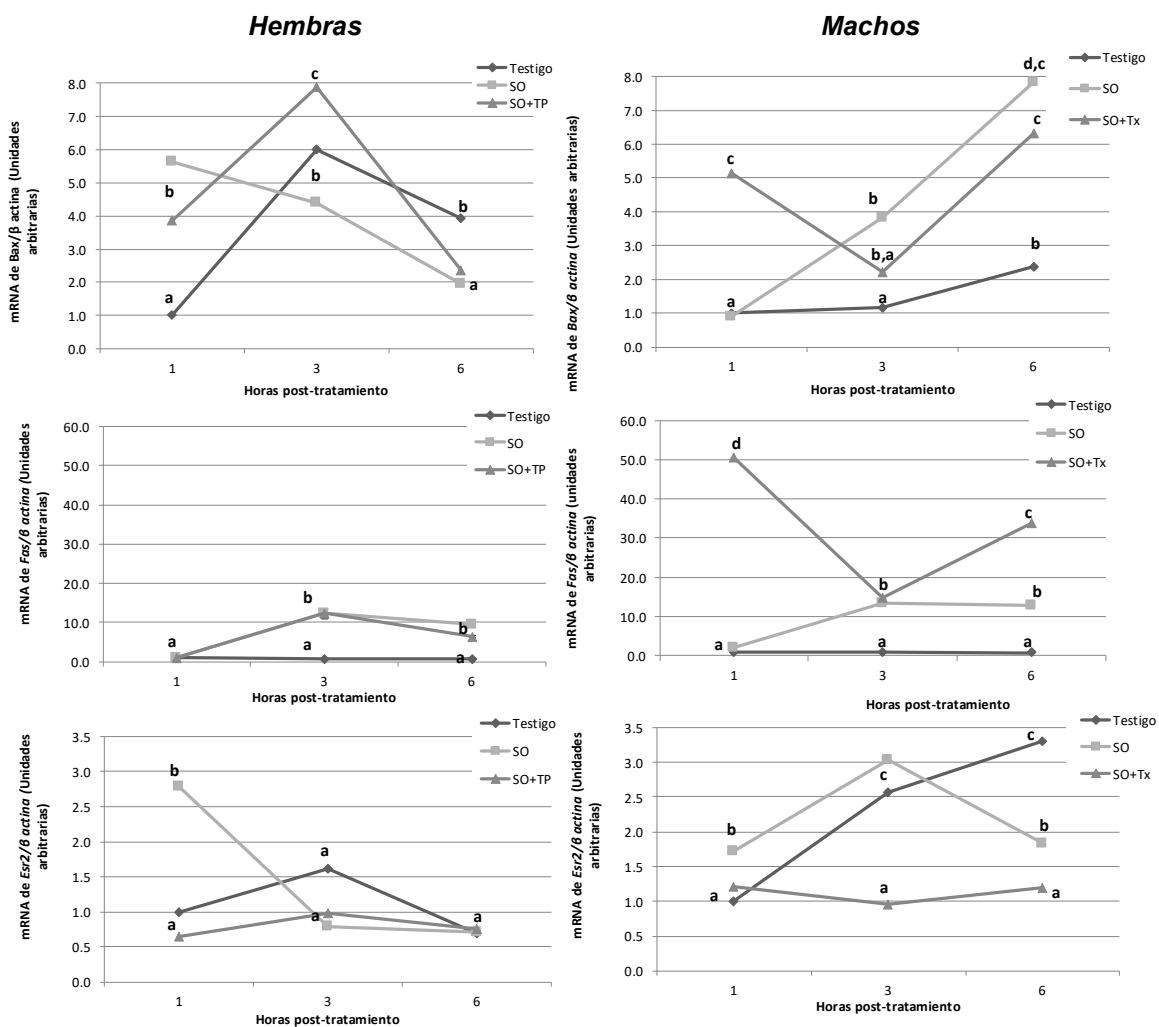


Figura 3.- Niveles de RNAm de genes relacionados con apoptosis, en hipotálamo de ratas tratadas a 1 hora post-nacimiento con: aceite de soja (SO) y/o propionato de testosterona (TP; en hembras) y tamoxifén (Tx; en machos), sacrificadas a 1, 3 y 6 horas post-tratamiento. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Comparación entre sexos en grupos Testigo

En la Figura 4 se observa la comparación de los genes asociados a neuroprotección entre los grupos Testigo. Los machos y las hembras presentan patrones de expresión similares en los genes *G6pd* y *Bcl2*; los valores son estadísticamente iguales en la hora 1, luego aumentan en las hembras en la hora 3 y regresan a valores basales. En los machos hay un aumento consistente en la

hora 6, cuando son mayores que en las hembras. Respecto a los niveles del RNAm de *Esr1* en los machos se observa la tendencia similar a lo anterior, con aumentos en la hora 6 con relación a las hembras que mostraron niveles estables o decrecientes a través del período evaluado. En cuanto a *Cyp19a1*, en ambos sexos los valores observados se mostraron estables o con tendencia a la baja con relación a la hora 1.

En este grupo de genes se observó que a la hora 3 post-tratamiento sólo los niveles de RNAm de *G6pd*, *Bcl2* y *Cyp19a1* son mayores en las hembras. Pero a la hora 6 post-tratamiento, todos los genes de este grupo son más altos de manera significativa en los machos.

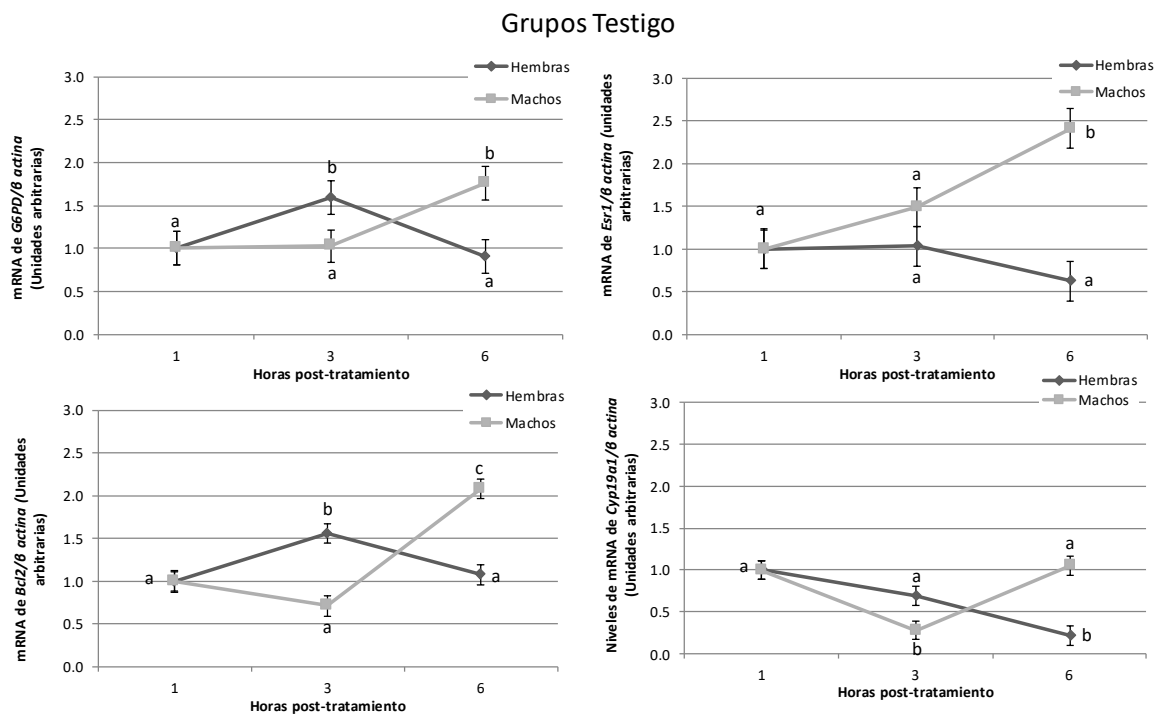


Figura 4.- Niveles de RNAm de genes asociados con neuroprotección en hipotálamo de ratas. Comparación entre sexos respecto al tiempo en los grupos Testigo. Se presenta el promedio \pm SE. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la expresión de genes.

En la Figura 5 se presentan los niveles de RNAm de genes asociados a sinaptogénesis. En hembras los niveles de *Ptgs2* y *Ptger2* permanecieron sin cambios significativos. En el caso de *Ptgs2* los machos expresaron un decremento a la hora 3, mientras que en el caso de *Ptger2* se observó un incremento a partir de la hora 3 que se mantuvo con valores del doble o más de los de las hembras hasta la hora 6., lo que concuerda con la tendencia mostrada para los genes asociados con neuroprotección.

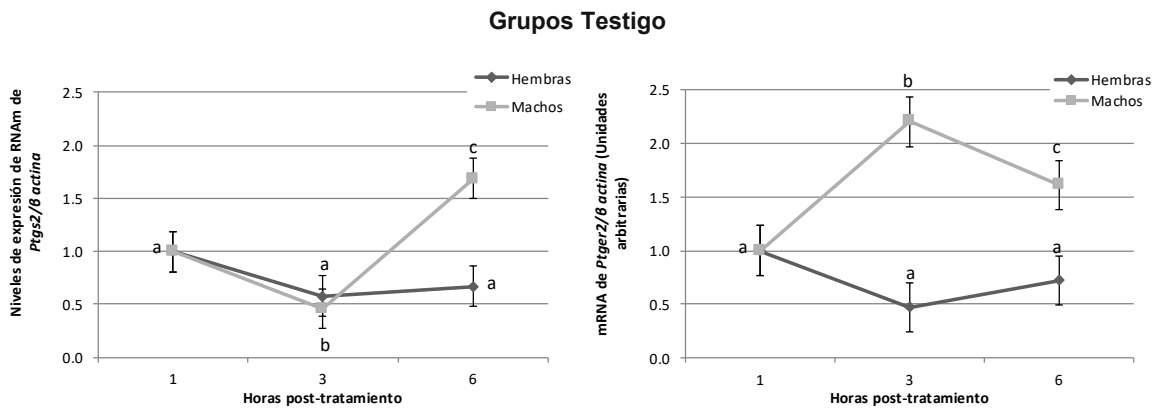


Figura 5.- Niveles de RNAm de genes asociados con sinaptogénesis en hipotálamo de ratas. Comparación entre sexos respecto al tiempo en los grupos Testigo. Se presenta el promedio \pm SE. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la expresión de genes.

Grupos Testigo

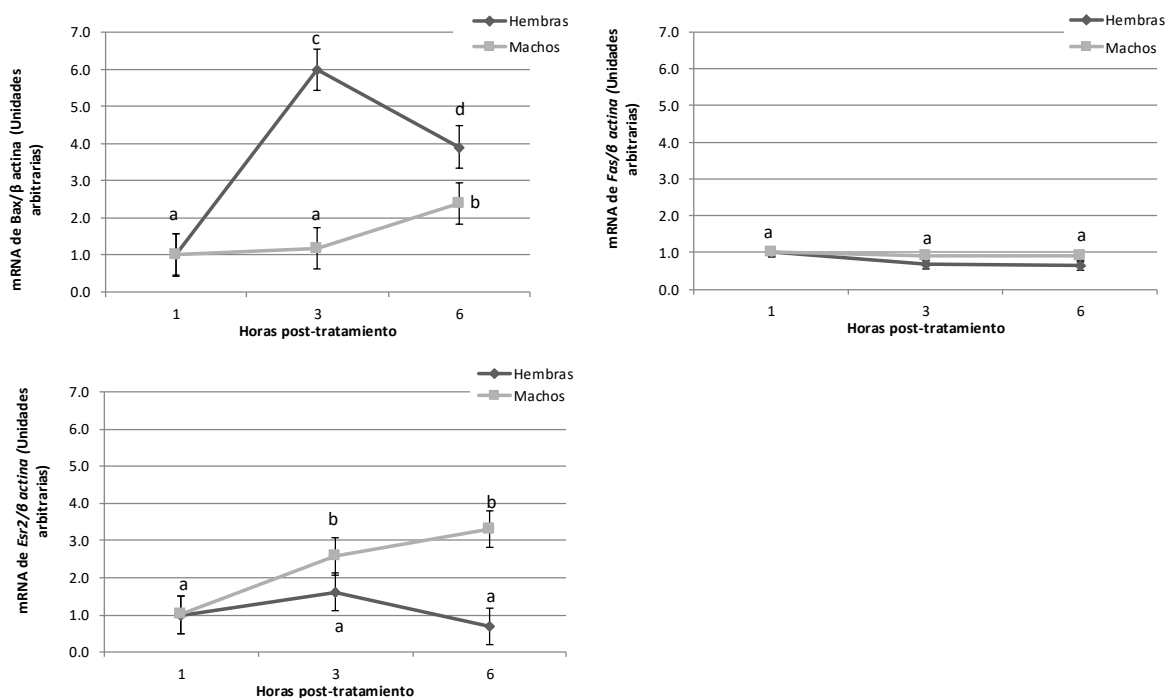


Figura 6.- Niveles de RNAm de genes asociados con apoptosis en hipotálamo de ratas. Comparación entre sexos respecto al tiempo en los grupos Testigo. Se presenta el promedio \pm SE. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la expresión de genes.

En la Figura 6 se muestran los niveles de expresión de genes asociados con apoptosis. En hembras hubo expresión de *Bax*, de 3 a 6 veces mayor a la hora 3 y 6 que en machos donde el incremento fue menos únicamente en la hora 6. En el caso de *Fas*, los niveles permanecieron basales en ambos sexos durante los tiempos estudiados y en *Esr2*, en hembras los niveles permanecieron basales, en tanto que en los machos se encontró un incremento significativo desde la hora 3 post-tratamiento.

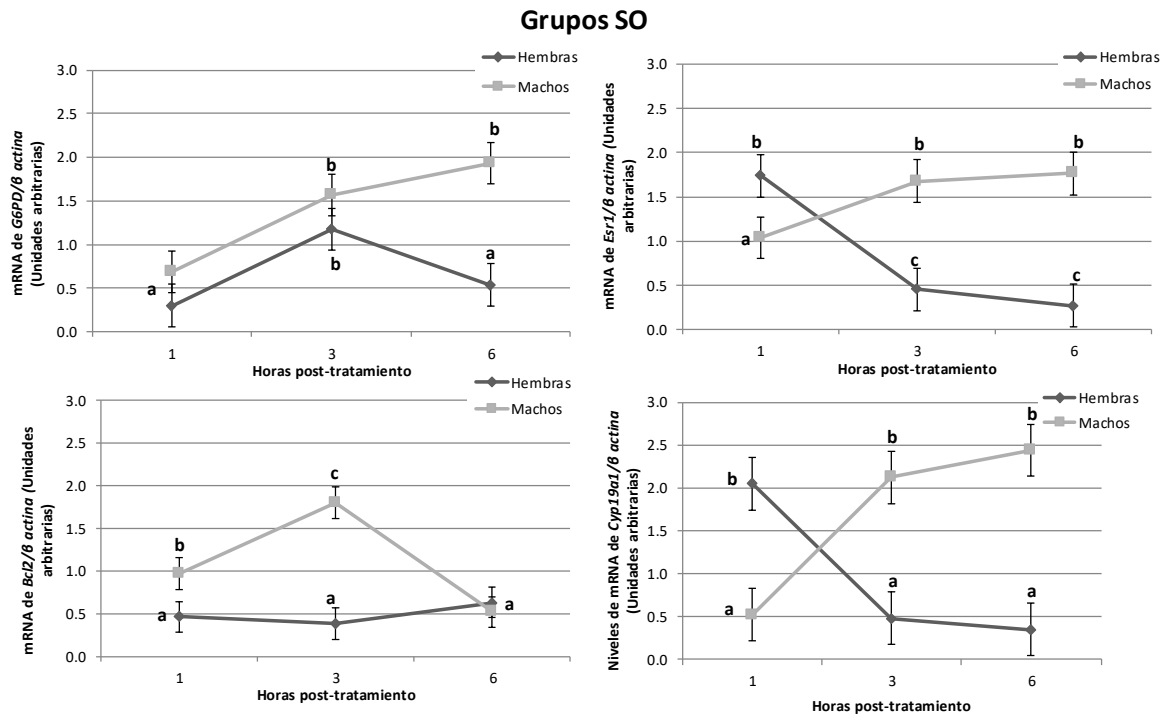


Figura 7.- Niveles de RNAm de genes asociados con neuroprotección en hipotálamo de ratas. Comparación entre sexos respecto al tiempo en los grupos tratados con aceite de soja (SO). Se presenta el promedio \pm SE. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la expresión de genes.

Comparación entre sexos en grupos SO

En la Figura 7 se presenta la comparación entre grupos SO respecto a los genes asociados a neuroprotección. En machos y hembras a la hora 3 hubo un incremento significativo en los niveles de *G6PD*, que se mantuvo alto en los machos y regresó a los niveles basales en las hembras. Respecto al gen *Bcl2* en hembras los niveles permanecieron sin modificaciones todo el tiempo, con valores inferiores que los machos, mismos que mostraron aumentos a las horas 1 y 3. *Esr1* y *Cyp19a1* presentaron un patrón de expresión similar; En la primera hora las hembras presentaron niveles significativamente más altos, que fueron decreciendo en las horas 3 y 6. en las que aumentaron los valores en los machos. En general la expresión de los genes asociados con neuroprotección fue menor

en las hembras tratadas con SO que en los machos, salvo los valores en la hora 1 para *Esr1* y *Cyp19a1*.

La Figura 8 se presenta los resultados de la comparación entre sexos en los grupos SO respecto a los genes asociados con sinaptogénesis. En las hembras, el gen *Ptgs2* presenta una tendencia a disminuir en el tiempo, mientras en los machos se mantiene sin cambios. Respecto a *Ptger2*, los valores en los machos siempre se mantienen por arriba, a más de 2 veces de los de las hembras, que no mostraron cambios; en las horas 3 y 6 la diferencia es mayor a 5 veces.

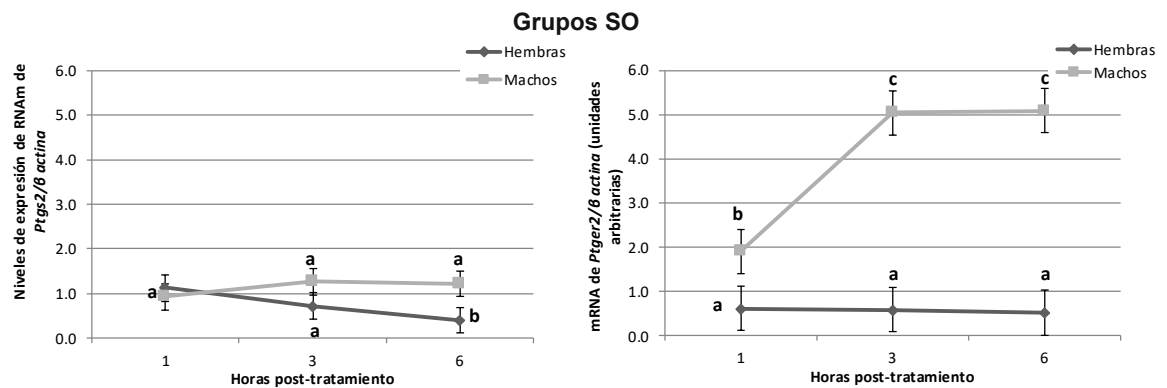


Figura 8.- Niveles de RNAm de genes asociados con sinaptogénesis en hipotálamo de ratas. Comparación entre sexos respecto al tiempo en los grupos tratados con aceite de soya (SO). Se presenta el promedio \pm SE. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la expresión de genes.

En la Figura 9 se presentan gráficamente los resultados de la comparación entre sexos en los grupos SO, de la expresión de los genes asociados con apoptosis. Para el gen *Bax* se observa que desde la hora 1, con las hembras en tendencia negativa y los machos aumentando hasta 8 veces en la hora 6. En cuanto al gen *Fas*, hembras y machos presentaron tendencias paralelas cercanas, con aumentos en las horas 3 y 6. variaron en un margen estrecho y fueron 3 veces mayores en los machos en la hora 3. En general, el tratamiento con SO tuvo mayor efecto represor en la expresión de los genes asociados con neuroprotección y sinaptogénesis en las hembras y activó la expresión de los genes asociados con apoptosis en ambos sexos.

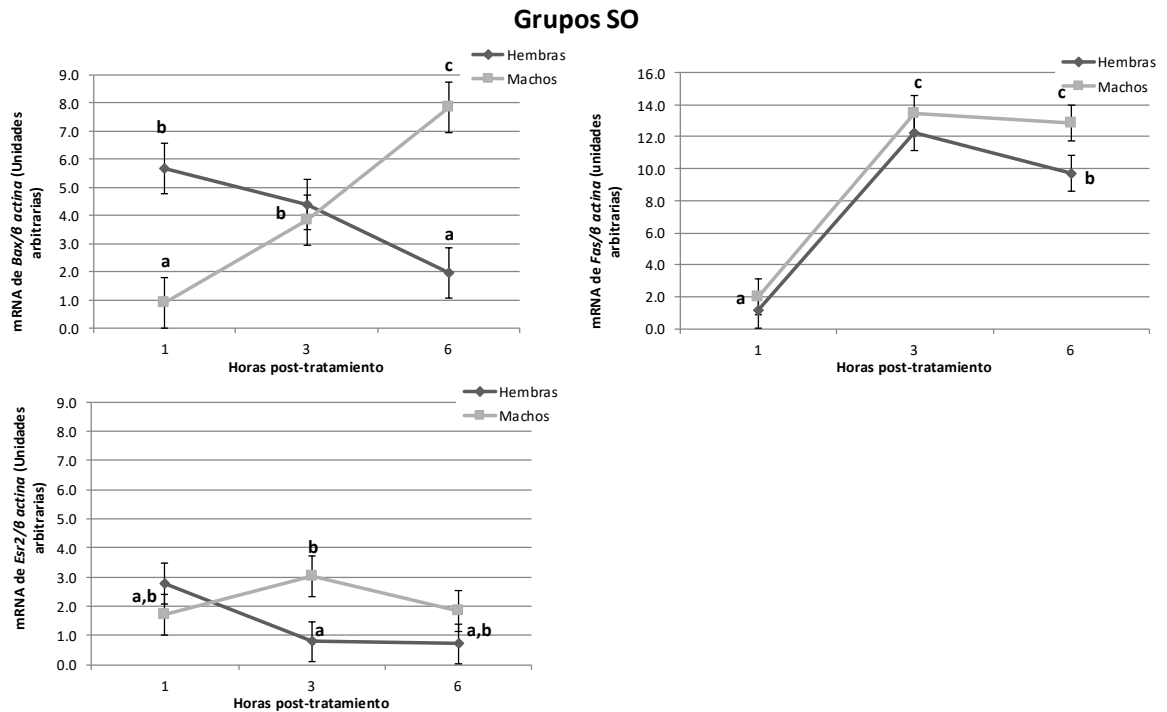


Figura 9.- Niveles de RNAm de genes asociados con apoptosis en hipotálamo de ratas. Comparación entre sexos respecto al tiempo en los grupos tratados con aceite de soya (SO). Se presenta el promedio \pm SE. Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la expresión de genes.

DISCUSIÓN

La masculinización del área preóptica en la rata se debe al estradiol, a través de diferentes mecanismos que van desde la mediada por los cambios en la sinaptogénesis, supervivencia celular, la muerte celular y neuroprotección. Como se ha visto, el área preóptica (POA) presenta la expresión más relevante para la masculinización, desde parámetros conductuales, liberación pulsátil de la secreción de gonadotrofinas. Los altos niveles de expresión en el receptor de estrógeno (Ers1) (figura 1) se relaciona aún más con la idea dominante de que en el cerebro la masculinización es inducida por el estradiol (McCarthy MM., 2010) y los genes que están relacionados con la neuroprotección, como resulta con *Cyp19a1*, *Bcl2* y *G6pd* en los machos.

En el caso de las hembras, los mecanismos neuroprotectores no se encuentran tan elevados al inicio de la hora postratamiento, en el periodo más sensible, dando expresiones relativamente bajas en los genes relacionados con neuroprotección, si consideramos que del núcleo ventromedial, podrían morir a consecuencia de una disminución de estradiol o bien modular la sobrevivencia debido a la falta de estradiol (McCarthy MM., 2010).

En el caso del núcleo preóptico medial en machos que presentan casi el doble de espinas dendríticas que el de las hembras, en donde se involucra distintos mecanismos, siendo de los más importantes donde la participación del estradiol previene la apoptosis, ocasionado que los machos tengan tres veces más neuronas que hembras (Davis y col., 1995). La muerte celular en las hembras es a través de la vía clásica de la relación de BAX/caspasa-3, ocasionando la muerte celular apoptótica y en caso contrario la presencia de mayor expresión en los niveles de Bcl2 en machos los protegen, sin embargo, el mecanismo de cómo BAX y Bcl2 son regulados aun no es claro (McCarthy MM 2010).

Se sabe que la apoptosis (vía intrínseca o mitocondrial) se puede iniciar por eventos que se localizan en el interior celular y que pueden provocar en la mitocondria la liberación del citocromo c y de otras moléculas pro-apoptóticas del espacio intermembranal, a pesar de eso, la liberación del citocromo c es ocasionada por la formación del "poro de transición de permeabilidad mitocondrial" (MPTP), que se forma por la interacción entre: un transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en membrana mitocondrial interna, un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana mitocondrial externa (MME) y con la participación de las moléculas denominadas Bax y Bak, aunque también se sabe que participan en la formación de MPTP y para la apoptosis, que se puede ver inducida por los receptores de la muerte con su ligando a nivel transmembranales que serían los receptores de Fas (CD95), TNFR y los receptores de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF), que

tienen un dominio de muerte (DD) en la cola citoplásmica. La señalización de dichos receptores puede ser simplificada como la unión del receptor con su respectivo ligando que estimula el reclutamiento de una molécula adaptadora FADD (dominio de la muerte asociado a Fas) o TRADD (dominio de la muerte asociado a TNFR). Dichos adaptadores poseen un dominio DED y uno DD, lo cual le permite unirse al receptor de la muerte por un lado, y por otro a una caspasa iniciadora que contiene un homólogo DED, para el proceso actuar proteínas anti-apoptóticas que son denominadas FLIP (proteínas inhibidoras de FLICE:enzima convertidora de interleucina-1 β tipo FADD), siendo su principal función la inhibición de la activación de la procaspasa-8 al competir por FADD, ya que estas proteínas también contienen un dominio DED, lo que habla de la temporalidad de los eventos, y de las interacciones que pueden estar asociadas con los factores de estrés, por lo que el comportamiento diferente entre machos y hembras (Figura 3) nos habla de la variabilidad de respuesta de los testigos, vehiculo y tratados.

Se ha visto que en condiciones fisiológicas normales, ciertas proteínas de interés han sido implicadas las involucradas en la conversión del araquidonato a la prostaglandina H₂ (PGH₂), que resulta ser un paso involucrado en la síntesis de prostanoïdes, que se ha visto expresado de manera constitutiva en tejidos en condiciones fisiológicas, como son: el riñón, endotelio y el cerebro pero en condiciones adversas en patologías como en el cáncer el PTGS2 es un paso clave en la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), que juega un papel importante en la modulación de la motilidad, la proliferación y la resistencia a la apoptosis. Si bien es cierto que las PTGS2 son responsables de la producción de prostaglandinas inflamatorias, la regulación positiva de está asociada también con un incremento en la adhesión celular, cambios fenotípicos, resistencia a la apoptosis y angiogénesis tumoral (Sostres y col., 2014).

Dentro de los mecanismo de neuroprotección, que se establece como consecuencia del estrés oxidativo mediado a través de especies oxigenadas

endógenas y alteraciones por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, se ha establecido que la formación de Especies reactivas del oxígeno (ROS), incluyendo superóxido ($O_2 \cdot^-$), hidrógeno Peróxido (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($HO \cdot$), se establecen en condiciones fisiológicas normales y es aumentada por algunos xenobióticos. La Glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) como enzima citoplasmática, cataliza el primer paso en el derivado de hexafosfato monofosfato, también conocido como la vía pentosa fosfato. El producto final de esta vía, la ribosa- 5-fosfato, es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y por lo tanto es esencial para el crecimiento celular. Durante la conversión de glucosa-6- Fosfato a 6-fosfogluconato, G6PD genera nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), esencial para la estabilidad de las catalasa, muchas vías biosintéticas reductoras incluyendo la síntesis del colesterol y de ácidos grasos, así como la regeneración de glutatión (GSH) desde su forma oxidada, disulfuro de glutatión (GSSG), catalasa y GSH (a través de la vía de GSH peroxidasa), todas son esenciales para la eliminación de H_2O_2 , que si no se desintoxica, puede generar alteraciones en la vía de traducción así como directa e indirectamente la formación de $HO \cdot$, y por lo tanto, el daño oxidativo a las principales macromoléculas (ADN, proteínas y lípidos), lo que altera de manera negativamente la función celular. La G6PD durante la el periodo crítico de la diferenciación hipotalámica previene la muerte celular por los efectos patológicos del estrés oxidativo endógeno así como de los xenobióticos, controlando la formación de especies ROS, que probablemente puedan proteger al cerebro de las consecuencias neurodegenerativas, producidas por la acumulación de macromoléculas dañadas o bien por estrés oxidativo (Jeng y col., 2013).

Se ha visto también que la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (ROS) durante la generación de ATP por la cadena de transporte de electrones (ETC) daña macromoléculas incluyendo ADN mitocondrial (ADNmt). Las moléculas dañadas y la disfunción mitocondrial se acumulan con el tiempo, con el estrés y contribuyen al envejecimiento y muerte celular (Guarente, 2008).

Por lo anterior, los estrógenos ejercen efectos de manera directa e indirecta sobre la función mitocondrial en una variedad de tejidos y los efectos neuroprotectores del estrógeno son los más estudiados, sin embargo, los mecanismos por los que los estrógenos logran sus efectos fisiológicos y farmacológicos son complejos y no se elucidan completamente (Simpkins y col., 2010). La capacidad de los estrógenos para regular los genes mitocondriales del ADN nuclear y mitocondrial (mtDNA) en las células MCF-7 se revisó recientemente y los autores concluyeron que los efectos mitocondriales del estrógeno pueden desempeñar un papel en el cáncer de mama, la función cardiovascular, y diferencias en la neuroprotección (Klinge 2008).

ER α y ER β pueden estar localizados en mitocondrias en una variedad de tejidos, incluyendo ovarios y útero de conejo, células epiteliales de lente humana, espermatozoides, neuronas corticales cerebrales y hipocámpales primarias, cardiomiocitos, así como líneas celulares HepG2, SaOS-2 y MCF-7. Otros factores de transcripción nucleares, por ejemplo, p53, NF- κ B, AP-1, CREB, wnt, c-src y c-myc, también se han observado en mitocondrias lo que establece la posibilidad de que la interacción ER con estas proteínas en la mitocondria puede afectar la expresión del gen mtDNA u otras funciones transcripcionales activas dentro de las mitocondrias. Un aumento estimulado por E₂ en los niveles de mRNA de los genes codificados por mtDNA, las subunidades I y II de citocromo c oxidasa (COI y COII) fueron inhibidas por ICI 182.780, lo que indica la dependencia de ER. El grupo de Yager y colaboradores (2007) identificó una secuencia de proteína de orientación mitocondrial (mTPS) en ER β aa 220-270 e informó que ER α carece de un mTPS. Otros estudios indican que la interacción de ER β con Tom70 y Hsp70 puede desempeñar un papel en el tráfico mitocondrial de ER β (Simpkins y col., 2008]. El D-loop de mtDNA contiene elementos de control de replicación y transcripción. ER β unido a D-loop EREs en MCF-7 mtDNA in vitro. Recientemente, se informó que ER β se localizaba predominantemente en las mitocondrias de líneas de células epiteliales humanas immortalizadas

"normales" y transformadas con E₂ (MCF-10F) (Chen y col., 2007), lo que podría estar asociado en la expresión disminuida en *Ers1* en testigos y tratadas (Figura 1), no así en los controles sometidos a estrés, donde tendrá que haber modificaciones en la poblaciones neuronales hipotalámicas. Además, se ha informado que ER β cambia de mitocondrias a los núcleos durante la transformación neoplásica inducida por E₂ y que E₂ y el ERN-agonista selectivo DPN, pero no el ER α -agonista selectivo PPT, indujo la expresión de MtDNA codificados MRC genes y proteínas COI, COII y ND1 (Chen y col., 2007). Sin embargo, los autores no indicaron durante cuánto tiempo las células fueron tratadas con E₂ o DPN y, por tanto, si el efecto es primario o secundario, es decir, debido al aumento de NRF - 1, Tfam, TFB1, etc.

CONCLUSION

La participación de las hormonas esteroides, y los mecanismos en los que están involucrados, son únicamente los pasos iniciadores de los procesos celulares con un considerado grado de complejidad, y los posibles cambios que se pueden presentar en el periodo crítico van a dar las variaciones múltiples de respuesta dentro del mismo periodo crítico, y que se manifestarán en la etapa activacional, que sin duda va a ocasionar cambios importantes en lo que se manifestará fenotípicamente. La participación de los genes relacionados con la neuroprotección, sinaptogénesis y apoptosis, están íntimamente relacionados a lo largo del periodo crítico, lo que podría manifestarse en variaciones de respuestas a lo largo del desarrollo en los machos y entonces se presenten variaciones en respuesta inclusive en el mismo sexo por la variabilidad-susceptibilidad, sin considerar el cerebro de la hembra que presenta per se, sus mecanismos propios de respuesta ante la ausencia de hormonas estrogénicas.

Estos resultados destacan la importancia de prevenir la exposición a disruptores endocrinos en el medio ambiente durante los periodos críticos de la diferenciación sexual cerebral.

Declaración de conflicto de interés

No existe conflicto de ningún tipo.

Agradecimientos.

Al Dr. Leonardo Perea Martínez, por su asesoría en las técnicas de Biología molecular.

Al MVZ. Noe Orlando Juárez Lopez, por su asesoría en el análisis estadístico.

Trabajo parcialmente financiado por CONACYT proyecto 0105961-M, ANUIES-ECOS-CONACYT proyecto M10-A02. Beca escolar CONACYT 201677 a C.C.

REFERENCIAS

1. Ankley GT, Johnson RD. 2004. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal* 45: 469-483. Doi.org/10.1093/ilar.45.4.469.
2. Anne T, Konkle M, Margaret M. McCarthy M. 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*, 152:223-235.

3. Arnold AP, Breedlove SM. 1985. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Hormones and Behavior*, 19:469–498.
4. Babichev V, Shishkina I, Peryshkova T. 1990. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomedical Science*, 1:189-192.
5. Barraclough A. 1967. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In: Martini L, Ganong WF, editors. *Neuroendocrinology*. New York and London Academic Press; p. 61-99.
6. Chen J-Q, Russo PA, Cooke C, Russo IH, Russo J. 2007. ER[beta] shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.;1773:1732–1746
7. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* ;162:156-9.
8. Chung CJW, Swaab DF, Geert JDV. 2000. Apoptosis during sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat Brain. *Journal of Neurobiology* 43:234–243.
9. Döhler K, Srivastava S, Shryne J, Jarzab B, Sipos A, Gorski R. 1984. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat

brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology*, 38:297-301.

10. Döhler KD, Hines M, Coquelin A, Davis F, Shryne JE, Sickmöler PM, y col. 1985. Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology*, 42:443-8.

11. Dörner G, Hinnz G. 1967. Homosexuality of neonatally castrated male rats following androgen substitution in adulthood. *German Medical Monthly*, 2:281-283.

12. Dörner G, Staudt J. 1968. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology*, 3:136-40.

13. Gill-Sharma MK, Gopalkrishnan K, Balasinor N, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. 1993. Effects of tamoxifen on the fertility of male rats. *Journal of Reproduction and Fertility*; 99:395-402.

14. González-Sánchez HM, Silva-Ramírez AS. 2016. Castillo Martín del Campo S. 2016. Modulation of apoptosis by cytomegalovirus, from the perspective of the central nervous system. *Revista Chilena de Infectología*; 33 (1): 44-54

15. Gorski R. 1985. Sexual dimorphism of the brain. *Journal of Animal Science*; 61:1001-1004.

16. Gorski R, Warner J. Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinology*, 1965; 76:226-239.

17. Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, Vidal H and Lefai E. 2005. Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *Journal of Lipid Research*, 46:697-705.
18. Guarente L. 2008. Mitochondria--A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins?. *Cell*; 132:171–176
19. Herrera GH, Rosado GA, Vergara OM, Salcedo VM, Miliar GM, Heuze IY, Rosales TAM. 2013. Genetic expression associated to cell cycle, apoptosis, synaptogenesis and cell differentiation during sex differentiation in rats. *Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria*, 4(3):289-304.
20. Huang B, Harper DAT, Hammer O. 2013. Introduction to PAST, A comprehensive statistics software package for paleontological data analysis. *Acta Paleontologica Sinica*;52(2):181.
21. Imaizumi K, Morihara T, Mori T, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M and Tohyama M. 1999. The Cell Death-promoting Gene DP5, Which Interacts with the BCL2 Family, Is Induced during Neuronal Apoptosis Following Exposure to Amyloid β Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 12:7975–7981.
22. Jacobson CD, Davis EC, Gorski RA. 1985. Formation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: neuronal growth, migration and changes in cell number. *Developmental Brain Research*; 21:7–18.
23. Jeng W., Loniewska MM, Wells PG. 2013. Brain Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects against endogenous oxidative dna damage and neurodegeneration in aged mice. *ACS Chemical Neuroscience*. 4, 1123–1132

24. Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods*. 25, 402–408).
25. Klinge CM. 2008. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 105(6): 1342–1351.
26. Lauber ME, Sarasin A, Lichtensteiger W. 1997. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61:359-64.
27. Macnab MW, Tallarida RJ, Joseph R. 1984. An evaluation of tamoxifen as a partial agonist by classical receptor theory — an explanation of the dual action of tamoxifen. *European Journal of Pharmacology*;103:321-6.
28. McCarthy MM. 2010. How it's Made: organizational effects of hormones on the developing brain. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 736–742
29. Myung Soon Yang, Kyung-Ae Ji, Sae-Bom Jeon, Byung-Kwan jin, Seung U. Kim, Ilo Jou and Eunhye Joe. 2006. Interleukin-13 enhances Cyclooxygenase-2 Expression in activated rat brain microglia : Implications for death of activated microglia. *The Journal of Immunology*, 177: 1323-1329.
30. Phoenix C, Goy R, Young W. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissue mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*; 65:369-382.
31. Rodríguez-Medina MA, Reyes A, Chavarría ME, Vergara-Onofre M, Canchola E, Rosado A. 2001. Asymmetric calmodulin distribution in the

hypothalamus role of sexual differentiation in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 72(1-2):189-95.

32. Simpkins JW, Yi KD, Yang S-H, Dykens JA. 2010. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1800:1113–1120.

33. Singh, SP, Wolfe A, Yewade Ng, Divall SA, Buggs Colleen, Levine JE, Wondisford FE and Radovick S. 2009. Impaired estrogen feedback and infertility in female mice with pituitary-specific deletion of estrogen receptor alpha (Esr1). *Biology of Reproduction* 81, 488-496.

34. Sostres C., Gargallo CJ, Lanas A. Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. *World Journal Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. Feb 6, 2014; 5(1): 40-49

35. Tobet SA, Chickering TW, Hanna I, Crandall JE, Schwarting GA. 1994. Can gonadal steroids influence cell position in the developing brain? *Hormones and Behavior* 28:320–327.

36. Torres-Ramírez N, Baiza-Gutman LA, García-Macedo R, Ortega-Camarillo C, Contreras-Ramos A, Medina-Navarro R, Cruz M, Ibáñez-Hernández MA, Díaz-Flores M. 2013. Nicotinamide, a glucose-6-phosphate dehydrogenase non-competitive mixed inhibitor, modifies redox balance and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Life Sciences*, 93;975–985.

37. Vangala V, Naftolin R, Ryan K. 1973. Aromatization in the central nervous system of rabbits: effects of castration and hormone treatment. *Endocrinology*. 92:589-596.

38. Vennemann A, Gerstner A, Kern N, Farreiros BA, Narumiya S, Murayama T and Nüshing RM. 2012. PTGS2-PTGER2/4 signaling pathway partially protects from diabetogenic toxicity of streptozotocin in mice. *Diabetes*, 61: 1879-1887.
39. Weisz J, Gunsalus P. 1973. Estrogen levels immature rats. True spurious-ovarian or adrenal. *Endocrinology*, 93:57-65.
40. Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, McCarthy MM. 2010. Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(9):553-61.
41. Yager JD, Chen JQ. 2007. Mitochondrial estrogen receptors – new insights into specific functions. *Trends in Endocrinology & Metabolism*.18:89–91.
42. Yilmaz MB, Wolfe A, Cheng YH, Glidewell-Kenney C, Jameson JL. 2009. Aromatase promotor I.f is regulated by estrogen receptor alpha (Esr1) in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *Biology of Reproduction*, 81: 956-965.

Alicia González-González¹
 Everardo González-Padilla¹
 Francisco Fierro²
 0000-0002-2582-5362
 Ma. De Lourdes Juarez-Mosqueda³
 Juan José Perez-Rivero⁴
 Clara Ortega-Camarillo⁵
 0000-0001-8709-6727
 Mónica Salas-Rojas⁶
 0000-0001-7046-0967
 Marcela Vergara Onofre⁴

A single neonatal administration of soybean oil and/or tamoxifen permanently affects testis histomorphology in adult rats

¹Departamento de Reproducción
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM
 Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán CP. 04510
 Ciudad de México.

²Departamento de Biotecnología
 Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad
 Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186 Col.
 Vicentina. 19340 Del. Iztapalapa
 Ciudad de México.

³Departamento de Morfología
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
 Ciudad Universitaria Del. Coyoacán CP. 04510
 Ciudad de México

⁴Departamento de Producción Agrícola y Animal
 Universidad Autónoma Metropolitana-
 Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100
 Col. Villa quietud CP. 04960 Del. Xochimilco
 Ciudad de México

⁵Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
 Hospital de Especialidades
 Centro Médico Nacional Siglo XXI
 Instituto Mexicano del Seguro Social
 Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores CP. 06720
 Del Cuauhtémoc. Ciudad de México

⁶Unidad de Investigación Médica en Inmunología
 Hospital de Pediatría
 Centro Médico Nacional Siglo XXI
 Instituto Mexicano del Seguro Social
 México. Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores CP. 06720
 Del Cuauhtémoc. Ciudad de México

*Corresponding author:
 Email address:
 mvergara@correo.xoc.uam.mx

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of administration of tamoxifen (Tx) and its vehicle, soybean oil (SO), during the critical period of hypothalamic sexual differentiation in newborn male rats in the context of gonadal histomorphology during adulthood. The animals were randomly divided into 3 groups (n = 5 each). One hour after birth, one group was treated subcutaneously with 200 µg of Tx using commercial SO (20 µL) as a vehicle, another group was treated with only 20 µL of SO, and the control group received no treatment. All rats were weighed and sacrificed by cervical dislocation on day 90 post-treatment. Testicles were removed, weighed and processed for histological evaluation. The single administration of Tx and/or SO during the critical period of sexual differentiation of the hypothalamus permanently altered testicular histomorphology, spermatogenesis, and body weight in adulthood. Alterations included vacuolization and reduction in the number of spermatogonia and Sertoli cells. The administration of Tx reduced testicular weight, the diameter and area of the seminiferous tubules, and the height of the germinal epithelium and increased the intertubular space. Soybean oil by itself reduced the number of spermatocytes and spermatids to a greater extent than Tx. There was no effect on the number of Leydig cells. The possibility that soybean oil can act as an endocrine disruptor deserves greater attention and opens the possibility for the development of new pest control methods.

Keywords: Endocrine disruptors; Tamoxifen; Soybean oil; Sexual differentiation of the hypothalamus; Testicular morphology.

Introduction

During development, in the “critical period” of brain sexual differentiation, the brains of male rats are exposed to higher levels of testosterone of testicular origin, which increases at the end of gestation, primarily two hours after birth (Anne *et al.*, 2011). In neurons, testosterone is converted to estrogens by the P450 aromatase enzyme. Estrogens may act in two different stages: an “organization” phase during the prenatal and early postnatal periods, and an “activation” phase in adulthood

Received: 2016-02-10
 Accepted: 2016-06-08
 Published: 2016-07-01

Additional information and declarations
 can be found on page 9

©Copyright 2016
 Alicia González-González *et al.*

open access 

Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

(Phoenix *et al.*, 1959). The organizational effects of estradiol induce sexual differentiation of the hypothalamus (Lauber *et al.*, 1997) and actively regulate the neural circuits (Barraclough, 1966; Simerly *et al.*, 2002), which are responsible for the tonic secretion of gonadotropins (Finkelstein *et al.*, 1991; Bagatell *et al.*, 1994) and reproductive behaviors characteristic of males (Lauber *et al.*, 1997 and Simerly, 2002). Estrogens are also involved in spermatogenesis and sperm maturation in the epididymis (Balasinor *et al.*, 2001).

Exposure to exogenous endocrine-disrupting chemicals (EDCs, of natural or synthetic origin) that mimic or block the effects of endogenous sex steroid hormones (Wilson and Davies, 2007) can send mixed messages to the body, causing developmental abnormalities with irreversible effects. The role of estrogens in sexual reproduction has been confirmed by the use of antiestrogens such as tamoxifen (Tx; Z-1-[4-(2-dimethylamino-ethoxy)-phenyl]-1, 2-diphenyl-1-butane) (Barraclough, 1967; Dörner and Staudt, 1968; Döhler *et al.*, 1984), a synthetic drug commonly used in breast cancer treatment. Its mechanism of action remains unclear, but it is known that it exerts several biological effects. It may act as a complete estrogen agonist or antagonist depending on the dose, target organ, sex, and species (Gill-Sharma *et al.*, 1993; Furr and Jordan, 1984; Macnab *et al.*, 1984). In addition to Tx, there are other chemicals that can alter the hormonal milieu, affecting growth, sexual development and behavior.

In male mice, Tx is detrimental for testicular and accessory gland development after neonatal administration (24 hours post-birth; 20 or 100 µg/d for 5 days; Iguchi and Hirokawa, 1986) and renders male mice infertile (Taguchi, 1987). Tx impedes the interaction of estradiol with its receptor in the hypothalamus, in addition to inhibiting the aromatase enzyme, leading to cerebral feminization (Döhler *et al.*, 1985). In adults, a reversible effect of Tx on the hypothalamus-hypophysis axis has been reported (Gill-Sharma *et al.*, 1993); Balasinor *et al.* (2002) observed a dose-dependent reduction in fertility due to embryo loss in females mated to male rats treated with Tx.

In our group, Herrera *et al.* (2013) found that a single subcutaneous (sc) dose of Tx (200 µg) in rats one hour after birth modified the expression of certain hypothalamic genes. To advance on those studies, an experiment was designed to examine the expression of 11 specific genes in the hypothalamus of male rats within the first six hours after treatment at one hour after birth with Tx in SO, SO or control. Some of the animals were weighed at weekly intervals and sacrificed as adults at 90 d of age, when both testicles were removed, weighed and subjected to histological analysis. Observations of the changes in testicular morphology in those animals are presented in this communication.

Materials and methods

Animals

The animals were obtained from and housed in the Production and Animal Experimentation Laboratory Unit (UPEAL) of the Universidad Autónoma Metropolitana, campus Xochimilco (UAMX), in a controlled environment (21°C) with 12-hour light-dark inverted cycles (lights off at 4:00 AM) as well as food (Rodent Diet 5001, LabDiet) and water *ad libitum*.

Nine Wistar rats (6 females and 3 males) were used as breeders. The males were 90 day-old rats that weighed more than 400 g. Their reproductive capacity was evaluated based on their copulatory behavior, the presence of a seminal plug in females after copulation, and pregnancy confirmation. The females were 60-day-old rats that weighed more than 200 g. Their estrous cycle was monitored daily through vaginal cytology for at least 3 cycles to confirm their endocrine-reproductive normality. Estrous rats were placed in a cage with a male to obtain a first pregnancy and to corroborate their reproductive capacity. After the first litter, a second round of selection was conducted based on the observed maternal behavior. Finally, only rats that had estrous cycles, gestation, and normal litters, as well as adequate maternal behavior, were selected.

Two weeks after the first delivery, new estrous cycles were monitored again. At estrous, one female and one male were placed in a cage again for 3 hours. The beginning of pregnancy was verified by the presence of sperm through vaginal cytology and/or the formation of a seminal plug. Pregnant rats were housed in cages under the conditions previously described. Because our main goal was to analyze the effects of early administration (1 hour after birth) of Tx and its vehicle (SO) on testicular microscopic morphology in adult rats, strict control of the moment of fertilization and constant monitoring of mothers were necessary, primarily at the end of gestation, to identify the exact time of birth.

The time of birth of each animal was considered hour zero. Newborn males were separated and divided randomly into 3 groups of 5 animals each. An hour after birth, treatment was administered: one group was treated subcutaneously with 200 µg of Tx (Sigma-Aldrich- Sigma-Aldrich Corporate Offices, 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103, U.S.A.) diluted in commercial SO (20 µL), another group was treated subcutaneously only with SO (20 µL), and the control group received no treatment. Tamoxifen was used to induce brain feminization. Soybean oil alone was given to avoid confounding the effects of treatment due to the vehicle. Treated rats were returned to their mothers until weaning (21 days) and then fed in the same manner as the other animals.

Collection and processing of samples

All rats were weighed weekly until 90 days post-treatment and sacrificed by cervical dislocation. Immediately, testicles were removed in a block, dissected under a stereoscopic microscope, weighed on an analytical balance, perfused and fixed in Bouin solution for 8 hours. Subsequently, they were dehydrated in a decreasing ethanol series, cleared in xylene, and embedded in paraffin to obtain cross-section slides (5 microns) on a rotary microtome (Leica RM2125 RT). Finally, hematoxylin-eosin staining was performed for morphological evaluation, and the testicle cross-sections were observed under a microscope.

Morphological evaluation

Only round tubules were digitized for analysis in 20X and 40X magnification fields. Ten tubules were analyzed for each testicle (20 tubules for each rat). Measurements of diameter, area, height of the germinal epithelium, and interstitial space were made from the scanned sections with the LSM5 software (Carl Zeiss, Ger-

Table 1. Mean \pm SD for testicular weight and body weight at 90 days.

Characteristic	Control	Soybean oil	Tamoxifen
Testicular weight (g)	5.2 \pm 0.3 ^a	5.5 \pm 0.2 ^a	4.4 \pm 0.3 ^b
Body weight (g)	443.3 \pm 15.1 ^a	400.5 \pm 14.1 ^b	362.0 \pm 8.6 ^c

Testicular weights and body weights of 90-day-old rats. Distinct superscripts within each line indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

many) using the marking tools. The photographed cross-sections were used to identify the tubular stages and to count cells using the tubular morphology method (Berndtson, 1977; Hess and França, 2007), which is based on the shape of the spermatid nuclei, the occurrence of meiotic divisions, and the position of spermatids in the seminiferous epithelium (Farias *et al.*, 2014). All slides were analyzed by 3 veterinary morphologists, and the individual results were averaged for this report.

Statistical analysis

A Shapiro Wilks test was performed to determine the normality of the data for the different parameters studied. Depending on the normality of distribution, data were analyzed with a Kruskal-Wallis test (morphology and cell counts) or one-way ANOVA (body weight and testicular weight). The results are expressed as the mean values \pm SE (standard error) and mean values \pm SD (standard deviation), respectively. Values analyzed were derived from 5 animals per group for body weight and testicular weight and from 10 tubules randomly taken from each testicle. PAST software (Paleontological Statistics Package for Education and Data Analysis, Huang *et al.*, 2013) was used for all statistical calculations.

Results and discussion

The results for testicular weight and body weight at 90 days post-treatment are shown in Table 1. The average testicular weight was significantly lower in animals treated with Tx than in the control group or the SO-treated group ($F: 47.19$; degrees of freedom between groups: 2; degrees of freedom within groups: 12; $P < 0.001$). The average body weight at 90 days was lowest for the animals treated with Tx, followed by the group treated with SO, whereas the animals in the control group were the heaviest ($F: 16.67$; degrees of freedom between groups: 2; degrees of freedom within groups: 12; $P < 0.001$). Only the animals treated with Tx showed a significant reduction in tube diameter ($H: 12.88$; $H_c: 13.00$; $P < 0.005$), tubular area ($H: 9.85$; $H_c: 9.85$; $P < 0.05$), and height of the germinal epithelium ($H: 27.04$; $H_c: 27.05$; $P < 0.001$) [Table 2]. In comparison to the control group, the intertubular space was largest in the animals treated with Tx, followed by those treated with SO.

The average results for cell count per tubule are shown in Table 3. The numbers of spermatogonia ($H: 6,953$; $H_c: 6,959$; $P < 0.05$) and Sertoli cells ($H: 9.89$; $H_c: 10.31$; $P < 0.05$) were significantly lower in the Tx and SO experimental groups in comparison to the control group. No significant differences in the number of Leydig cells were observed ($H: 1.33$; $H_c: 1.33$; $P < 0.5$). Compared to the control group, the males treated with SO showed the greatest reduction in the number of spermatocytes ($H: 12.21$; $H_c: 12.22$; $P < 0.05$) and elongated spermatids ($H: 11.62$; $H_c: 11.64$; $P < 0.05$), followed by the Tx-treated males.

Table 2. Testicle morphometry of 90-day-old male rats treated with tamoxifen and/or soybean oil 1 h post-birth (mean \pm SE).

Characteristic	Control	Soybean oil	Tamoxifen
Tubule diameter (μm)	279.4 \pm 8.7 ^a	304.11 \pm 11.0 ^a	219.2 \pm 6.4 ^b
Tubule area (μm^2)	193,103.1 \pm 10249.0 ^a	163,359.0 \pm 11495.1 ^a	131,672.0 \pm 3033.6 ^b
Germinal epithelium height (μm)	45.0 \pm 1.1 ^a	42.0 \pm 2.9 ^a	30.4 \pm 1.4 ^b
Intertubular space (μm)	4.2 \pm 0.4 ^a	16.7 \pm 2.2 ^b	39.5 \pm 4.1 ^c

Testicular alterations induced by Tx and/or SO treatments. Distinct superscripts within each line indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

Table 3. Testicular cell counts of 90-day-old male rats treated with tamoxifen and/or soybean oil 1 h post-birth (mean \pm SE).

Cell type (number)	Control	Soybean oil	Tamoxifen
Spermatogonias/tubule	66.7 \pm 8.4 ^a	46.1 \pm 5.4 ^b	40.3 \pm 2.7 ^b
Spermatocytes/tubule	149.3 \pm 17.4 ^a	64.9 \pm 5.9 ^c	97.2 \pm 7.9 ^b
Spermatids/tubule	171.7 \pm 40.8 ^a	41.6 \pm 9.2 ^c	113.3 \pm 9.2 ^b
Sertoli cells/tubule	7.4 \pm 0.5 ^a	4.7 \pm 0.3 ^b	5.0 \pm 0.7 ^b
Leydig cells/intertubular space	10.5 \pm 0.5 ^a	9.8 \pm 0.6 ^a	9.8 \pm 0.6 ^a

Testicular alterations induced by Tx and/or SO treatments. Distinct superscripts within each line indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

As shown in Fig. 1, testicles in the control group (A-B) showed evidence of seminiferous tubules with normal spermatogenesis. The SO-treated group (C-D) showed vacuolization in the seminiferous tubules, destruction of the germinal epithelium, and a reduction in the amount of germ and Sertoli cells; additionally, increases in the intertubular spaces and ungrouped Leydig cells were observed. These alterations were also noted in animals treated with Tx, which in addition showed a significant reduction in tubular diameter and tubular area as well as a larger intertubular space than either the control or SO groups.

The results revealed that during the critical period of sexual differentiation of the hypothalamus, a single administration of Tx and SO reduced body weight, testicular weight, and altered the gonadal histomorphology and spermatogenesis in adult rats. In our experiment, although no measurements of circulating hormone concentrations were performed, the effect on weight gain over 90 days in treated animals is an indication of insufficient testosterone stimulation, despite the lack of effects on the number of Leydig cells due to treatment. It must be noted that the edematous environment and the dispersion of cells in the intertubular space in treated animals, as well as the possible lack of proper gonadotropic stimulation, could reduce testosterone production. The disruption of normal gonadotropin secretion (and therefore testosterone) due to inadequate hypothalamic control caused by the treatments could explain the low numbers of Sertoli cells, which constitute the structural basis for the blood-testis barrier (Yu-hua *et al.*, 2015) and provide support for spermatogenesis. The diminished presence of FSH and testosterone in the seminiferous tubules could have affected Sertoli cell function and estrogen production, which is congruous with the observed reduction in germ cell numbers, most likely caused by increased apoptosis in an environment with vacuolization and tubular edema.

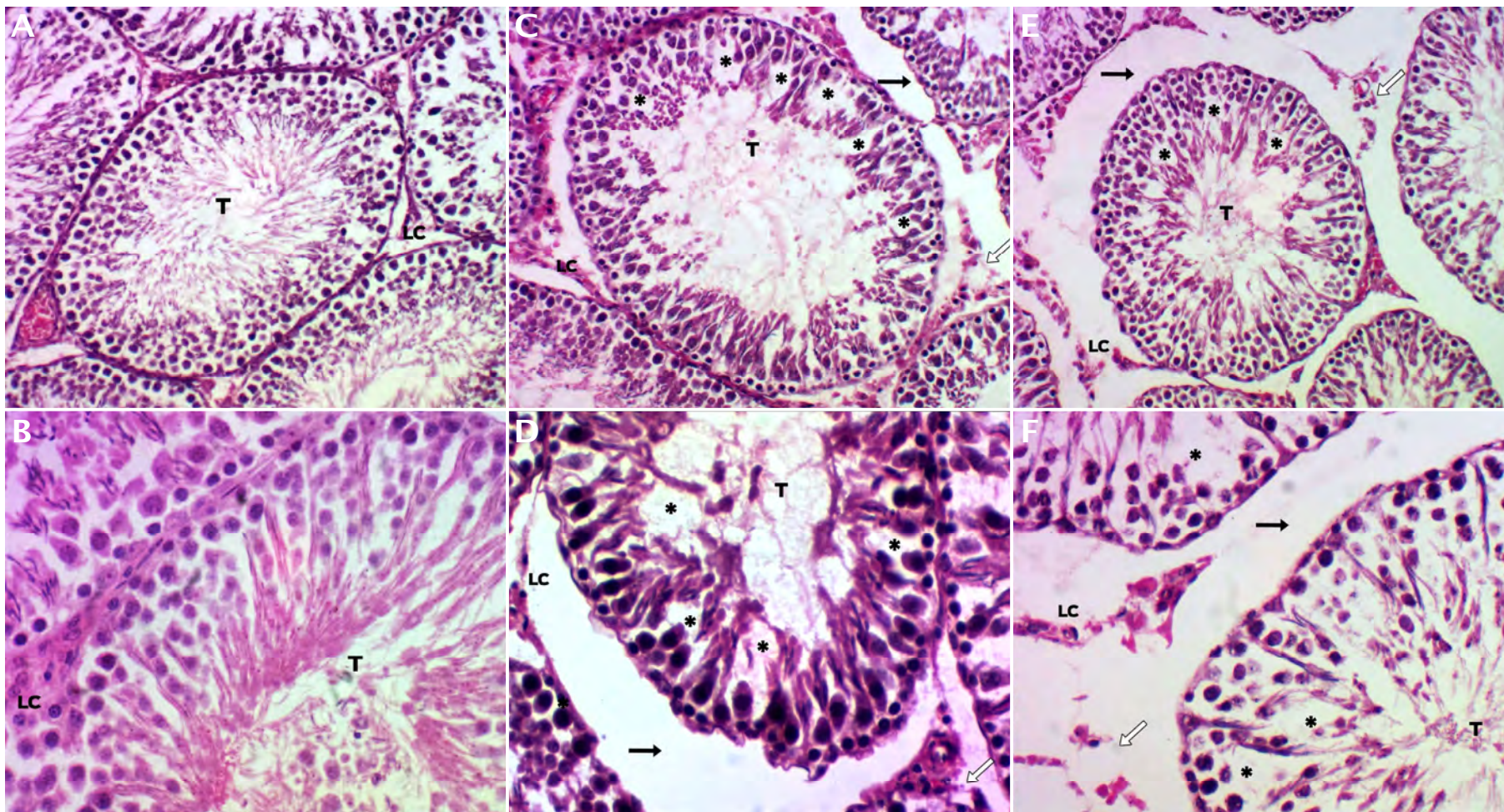


Figure 1. Representative hematoxylin-eosin-stained histological sections of testicles collected from the control group (A y B), rats treated with SO (C y D) and rats treated with Tx (E y F). A, C and E, 200X. B, D and F, 400X. T: Tubule. LC: Leydig cells. Histological changes induced by Tx and/or SO treatments can be observed. Black arrows point to the largest intertubular space. Dashed arrows in E and F indicate the ungrouping of the LC. Asterisks indicate the vacuoles in the seminiferous tubules.

The mammalian testis is characterized by the synthesis of steroid hormones and sperm production (Carreau *et al.*, 2006). Normal testicular development and spermatogenesis maintenance are primarily controlled by gonadotropins and testosterone (Carreau *et al.*, 1999). Their effects are modulated by local factors, among which estrogens are essential for the maintenance of the reproductive tract in males (Carreau *et al.*, 2003). Estrogens are synthesized in Leydig cells (Abney, 1999), Sertoli cells, and round and elongated spermatids (Hess *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2005; Lambard *et al.*, 2005). In these cells, the existence of specific estrogen alpha (ER α) and beta (ER β) receptors suggests paracrine and autocrine effects of estradiol (Carreau *et al.*, 2002; Scobie *et al.*, 2002). Estrogens act as survival factors in germ cells (Carreau *et al.*, 2003). It has been demonstrated that the P450 aromatase enzyme is required for the maturation of sperm and fluid absorption mechanisms in the efferent ducts (Lambard *et al.*, 2005). In the absence of estrogen receptors, fluid absorption in these ducts, in the *rete testis* and in the seminiferous tubules is reduced (Hess *et al.*, 2000) and accumulates in the testicles, causing damage to the germinal epithelium and therefore causing alterations in sperm development and fertility (Hess *et al.*, 2001), as was observed in our work. This suggests that the treatments influenced the mechanisms involved to provide the estrogenic action necessary for normal testicular function.

Under physiological conditions, estrogens play an important role in the normal development of the structure and function of the testicles and the male reproductive tract. In the testicle, estrogens depend on the availability of androgens for their synthesis; however, under experimental conditions, the neonatal administration of exogenous estrogenic substances orally, in feed or water, reduces sperm counts, plasma testosterone and the number of Sertoli cells (Goyal *et al.*, 2003; Sharpe *et al.*, 2003 and Atanossova *et al.*, 2005). In post-pubertal rats, Assinder *et al.* (2007) reported that weaned male rats fed for 24 days on a diet high in phytoestrogens demonstrated increased apoptosis of germ cells, a reduction in spermatid counts and a luminal increase in the seminiferous tubules, without apparent involvement of the hypothalamus-hypophysis-testicle axis, but rather involving the paracrine and autocrine effects of estrogens in the testicle.

Soy and its derivatives are known sources of isoflavones, a particular class of phytoestrogens that may interact in the signaling pathways of endogenous estrogen (Cederroth *et al.*, 2012). Previous studies have shown that during critical periods of development, exposure to phytoestrogen induces adverse morphological and physiological effects on male sexual differentiation in mice (Roberts *et al.*, 2000; Wisniewski *et al.*, 2003). Levy *et al.* (1995) reported that treatment with genistein (derived from soy) reduces body weight (in males and females) and the anogenital distance at birth (in males) and delays the onset of puberty. These results were confirmed by Wisniewski *et al.* (2005), who also observed phenotypic and behavioral disorders in male mice of mothers fed with 5 or 300 mg of genistein/kg of body weight during pregnancy and lactation. At 21 days after birth, the offspring exhibited permanent demasculinization: a reduction in sperm cells, testosterone and aggressive behavior and an increase in defensive behavior. In our study, the observation of vacuolation, decreased germinal epithelium height, and increased intertubular space constituted important findings. Other researchers, such as Perez-Rivero *et al.* (2009 and 2014), have previously reported these changes in dogs and vampire bats fed with rich phytoestrogen (coumestrol) diets. These observa-

tions are compatible with those in our experiment but are associated with a single sc injection of SO.

Tamoxifen administration during the perinatal stage blocks the interaction of estradiol with its receptor in the hypothalamus and inhibits the aromatase enzyme (Döhler *et al.*, 1985), which is necessary for the masculinization of the neural circuits that modulate the behavior and the gonadotropin secretion typical of males in adulthood. Tx induces oxidative stress and apoptosis in albino mouse spermatozoa, morphological abnormalities (DNA adduct formation; Padmalatha and Vijayalaxmi, 2001) and seminiferous tubule distortion with germ cell detachment. In adult male rats, Tx (200, 400 or 800 mg/kg of body weight) caused multinucleated giant cells (D'Souza, 2003) and reduced fertility (Balasinor *et al.*, 2001; Gill-Sharma, 1993).

It is known that Tx may act as an estrogen antagonist or agonist on the reproductive axis of the rat (Bellido *et al.*, 2003), and SO can be a source of phytoestrogens. In this study, both substances were administered in the first hour after the birth of male rat pups, which is close to the critical time for hypothalamus sex differentiation; thus, the morphological changes observed in the testicles could be attributable to the effects of the treatments on hypothalamic nuclei controlling tonic gonadotropin secretion, with an additional effect on testicular steroidogenesis. The role of testosterone in testicular function and spermatogenesis is well documented. However, it is worth mentioning that in models of soy phytoestrogen administration in adult rodents, the disruption of testicular function can be independent of the circulating concentrations of gonadotrophins and testosterone.

Conclusions

This communication documents the irreversible changes on the testicular function and histomorphology of adult rats caused by a single, acute treatment of tamoxifen and/or soybean oil at one hour after birth. These changes may be associated with disruption of the normal course of sex differentiation of the hypothalamus during the known critical period for this process.

Funding

This project was partially financed by CONACYT grant 105961-M, ANUIES-ECOS- CONACYT grant M10-A02, and CONACYT scholarship 201677.

Acknowledgements

The authors thank Beatriz Marquez Cruz and Pablo Sanchez Peña from the Laboratory of Pathology (General Hospital Zones 47 and 1A, respectively, Mexican Institute of Social Security) for their technical assistance.

The Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of UAMX approved the procedures performed on the animals.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

Alicia González-González, experimental development and analysis of results.
Everardo González-Padilla, in the discussion and analysis of results.

Francisco Fierro, in the analysis of results.

Mónica Salas-Rojas, in the morphometric analysis.

Ma. De Lourdes Juarez-Mosqueda, in sample processing.

Juan José Perez-Rivero, in morphometric and statistical analysis.

Clara Ortega-Camarillo and Marcela Vergara Onofre, in experimental design and supply of materials.

References

- 1) Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids*, 64:610-617. DOI: 10.1016/S0039-128X(99)00041-0.
- 2) Anne T, Konkle AT, M, Margaret M. McCarthy M.M. 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*, 152:223-235. DOI: 10.1210/en.2010-0607.
- 3) Assinder S, Davis R, Fenwick M, Glover A. 2007. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogens content increase apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction*, 133:11-19. DOI: 10.1530/rep.1.01211.
- 4) Atanassova NN, Walker M, McKinnell C, Fisher JS, Sharpe RM. 2005. Evidence that androgens and oestrogens, as well as folliclestimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *Journal of Endocrinology*, 184:107-117. DOI: 10.1677/joe.1.05884.
- 5) Bagatell CJ, Dahl KD, Bremner WJ. 1994. The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *Journal of Andrology*, 15:15-21. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1994.tb01674.x.
- 6) Balasiner N, Gill-Sharma MK, Parte P, D'Souza S, Kedia N, Juneja HS. 2001. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 190:159-66. DOI:10.1016/S0303-7207(01)00723-7.

- 7) Balasinor N, Gill-Sharma MK, Parte P, D'Souza S, Kedia N, et al., 2002. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 190:159-66. DOI:10.1016/S0303-7207(01)00723-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00723-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00723-7).
- 8) Barraclough A. 1967. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In: Martini L, Ganong WF (eds). *Neuroendocrinology*. United States of America, New York and London Academic Press. DOI: 10.1016/B978-1-4832-3229-4.50010-5.
- 9) Barraclough CA. 1966. Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research Journal*, 22:503-539. DOI: 10.1016/B978-1-4831-9825-5.50016-6.
- 10) Bellido C, Martín de las Mulas J, Tena-Sempere M, Aguilar R, Alonso R, Sánchez-Criado JE. 2003. Tamoxifen induces gonadotropin-releasing hormone self-priming through an estrogen-dependent progesterone receptor expression in the gonadotrope of the rat. *Neuroendocrinology*, 77(6):425-435. DOI: 10.1159/000071314.
- 11) Berndson WE. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: A review. *Journal of Animal Science*, 44:818-833. DOI: 10.2134/jas1977.445818x.
- 12) Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud DI, Genissel C, Levallet J. 2002. Reproductive system: Aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193:137-143. DOI: 10.1016/S0303-7207(02)00107-7.
- 13) Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S, Lambard S. 2006. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246:65-68. DOI: 10.1016/j.mce.2005.11.021.
- 14) Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and the reproductive tract of the male. *International Journal of Andrology*, 22:211-213. DOI: 10.1046/j.1365-2605.1999.00172.x.
- 15) Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis GI, Bilinska B, Bourguiba S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 35:1-6. DOI: 10.1186/1477-7827-1-35.
- 16) Cederroth CR, Zimmermann C, Nef SS. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355:192-200. DOI: 10.1016/j.mce.2011.05.049.
- 17) Döhler K, Srivastava S, Shryne J, Jarzab B, Sipos A, Gorski R. 1984. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology*, 38:297-301. DOI: 10.1159/000123907.
- 18) Döhler KD, Hines M, Coquelin A, Davis F, Shryne JE, Sickmöler PM, et al. 1985. Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology*, 42:443-448. DOI: 10.1159/000124484.
- 19) Dörner G, Staudt J. 1968. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology*, 3:136-140. DOI: 10.1159/000121703.
- 20) D' Souza UJA. 2003. Tamoxifen induced multinucleated cells (symplasts) and distortion of seminiferous tubules in rat testis. *Asian Journal of Andrology*,

- 5(3):217-220 <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682x/5/217.htm> [access: 15 jun 2016].
- 21) Farias TO, Notini AA, Talamoni SA, Godinho HP. 2014. Testis morphometry and stages of the seminiferous epithelium cycle in an epididymal sperm-storing neotropical vespertilionid, *Myotis levis* (Chiroptera). *Journal of Veterinary Medicine*, 44:361-369. DOI: 10.1111/ahe.12148.
 - 22) Finkelstein JS, O'Dea LSL, Whitcomb RW, Crowley WF. 1991. Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II Effects of estradiol administered in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70:621-628. DOI: 10.1210/jcem-73-3-621.
 - 23) Furr BJA, Jordan VC. 1984. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacology and Therapeutics*, 25:127-205. DOI: 10.1016/0163-7258(84)90043-3.
 - 24) Gill-Sharma MK, Gopalkrishnan K, Balasinor N, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. 1993. Effects of tamoxifen on the fertility of male rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99:395-402. DOI: 10.1530/jrf.0.0990395.
 - 25) Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. 2003. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biology of Reproduction*, 68:2081-2091. DOI: 10.1095/biolreprod.102.010637.
 - 26) Herrera GH, Rosado GA, Vergara OM, Salcedo VM, Miliar GA, Heuze de IY *et al.* 2013. Genetic expression associated to cell cycle, apoptosis, synaptogenesis and cell differentiation during sex differentiation in rats. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(3):289-304. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v4n3/v4n3a3.pdf> [access: 15 jun 2016].
 - 27) Hess RA, Bunick D, Bahr J. 2001. Oestrogen its receptor and function in male reproductive tract- a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178:29-38. DOI: 10.1016/S0303-7207(01)00412-9.
 - 28) Hess RA, Bunick D, Lubahn BD, Zhou Q, Bouma J. 2000. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor- α knockout mice. *Journal of Andrology*, 21(1):107-121. DOI:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03282.x. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03282.x>.
 - 29) Hess, RA., Renato de França. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636:1-15. DOI:10.1007/978-0-387-09597-4_1. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1.
 - 30) Huang B, Harper DAT, Hammer O. 2013. Introduction to PAST, a comprehensive statistics software package for paleontological data analysis [PDF]. *Acta Paleontologica Sinica*, 52(2):181. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf [access: 15 jun 2016].
 - 31) Iguchi T, Hirokawa M. 1986. Changes in the male genital organs of mice exposed neonatally to tamoxifen. *Proceedings of the Japan Academy*, 62:157-160. DOI: 10.2183/pjab.62.157.
 - 32) Kosif R, Yilmaz F, Evrendilek AG, Diramali M. 2010. Histopathological effects of *Aloe barbadensis* and soybean oil on rat liver. *International Journal of Morphology*, 28(4):1101-1106. DOI: 10.4067/S0717-95022010000400019.
 - 33) Lambard S, Silandre D, Delalande C, Galeraud DI, Bourguiba S, Carreau S. 2005. Aromatase in testis: Expression and role in male reproduction. *Journal of*

- nal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 95:63-69. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2005.04.020.
- 34) Lauber ME, Sarasin A, Lichtensteiger W. 1997. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61:359-364. DOI: 10.1016/S0960-0760(97)80033-7.
 - 35) Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL Jr. 1995. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(1):60-66. DOI: 10.3181/00379727-208-43832.
 - 36) Macnab MW, Tallarida RJ, Joseph R. 1984. An evaluation of tamoxifen as a partial agonist by classical receptor theory — an explanation of the dual action of tamoxifen. *European Journal of Pharmacology*, 103:321-326. DOI: 10.1016/0014-2999(84)90493-X.
 - 37) Padmalatha RS, Vijayalaxmi KK. 2001. Tamoxifen citrate induced sperm shape abnormalities in the in vivo mouse. *Mutation Research*, 492:1-6. DOI: 10.1016/S1383-5718(00)00160-1.
 - 38) Pérez-Rivero JJ, Pérez MM, Aguilar SA. 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route. *Journal of Applied Animal Research*, 42(2):208-212. DOI: 10.1080/09712119.2013.827578.
 - 39) Perez-Rivero JJ, Martinez MJJ, Perez MM, Aguilar SA, Garcia SMD Serrano H. 2009. Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. *Veterinary Research Communications*, 33:87-95. DOI: 10.1007/s11259-008-9077-3.
 - 40) Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, 65(3):369-382. DOI:10.1016/j.yhbeh.2009.01.004.
 - 41) Roberts D, Veeramachaneni DN, Schlaff WD, Awoniyi CA. 2000. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine*, 13(3):281-286. DOI: 10.1385/ENDO:13:3:281.
 - 42) Saunders PTK. 2005. Does estrogen receptor b play a significant role in human reproduction? *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 16(5):222-227. DOI: 10.1016/j.tem.2005.05.006.
 - 43) Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana P, Saunders PTK. 2002. Human estrogen receptors: Differential expression of ERalpha and beta and the identification of ERbeta variants. *Steroids*, 67:985-992. DOI: 10.1016/S0039-128X(02)00047-8.
 - 44) Sharpe RM, Rivas A, Walker M, McKinnell C, Fisher JS. 2003. Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *International Journal of Andrology*, 26:26-36. DOI: 10.1046/j.1365-2605.2003.00385.x.
 - 45) Simerly R. 2002. Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annual Review of Neuroscience*, 25:507-536. DOI: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142745.

- 46) Taguchi N. 1987. Reproductive tract lesions in the male mice treated neonatally with tamoxifen. *Biology of Reproduction*, 37:113-116. DOI: 10.1095/biolreprod37.1.113.
- 47) Wilson CA, Davies DC. 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction*, 133:331-359. DOI: 10.1530/REP-06-0078.
- 48) Wisniewski AB, Cernetich A, Gearhart JP, Klein SL. 2005. Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behaviour in male mice. *Physiology and Behavior*; 84:327-334. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.12.008.
- 49) Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP. 2003. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *Journal of Urology*, 169(4):1582-1586. DOI: 10.1097/01.ju.0000046780.23389.e0.
- 50) Yu-hua L, Fei D, Fen Y, Xiao-Yu Z, Hong-jie P, Yang L *et al.* 2015. Pubertal exposure to bisphenol A affects the reproduction of male mice and sex ratio of offspring. *Journal of Reproduction & Contraception*, 26(1):14-21. DOI: 10.7669/j.issn.1001-7844.2015.01.0014.

CAPÍTULO III

Efecto de una sola administración neonatal de propionato de testosterona y/o aceite de soya sobre la histomorfología del tracto reproductivo en ratas hembra adultas.

Alicia González-González¹, Everardo González-Padilla¹, Francisco Fierro², Ma. De Lourdes Juarez-Mosqueda³, Juan José Perez-Rivero⁴, María del Carmen Espejel del Moral⁵, Clara Ortega-Camarillo⁶, Marcela Vergara Onofre⁷.

¹Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán. CP. 04510. Ciudad de México.

²Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina. 19340. Del. Iztapalapa. Ciudad de México.

³Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán. CP. 04510. Ciudad de México.

⁴ ⁷Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa quietud. CP. 04960. Del. Xochimilco. Ciudad de México.

⁵ Área de Patología, Facultad de Estudios Superiores- Cuautitlán -UNAM. Carr. Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

⁶Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330. Col. Doctores. CP. 06720. Del. Cuauhtémoc. Ciudad de México.

*Autor para correspondencia: mvergara@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

Se determinó el efecto del propionato de testosterona (TP) y aceite de soya (SO), aplicados durante el período crítico de diferenciación sexual hipotalámica en ratas hembra recién nacidas, sobre la histomorfología del ovario y útero en la edad adulta. Los animales recién nacidos (1h posterior al nacimiento), se dividieron en tres grupos (n = 5 cada uno) a los que se aplicó por vía sc: grupo TP (30µg de propionato de testosterona diluido en aceite de soya (SO) comercial); grupo SO (20µl SO); y grupo control (sin ningún tratamiento). Los animales se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical a los 90 días post-tratamiento. Los ovarios y úteros se extrajeron y después de pesarlos se procesaron para evaluación histológica. Los resultados mostraron que la administración única de TP y/o SO durante el período crítico de diferenciación sexual del hipotálamo, altera de forma permanente la histomorfología útero-ovárica: con TP se incrementó significativamente el número de folículos terciarios (F3), no hubo presencia de cuerpos lúteos (CL) y se redujo el número de glándulas endometriales (GE). El SO incrementó el número de folículos primordiales (FP), secundarios (F2) y CL, además redujo el número de GE. Con TP además se incrementó el peso corporal. Este estudio reafirma que, en la rata la programación androgénica de la función reproductiva adulta ocurre durante el post-nacimiento temprano. Además, confirma que el aceite de soya puede actuar como disruptor endócrino, lo cual amerita más estudios, por tratarse de un alimento de consumo generalizado.

Palabras clave: disruptores endocrinos; propionato de testosterona; aceite de soya; diferenciación sexual del hipotálamo; morfología útero-ovario.

INTRODUCCIÓN

La testosterona tiene un papel importante en la función reproductiva de la hembra adulta. En folículos preovulatorios, esta hormona es precursor del estradiol, y actúa como un modulador directo e indirecto de la función ovárica. Sin embargo, los efectos del estradiol dependen de la etapa del desarrollo del individuo en la que actúe; de manera general este compuesto puede intervenir en dos etapas: en una fase organizacional durante el desarrollo temprano conocido como “periodo crítico” donde sus efectos son permanentes y en una fase activacional en la edad adulta, donde sus efectos son transitorios (Phoenix y col., 1959).

Durante el desarrollo de la rata macho, particularmente 2 horas después del nacimiento, en las neuronas del hipotálamo, la testosterona de origen testicular es transformada en estradiol (E₂) desencadenando el proceso de diferenciación sexual cerebral. Por el contrario, en este mismo periodo, en la rata hembra la testosterona y el estradiol son consistentemente bajos. Además, la presencia de alfa feto proteínas circulantes que se unen de manera específica al estradiol, protegen al cerebro de su efecto masculinizante (Anne y col., 2011), lo que sugiere que la feminización cerebral es un proceso pasivo.

En roedores hembras, las células germinales se desarrollan en folículos primordiales en la etapa posnatal temprana del periodo crítico, (McNeilly y col. 2000, Pepling & Spradling 2001; Pepling 2006). Al parecer es en este momento donde ocurre la programación androgénica de la función reproductiva para la vida adulta (Tyndall y col. 2012). Esta programación puede ser modificada por algunas sustancias exógenas (de origen natural o sintético) que inhiben o imitan el efecto endógeno de las hormonas esteroides sexuales y alteran el desarrollo biológico con efectos irreversibles. Estas sustancias son conocidas como disruptores endocrinos (EDCs,) (Ankley and Johnson, 2004).

La testosterona puede actuar como un EDC. La exposición inapropiada a esta hormona en la etapa posnatal temprana de la rata, puede alterar la función reproductiva en el adulto (Franks y col. 2006, Tyndall y col. 2012). Esto también se ha encontrado en ovejas (Steckler y col. 2007, Hogg y col. 2011) y primates no humanos (Abbot y col. 2009) expuestos a testosterona durante la vida fetal.

Desde 1962, los experimentos de Gorski and Barraclough demostraron que una sola dosis de TP (10µg) en el día 5 de vida causa anovulación e infertilidad en la rata adulta. Posteriormente, Brown-Grant y col., (1971) reportaron el efecto masculinizante con una dosis (100µg) al día 4 post-nacimiento. Las alteraciones más comunes en hembras, asociadas a la exposición posnatal a testosterona son: mayor ganancia de peso, ovarios poliquísticos, anovulación, inhibición de la apertura vaginal (Wolf y col., 2002, Tyndall y col., 2012), comportamiento reproductivo masculino (Phoenix y col., 1959) e infertilidad (Franks y col., 2006). Estudios más recientes realizados por Tyndall y col. (2012) para evaluar el efecto de TP en diferentes momentos, revelaron que la exposición fetal o neonatal tardía reduce el número de folículos primordiales, pero no afecta la función reproductiva ni la población de folículos totales. Los animales tratados en los días 1-21 post-nacimiento presentaron mayor peso corporal, estroma ovárico mayor, reducción del peso uterino y de la concentración del estradiol folicular, así como anovulación a los 90 días de vida. Así, la exposición a TP en la vida fetal, postnatal y postnatal tardía, incrementa peso corporal y reduce el número de folículos antrales.

Reportes de Herrera y col. 2013, señalan que una dosis subcutánea (sc) de TP (30µg), aplicada una hora después del nacimiento, modifica la expresión de algunos genes en el hipotálamo de las ratas. Por ello, se diseñó un modelo experimental con la finalidad de evaluar el nivel de expresión de 9 genes específicos dentro de las primeras seis horas después de su tratamiento a una hora post-nacimiento, con: 1) TP disuelto en SO, 2) SO y 3) grupo control. Algunos de los animales se pesaron semanalmente y se sacrificaron a los 90 días

de edad, se les extrajo el paquete útero-ovarios, los cuales se pesaron y sometieron a evaluación histomorfológica. Las alteraciones encontradas se presentan en este reporte. El propionato de testosterona y el aceite de soya administrados una hora después del nacimiento modifican las estructuras uterinas y ováricas de manera permanente. El TP inhibe la ovulación y la aparición de cuerpos lúteos, e incrementa el número de folículos terciarios. Los animales tratados solo con aceite de soya presentaron mayor número de folículos primordiales, secundarios y de cuerpos lúteos. Estos hallazgos sugieren que el aceite de soya sobre estimula el desarrollo folicular y la ovulación.

Materiales y métodos

Animales

Las ratas se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, y se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: ambiente controlado (21 °C) con ciclos invertidos de 12 h de luz-oscuridad (luces apagadas a las 4:00 AM) así como alimento (Rodent Diet 5001, LabDiet) y agua *ad libitum*.

Nueve ratas Wistar (seis hembras y tres machos) se utilizaron como reproductores. Los machos de 90 días de edad con un peso superior a 400 g y capacidad reproductiva comprobada mediante el comportamiento copulatorio, presencia de tapón seminal en las hembras después de la cópula y la confirmación de la gestación.

En las hembras (60 días de edad y más de 200g de peso) se monitoreó diariamente el ciclo estral por citología vaginal (al menos tres) para confirmar la normalidad endócrino-reproductiva. Las ratas en estro se colocaron en una jaula con un macho para permitir una primera gestación y corroborar la capacidad reproductiva. Después de la primera camada, se llevó a cabo una segunda

selección de acuerdo con el comportamiento materno. Finalmente, solo se seleccionaron ratas con ciclo estral, gestación y camadas normales, así como un comportamiento materno adecuado.

Dos semanas después del primer parto, se realizó de nuevo el seguimiento del ciclo estral y el apareamiento. El inicio de la gestación se verificó por la presencia de espermatozoides mediante citología vaginal y por la formación de tapón seminal. Las ratas gestantes se alojaron en jaulas individuales y bajo las condiciones antes descritas. Se mantuvieron en observación constante con el propósito de registrar la hora exacta del nacimiento

El tiempo de nacimiento de cada animal se consideró como hora cero. Las hembras recién nacidas se dividieron al azar en tres grupos de cinco animales cada uno. Una hora después del nacimiento se administró el tratamiento vía sc: grupo TP, recibió 30µg de TP (Sigma-Aldrich- Sigma-Aldrich Corporate Offices, 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103, USA) diluido en SO (20µL) de una marca comercial; grupo SO (20µL), y grupo control no recibió tratamiento. A las ratas tratadas se les regresó con sus madres hasta el destete (21 días) y después se alimentaron de la misma manera que los otros animales.

Toma y procesamiento de las muestras

Se llevó un registro semanal de la ganancia de peso. A los 90 días post-tratamiento las ratas se sacrificaron por dislocación cervical. Inmediatamente el tracto uterino y los ovarios fueron retirados en bloque, disecados bajo un microscopio estereoscópico, pesados y fijados en solución de Bouin (ovarios) y formalina neutra tamponada al 10% (útero) durante 24 horas. Después, para su inclusión en parafina las muestras se deshidrataron en series descendentes de alcohol etílico, se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina para realizar cortes transversales y longitudinales (cinco micras) en un micrótomo rotatorio (Leica RM2125 RT). Finalmente, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y Tricrómica

de Masson para hacer las evaluaciones morfométricas. Los cortes transversales de los cuernos uterinos y cortes longitudinales de los ovarios se observaron en un microscopio binocular con óptica plana de la marca Optisum.

Evaluación morfológica

Se digitalizaron secciones transversales de los cuernos uterinos para su análisis en campos de amplificación de 10X (miometrio y endometrio) y 40X (glándulas endometriales). Las secciones longitudinales del ovario se digitalizaron en campos de amplificación de 40X para folículos primordiales (FP) y folículos primarios (F1), 20X para folículos secundarios (F2), 10X para folículos terciarios (F3) y cuerpos lúteos (CL), y 40X para ovocitos preovulorios (OP). Las mediciones se realizaron a partir de las secciones digitalizadas con el software LSM5 (Carl Zeiss, Alemania) utilizando las herramientas de marcado. La clasificación morfológica de los folículos se realizó por el método de Myers y col. (2004). Todas las laminillas se analizaron por tres morfólogos veterinarios y los resultados se promediaron.

Análisis estadístico

Mediante la prueba de Shapiro Wilks se determinó la normalidad de los datos en los diferentes parámetros estudiados. Según la distribución de los datos, estos se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis (morfometría) o con ANOVA (peso corporal y peso del útero y ovarios). Los resultados se expresan como valores promedio \pm EE (error estándar) y valores promedio \pm DE (desviación estándar) respectivamente. Los valores del peso corporal y de los órganos del tracto reproductor en estudio se obtuvieron de 5 animales por grupo; de cada sujeto experimental se tomaron al azar 6 laminillas de útero y 6 de ovarios (3 de cada ovario); y de cada laminilla de ovario se observaron 5 campos microscópicos. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el Software PAST

(Paleontological Statistics)- Paquete para Educación y Análisis de Datos (Huang y col., 2013).

RESULTADOS

Análisis biométrico cuantitativo

El promedio del peso corporal y del tracto útero-ovárico a los 90 días post-tratamiento se muestran en el Cuadro 1. El peso corporal a los 90 días fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los animales tratados con TP en comparación con el grupo control y SO. Sin embargo, el peso del tracto útero-ovárico fue significativamente más alto en los animales tratados solo con SO.

Cuadro 1. Peso del tracto útero-ovárico de ratas a 90 días de edad.

Característica	Control	SO	TP
Peso corporal (g)	268±19.5 ^a	255±5.7 ^a	326±28.5 ^b
Tracto útero-ovarios (g)	0.49±0.2 ^a	1.10±0.4 ^b	0.46±0.1 ^a

Promedio ± DE del peso corporal y del tracto útero-ovárico. Superíndice distinto en cada línea indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

En el cuadro 2 se muestran los resultados del conteo de estructuras ováricas y uterinas. En el caso del grupo tratado con SO se encontró significativamente un mayor número de folículos primordiales ($P=0.01$) y folículos secundarios ($P=0.02$) en comparación con los otros dos grupos. El grupo tratado con TP presentó mayor número de F3 ($P < 0.05$) que el grupo control y SO. Respecto a cuerpos lúteos, en el grupo tratado con SO se encontró un mayor número ($P=0.03$) y en el grupo con TP no se encontró ninguno. El número de glándulas endometriales se redujo significativamente ($P < 0.05$) en los animales tratados con SO y más aún en los tratados con TP.

En el cuadro 3 se muestran los resultados de la morfometría de las estructuras ováricas. En el grupo tratado con TP se encontró una reducción significativa en el diámetro de folículos primarios comparado con el grupo control y el tratado con SO. El diámetro de folículos secundarios aumentó significativamente en ambos grupos tratados. Sin embargo, solo en el grupo tratado con TP aumentó significativamente el diámetro de los folículos terciarios. El cuerpo lúteo, presentó un diámetro mayor en los animales tratados con SO, mientras que en los tratados con TP no presentaron CL's.

Respecto al área total de las estructuras evaluadas, los folículos terciarios del grupo con TP, los cuerpos lúteos del grupo con SO y los ovocitos preovulatorios en los grupos tratados (con SO y/o TP) presentaron un área significativamente mayor.

Cuadro 2. Conteo de estructuras ováricas y uterinas de ratas a los 90 días de edad.

Característica	Control	SO	TP
Folículo primordial	9.0±1.0 ^a	14.6±0.6 ^b	12.0±5.0 ^a
Folículo primario	17.1±2.4 ^a	21.5±3.2 ^a	11.7±2.0 ^a
Folículo secundario	15.3±1.8 ^a	24.6±2.3 ^b	16.3±4.7 ^a
Folículo terciario	4.5±0.3 ^a	5.2±1.2 ^a	11.5±2 ^b
Cuerpo lúteo	9.3±1.3 ^a	15.0±1.2 ^b	0.0±0.0 ^c
Glándula endometrial	63.0±2.0 ^a	36.3±2.8 ^b	19.0±2.7 ^c

El superíndice distinto en cada línea indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 3. Morfometría en el ovario de rata a los 90 días de edad.

Característica	Diámetro (mm)			Área (mm ²)		
	Control	SO	TP	Control	SO	TP
Folículo primordial	0.087±0.004 ^a	0.079±0.006 ^a	0.084±0.005 ^a	5.877±0.421 ^a	5.379±0.781 ^a	5.381±0.534 ^a
Folículo primario	0.198±0.012 ^a	0.195±0.025 ^a	0.139±0.014 ^b	29.89±15.233 ^a	34.197±14.189 ^a	18.479±4.180 ^a
Folículo secundario	0.697±0.047 ^a	0.897±0.072 ^b	0.949±0.012 ^b	268.559±38.525 ^a	368.816±57.954 ^a	403.698±65.203 ^a
Folículo terciario	1.145±0.085 ^a	1.210±0.136 ^a	1.750±0.406 ^b	1015.380±289.507 ^a	690.826±141.081 ^a	1371.060±112.896 ^b
Cuerpo lúteo	1.193±0.108 ^a	1.931±0.088 ^b	0.0±0.0 ^c	688.453±80.106 ^a	1216.360±92.124 ^b	0.0±0.0 ^{c*}
Ovocito preovulatorio	0.280±0.015 ^a	0.316±0.094 ^a	0.290±0.012 ^a	52.782±7.303 ^a	100.634±64.958 ^b	94.565±17.659 ^b

El superíndice distinto en cada línea indica diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

En el cuadro 4 se muestran los resultados promedio \pm EE de la morfometría en el tracto uterino. En el caso del grupo tratado con SO se encontró una reducción en el espesor del endometrio y miometrio ($P <0.05$). El grupo tratado con TP presentó un incremento en el grosor del perimetrio y en el diámetro de las glándulas endometriales.

En el cuadro 5 se presenta el área del lumen uterino, que fue mayor en el grupo tratado con TP y aún más en el tratado con SO en comparación con el grupo control.

Cuadro 4. Morfometría del tracto uterino en ratas a los 90 días de edad.

Característica	Grosor (mm)		
	Control	SO	TP
Endometrio	0.362 \pm 0.032 ^a	0.148 \pm 0.007 ^b	0.297 \pm 0.019 ^a
Miometrio	0.106 \pm 0.008 ^a	0.055 \pm 0.006 ^b	0.119 \pm 0.005 ^a
Perimetrio	0.054 \pm 0.005 ^a	0.043 \pm 0.006 ^a	0.082 \pm 0.004 ^b
Glándulas endometriales	0.263 \pm 0.015 ^a	0.295 \pm 0.017 ^a	0.487 \pm 0.033 ^b

El superíndice distinto en cada línea indica diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Cuadro 5. Área del lumen uterino de ratas a los 90 días de edad.

	Área (mm ²)		
	Control	SO	TP
Lumen uterino	56.97 \pm 3.55 ^a	1200.13 \pm 175.57 ^c	85.56 \pm 15.43 ^b

El superíndice distinto en cada línea indica diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Análisis de estructuras histomorfológicas por grupo

En el grupo control, 2 de los 5 animales se encontraban en la fase folicular del ciclo estral al momento del sacrificio. En estos animales se observó un endometrio en fase proliferativa con epitelio simple cuboide y algunas zonas simples columnar. Las glándulas uterinas se encontraron agrupadas en forma de nidos

con un epitelio íntegro y presentaron lumen estrecho y fibrosis periglandular (con predominancia de fibroblastos). En los ovarios se observaron folículos en desarrollo y cuerpos lúteos con células luteínicas de la granulosa vacuoladas. En algunos CL's se observó proliferación del tejido conectivo en el centro y otros se encontraron degenerados.

Otros 3 animales del grupo control se encontraron en fase lútea al sacrificio. En ellos se observó un endometrio en fase de secreción, con un epitelio luminal simple columnar con zonas estratificadas columnares, vacuolas intracitoplasmáticas y algunas células degeneradas. Las glándulas uterinas se encontraron con epitelio simple cuboide sin alteraciones en la morfología epitelial y lumen estrecho, además de estar rodeadas por varias capas de fibroblastos. En el estrato compacto se observó un leve infiltrado multifocal de neutrófilos. En 2 de estos animales los ovarios presentaron folículos pequeños, pero cuerpos lúteos más evidentes, y sólo en uno se encontró predominantes CL's desarrollados.

En el grupo tratado solo con aceite de soya se encontró un epitelio simple cuboide en el endometrio y glándulas uterinas, con características de una fase luteínica. Las glándulas se encontraron rodeadas por capas de fibroblastos y con infiltrado leve de linfocitos. En los ovarios se observaron de forma predominante cuerpos lúteos y algunos folículos en desarrollo. Tres de los cinco animales presentaron un útero distendido con un endometrio poco desarrollado y un epitelio simple columnar, simple cuboidal y algunas zonas con epitelio estratificado columnar vacuolado. En estos animales se observó una reducción del número de glándulas y además con evidencia de necrosis. Algunas glándulas se encontraron rodeadas por fibroblastos sin daño en el epitelio. En el estroma se observó infiltrado leve de neutrófilos, así como una edematización leve. En el ovario, se encontraron predominantes cuerpos lúteos con desarrollo de tejido fibroso en el centro y también cavidades de fluido eosinófilo y folículos en desarrollo.

En el grupo tratado con TP se encontró un epitelio endometrial estratificado columnar con células en degeneración. En el endometrio se observó un infiltrado linfocitario difuso leve. Las glándulas presentaron un epitelio simple columnar, con aspecto de estar en fase secretoria. Tres de cinco individuos presentaron áreas con metaplasia escamosa del útero. Fue evidente la reducción en el número de glándulas uterinas, con un epitelio estratificado columnar y un lumen muy grande. En este grupo no hubo apertura vaginal a los 90 días.

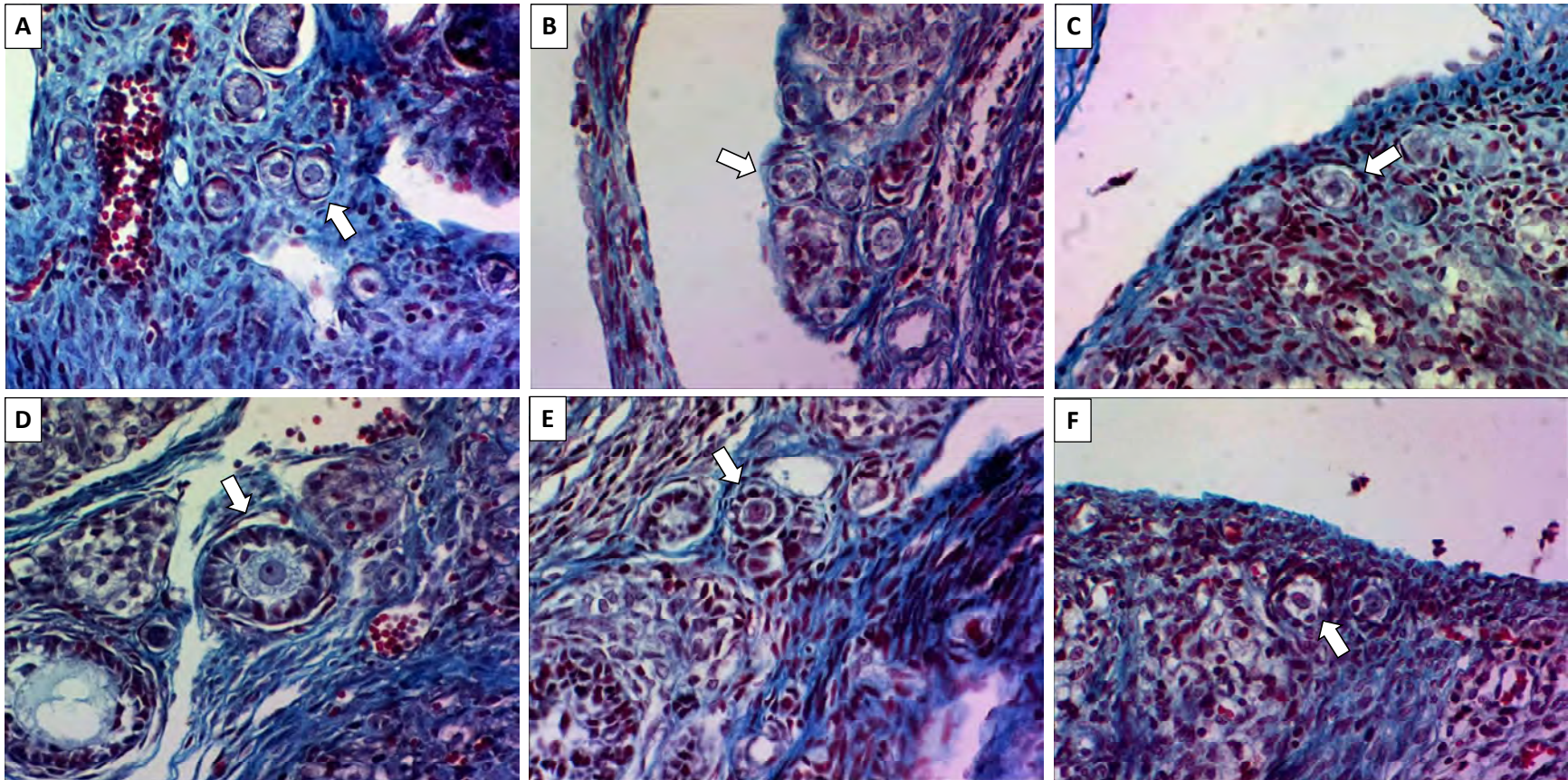


Figura 1. Folículos primordiales y primarios. Cortes histológicos con tinción Tricrómica de Masson. Ovarios colectados del grupo control (A y D), tratado con SO (B y E) y con TP (C y F), objetivo 400X. Se pueden observar las alteraciones histológicas inducidas por los tratamientos con TP y/o SO. Las flechas en los paneles A, B y C señalan folículos primordiales y en los paneles D, E y F señalan folículos primarios.

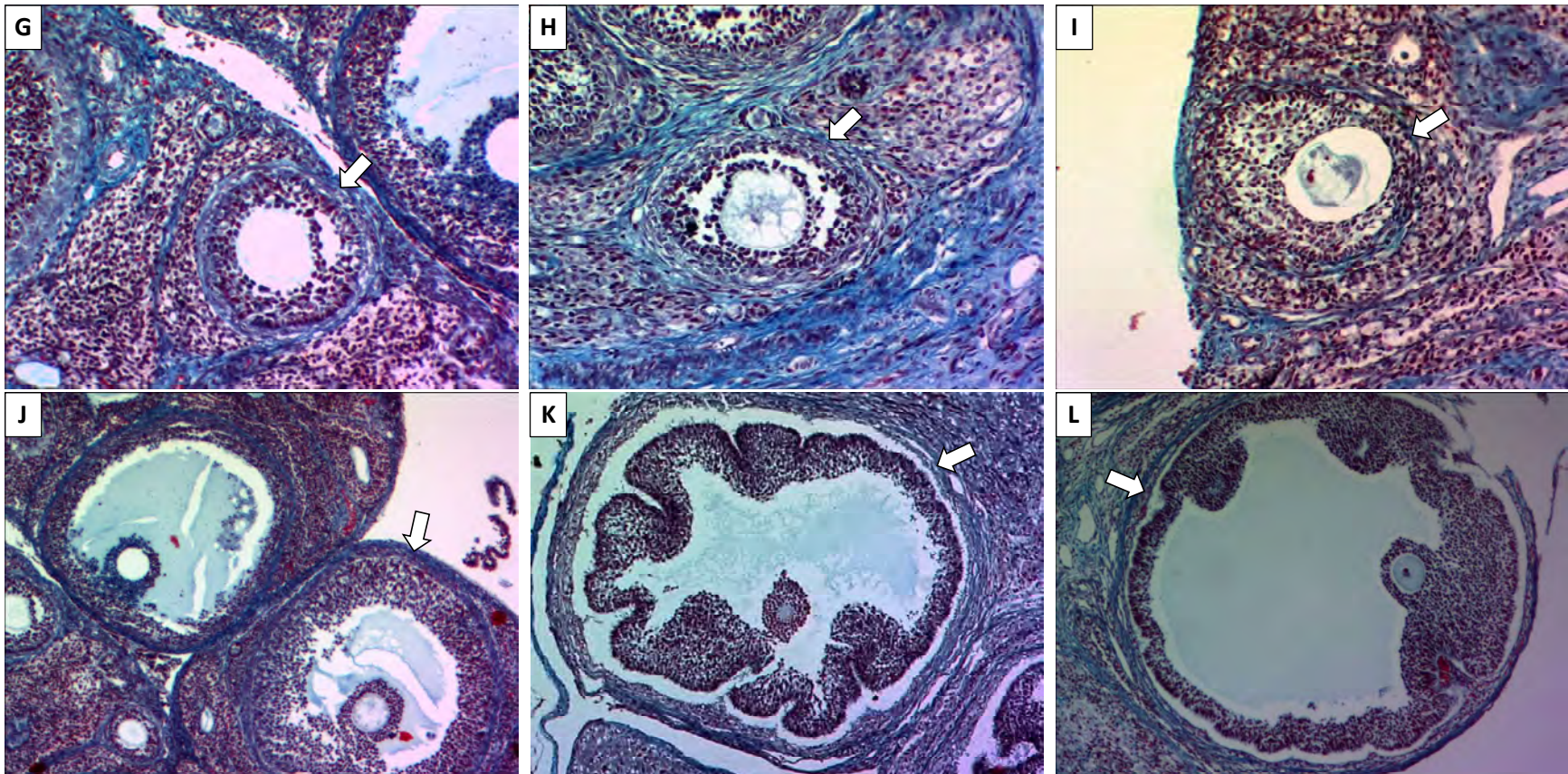


Figura 2. Folículos secundarios y terciarios. Cortes histológicos de ovarios con tinción Tricrómica de Masson. Grupo control (G y J), tratado con SO (H y K) y con TP (I y L). G, H e I a 200X. J, K y L a 100X. Se pueden observar las alteraciones histológicas inducidas por los tratamientos con TP y/o SO. Las flechas en los paneles G, H e I señalan folículos secundarios y en los paneles J, K y L señalan folículos terciarios.

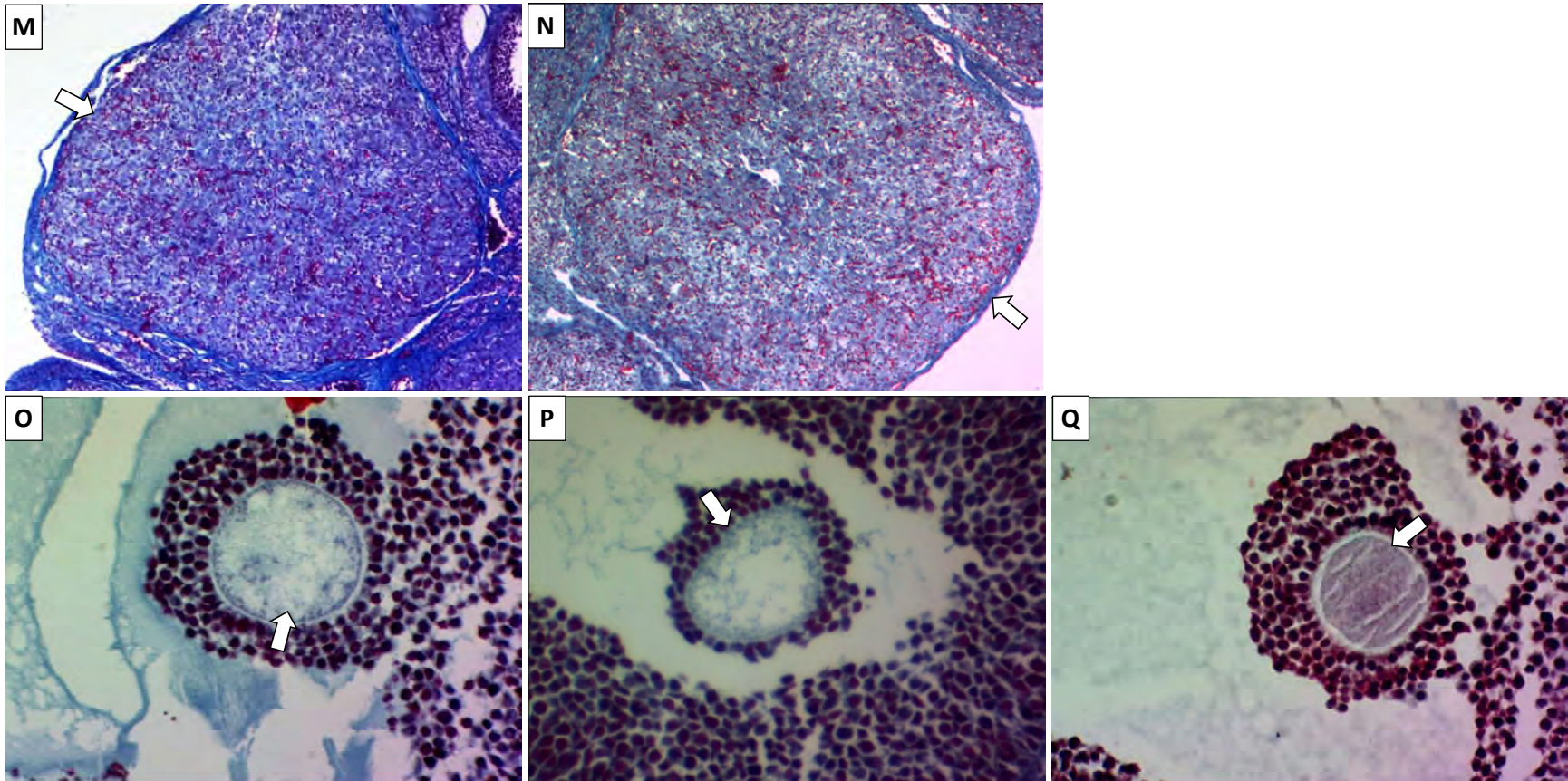


Figura 3. Cuerpo Lúteo y ovocitos preovulatorios. Cortes histológicos de ovario con tinción Tricrómica de Masson. Grupo control (M y O), tratado con SO (N y P) y con TP (Q). M y N a 100X. O, P y Q a 400X. Se pueden observar las alteraciones histológicas inducidas por los tratamientos con TP y/o SO. Las flechas en los paneles M y N indican Cuerpo Lúteo. Las flechas en los paneles O, P y Q indican ovocito preovulatorio.

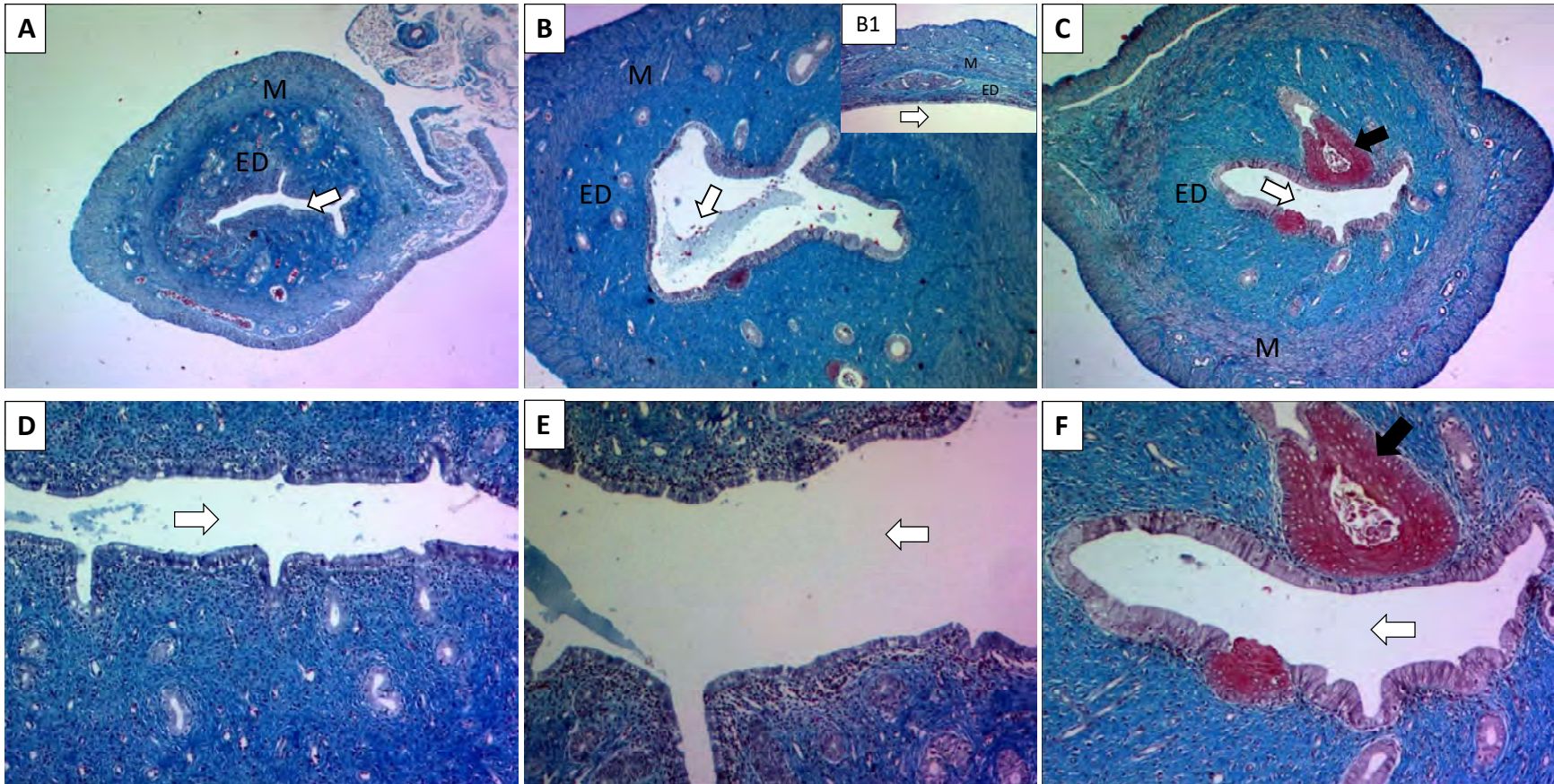


Figura 4. Útero. Cortes histológicos de útero con tinción Tricrómica de Masson. Grupo control (A y D), tratado con SO (B y E) y con TP (C y F). A, B, B1 y C a 100X. D, E y F a 400X. Se pueden observar las alteraciones histológicas inducidas por los tratamientos con TP y/o SO. Estas fotos muestran el tejido endometrial (ED), el tejido miometrial (M) y el lumen (señalado con la flecha blanca) del útero. La flecha negra señala metaplasia escamosa.

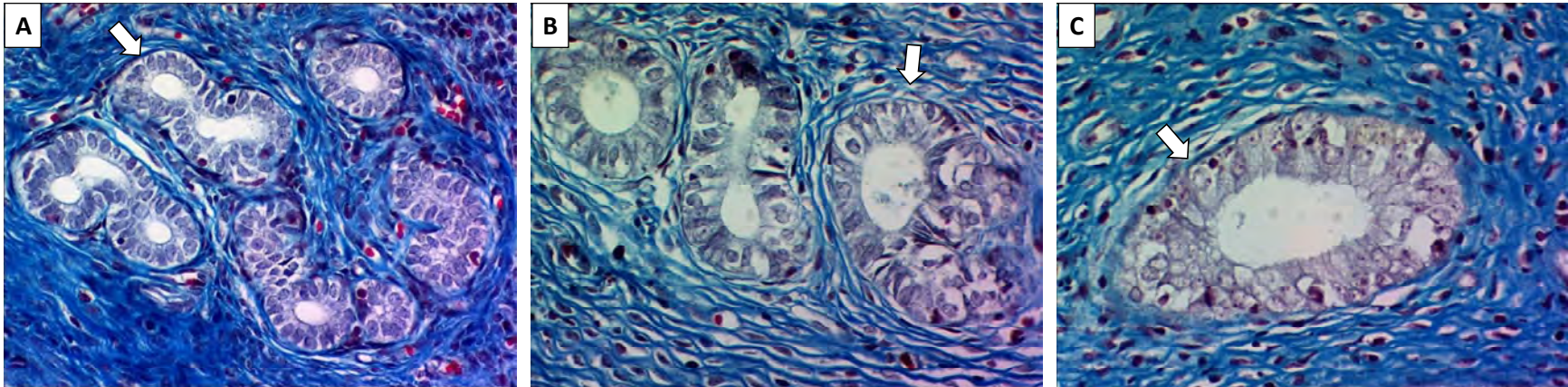


Figura 5. Glándulas uterinas. Cortes histológicos de útero con tinción Tricrómica de Masson. Grupo control (A), tratado con SO (B) y con TP (C) a 400X. Se pueden observar las alteraciones histológicas inducidas por los tratamientos con TP y/o SO. Las flechas señalan las glándulas uterinas.

Discusión

Los resultados indican que, durante el periodo crítico de la diferenciación sexual cerebral una sola dosis de TP y/o SO modifica permanentemente la histomorfología ovárica y uterina, además del peso corporal (TP).

Los animales tratados con TP, a los 90 días exhibieron mayor peso corporal. Esto ha sido reportado previamente por Tyndall y col. (2012), quienes además observaron un mayor peso uterino en ratas, atribuyéndolo al efecto estrogénico por la aromatización de testosterona. En este estudio, solo en el grupo tratado con aceite de soya el peso uterino fue superior al grupo control y al tratado con TP.

Hasta el momento no existe información sobre el efecto del aceite de soya en la reproducción animal. Sin embargo, algunos reportes han señalado los efectos de la proteína de soya en algunos modelos animales. En 2004, Cline y col., reportaron endometritis y alteraciones características de estimulación estrogénica como: alargamiento uterino, queratinización del epitelio vaginal, incremento en la altura del endometrio y metaplasia escamosa, en ratonas ovariectomizadas de 6 semanas de edad, con dietas adicionadas con isoflavonas de soya (genisteína:daidzeína; relación 2:1, 40mg/kg) durante 16 semanas. Nuestros resultados demuestran que una sola dosis sc de aceite de soya (20µl) aplicado a 1 hora post-nacimiento genera algunos cambios similares en el útero de la rata. A pesar de que no se analizó la composición del aceite, se sabe que la soya y sus derivados son una fuente rica de isoflavonas, que pueden unirse y activar a los receptores a estrógenos, principalmente los receptores β (Kuiper y col., 1996). Posiblemente estos receptores fueron activados a nivel cerebral, provocando cambios en los núcleos hipotalámicos y por lo tanto en la secreción normal de gonadotropinas, modificando en la edad adulta el desarrollo folicular y la consecuente estimulación sobre el útero. Los hallazgos importantes en este grupo fueron la dilatación uterina, adelgazamiento (figura B1) del endometrio y atrofia de sus glándulas (figura 5). Aunque estos dos últimos datos no concuerdan con lo

reportado en el trabajo de Cline y col. 2004) y sólo el grupo tratado con TP presentó metaplasia escamosa.

Como se mencionó con anterioridad, durante el desarrollo folicular la testosterona es un precursor del E₂. Sin embargo, durante el periodo crítico de diferenciación sexual cerebral, esta hormona puede tener efectos adversos sobre la reproducción. Varios investigadores han reportado que una sola dosis de testosterona o E₂ administrada al primer día después del nacimiento genera síndrome de ovario poliquístico en los animales adultos (Barracough, 1961; Brawer y col., 1978; Alexanderson y col., 2007) e inhibición de la concepción (Ohta y col. 2012) además de un aumento de la tasa de apareamiento en hembras tratadas con dietilestilbestrol (5µg/kg) y reducción en el tamaño de la camada con una dosis baja (0.5µg/kg), a partir de la segunda gestación, lo que ha sugerido una menopausia temprana en estos animales.

En los ovarios del grupo tratado con TP, la presencia de folículos antrales con apariencia quística, desprendimientos importantes de células de la granulosa (CG) y antro folicular de mayor tamaño, denotan la falta del estímulo gonadotrópico para concluir con el proceso de ovulación. La disrupción en la secreción normal de gonadotropinas y por lo tanto en la producción de estradiol, causado por el control hipotalámico inadecuado debido al tratamiento, podría explicar el mayor número de folículos antrales, la ausencia de ovulación y por lo tanto de CLs.

En roedores recién nacidos, los ovocitos presentes en los "nidos" se rodean de células somáticas precursoras de células de la granulosa constituyendo los folículos primordiales (Peters y col. 1975; Cran y col. 1980; Hirshfield, 1991; Rajah y col., 1992), los cuales determinan la vida reproductiva de una hembra (Hirshfield, 1994). En este proceso una gran cantidad de ovocitos mueren por apoptosis y las células somáticas se mueven e intercalan entre los ovocitos restantes (Morita and Tilly, 1999; Pepling and Spradling 2001). Aunque algunos

estudios han sugerido que el grupo de folículos primordiales es definido y finito (Hirshfield, 1994), otros (Bristol-Gould y col., 2006) han demostrado la posibilidad de inducir *in vitro* el ensamble de folículos primordiales mediante factores de crecimiento como el CTGF-factor de crecimiento de tejido conectivo-(Schindler y col., 2010) o inhibir el índice apoptótico de los ovocitos (con el uso de progesterona) y con ello favorecer el mantenimiento del pool de folículos primordiales, siendo cruciales los primeros tres días post-nacimiento para este proceso en la rata (Rajah y col, 1992).

Otro experimento realizado en ratones por Bristol-Gould y col., 2006 reportó un incremento (30%) transitorio en la población de folículos primordiales con el uso de activina A, que se normaliza con el inicio de la pubertad. Sin embargo, en este trabajo el efecto permanece aún en la edad adulta.

Aunque aún hay controversia sobre el momento del establecimiento de los folículos primordiales en el ovario, en los animales tratados sólo con aceite de soya se encontró un número mayor de estos folículos. No obstante, hacen falta más estudios para identificar los mecanismos por lo que esto ocurre y las implicaciones sobre la reproducción animal. Toda vez que el número de folículos secundarios también fue mayor, lo que podría suponer sobre estimulación en el desarrollo folicular en una etapa independiente de gonadotropinas, además de persistencia de cuerpos lúteos.

Los folículos primordiales inician su desarrollo gradualmente con el objetivo de llegar a la ovulación, aunque la gran mayoría sufre atresia. En humanos cuando la reserva de folículos se agota, se entra en menopausia (Richardson y col., 1987; Faddy y col., 1992). Posiblemente la sobreestimulación durante el reclutamiento folicular reduzca la vida reproductiva de las hembras al agotarse las reservas de folículos primordiales. Esta posibilidad debe ser explorada.

Los receptores a andrógenos (ARs) se encuentran en el ovocito, en células de la granulosa y células de la teca, principalmente de folículos pequeños. Su expresión se regula a la baja por la hormona estimulante de los folículos (FSH) y por la hormona luteinizante (LH) durante el desarrollo folicular (Drumond y col. 2006, Walters y col 2008, Tyndall y col. 2012). La FSH estimula la proliferación de células de la granulosa, la conversión de andrógenos a estrógenos y la expresión de receptores a LH (Midgley, 1973; Dorrington y col., 1975). La inhibina secretada por las CG inhibe la secreción de FSH (Matzuk y col., 1992). En los folículos dominantes, la LH estimula la producción de andrógenos en las células de la teca. El pico preovulatorio de LH induce los cambios necesarios para la ovulación. Posteriormente, una vez que se libera el ovocito, las células de la granulosa restantes entran en proceso de luteinización para formar el cuerpo lúteo, un órgano altamente vascularizado cuya finalidad es la producción de progesterona.

La ausencia de ARs reduce el número de folículos antrales e incrementa el índice apoptótico en CG (Hu y col. 2004, Shiina y col. 2006), por lo que reduce la fertilidad (Sen & Hammes, 2010). Por otro lado, el exceso de andrógenos genera mayor cantidad de folículos atrésicos y bajos índices de fertilización y desarrollo de los ovocitos (Billing y col. 2003). En este trabajo solo en los animales tratados con TP se encontró un mayor número de folículos antrales. Sin embargo, tanto en los tratados con SO como con TP estos folículos presentaron desprendimientos de CG, un indicador de atresia. Es posible que los receptores a andrógenos hayan sido afectados debido a los tratamientos.

Datos reportados por Wolf y col. (2002) indican que los tratamientos con TP reducen el orificio vaginal. Sin embargo, Tyndall y col. (2012) señalaron que esta hormona induce apertura vaginal temprana en ratas Sprague Dawley. En nuestro estudio, las ratas tratadas con TP a los 90 días no exhibieron apertura vaginal.

Conclusión

En la rata, la administración única de TP y/o SO 1 hora post-nacimiento es capaz de alterar la histomorfología ovárica y uterina en la edad adulta. Debido probablemente a la alta sensibilidad a la acción de los esteroides sexuales durante el período crítico de diferenciación sexual cerebral. Debido al uso común del aceite de soya tanto en la alimentación humana como en la de los animales, se recomienda continuar investigando al respecto, ya que esto podría tener repercusiones en la actividad reproductiva.

Financiamiento

Trabajo parcialmente financiado por CONACYT proyecto 0105961-M, ANUIES-ECOS-CONACYT proyecto M10-A02. Beca escolar CONACYT 201677 a C.C.

Declaración de conflicto de interés

Todos los autores de esta investigación declaran que no hay conflicto de ningún tipo.

Referencias

Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA. 2009. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *American Journal of Primatology*, 71:776-784. (doi: 10.1002/ajp.20679).

Alexanderso C, Erikson E, Stener-Victorin E, Lystig T, Gabrielsson B, Lonn M & Holmang A. 2007. Postnatal testosterone exposure results in insulin resistance enlarged mesenteric adipocytes, and atherogenic lipid profile in adult female rats: comparisons with estradiol and dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 148:5369-5376. (doi:10.1210/en.2007-0305).

Anne T, Konkle M, Margaret M. McCarthy M. 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*, 152:223-235.

Barraclough CA. 1961. Production of anovulatory, sterile rats by a single injections of testosterone propionate. *Endocrinology*, 68: 62-67. (doi: 10.1210/endo-68-1-62).

Billig H, Furuta I & Hsueh AJ. 2003. Oestrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinol*, 133(5):2204-12 DOI: 10.1210/en.133.5.2204

Brawer JR, Naftolin F, Martin J & Sonnenschein C. 1978. Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. *Endocrinol*, 103: 501-512. (doi: 10.1210/endo-103-2-501).

Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, y col. 2006. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developl Biology*, 298: 132–148.

Brown-Grant K, Munck A, Naftolin F and Sherwood MR. 1971. The effects of the Administration of Testosterone Propionate Alone or with Phenobarbitone and of Testosterone Metabolites to Neonatal Female Rats. *Hormones and Behavior*, 2: 173-182.

Cline J M, Franke AA, Register TC, Golden DL and Adams MR. 2004. Effects of Dietary Isoflavone Aglycones on the Reproductive Tract of Male and Female Mice. *Toxicologic Pathology*, 32:91–99, 2004.

Cran DG, Moor RM. 1980. The development of oocytes and ovarian follicles of mammals. *Science Progress*, 66: 371–383. 5.

Dorrington JH, Moon YS, Amstrong DT. 1975. Estradiol 17beta biosynthesis in culture granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 97:1328-1331.

Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4:16-26. DOI: 10.1186/1477-7827-4-16.

Faddy M, Gosden R, Gougeon A, Richardson S, Nelson J (1992) Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*. 7:1342–1346.

Franks S, McCarthy MI & Hardy K. 2006. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *International Journal of Andrology*, 28: 278-285 DOI: 10.1111/j.1365-2605.2005.00623.x

Gorski RA, Barraclough CA. 1962. Effects of low dosages of androgen on the differentiation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. *Endocrinology*, 73: 210-6. PMID 14076200 DOI: 10.1210/endo-73-2-210

Herrera GH, Rosado GA, Vergara OM, Salcedo VM, Miliar GA, Heuze de IY y col. 2013. Genetic expression associated to cell cycle, apoptosis, synaptogenesis and cell differentiation during sex differentiation in rats. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(3):289-304. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v4n3/v4n3a3.pdf> [consulta: 15 jun 2016].

Hirshfield A. 1994. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biology of Reproduction*, 50: 421–428.

Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124: 43–101. 6.

Hogg K, Alan S. McNeilly, and W. Colin Duncan. 2011. Prenatal Androgen Exposure Leads to Alterations in Gene and Protein Expression in the Ovine Fetal Ovary. *Endocrinology*, 152 2048-2059. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-1219>

Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao HT, Tsai MY & Chang C. 2004. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *PNAS*, 101(31)11209–11214. Doi: 10.1073/pnas.0404372101

Huang B, Harper DAT, Hammer O. 2013. Introduction to PAST, A Comprehensive Statistics Software Package for Paleontological Data Analysis [PDF]. *Acta Paleontologica Sinica*, 52(2):181. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf [consulta: 15 jun 2016].

Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe H, Van der Saag PT, Van der Burg B and Gustafsson JA. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptors β . *Endocrinology*, 139:863-870.

Matzuk MM, Finegold MJ, Su J-GJ, Hsueh AJW, Bradley A. α inhibin is a tumor-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*, 360:3313-319.

McNeilly JR , Saunders PT , Taggart M , Cranfield M , Cooke HJ , McNeilly AS. 2000. Loss of oocytes in Dazl knockout mice results in maintained ovarian steroidogenic function but altered gonadotropin secretion in adult animals. *Endocrinology*, 141(11):4284-4294. DOI: 10.1210/en.141.11.4284

Midgley AR. 1973. Autoradiographic analysis of gonadotropin binding to rat ovarian tissue sections. *Advance in Experimental Medicine and Biology*, 36:365-378.

Morita Y, Tilly JL. 1999. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology*, 213:1-17.

Myers M, Britt KL, Wreford NGM, Ebling FJP and Kerr. JB. 2004. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127: 569–580.

Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata T, Ono H. 2012. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low -dose diethylstilbestrol. *Reproductive toxicology*, 34: 323-330.

Pepling ME and Spradling AC. 2001. Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Developmental Biology*, 234 339-351. DOI: 10.1006/dbio.2001.0269

Pepling ME. 2006. From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development. *Genesis*, 44 622-632. DOI: 10.1002/dvg. 20258

Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M. 1975. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 45: 559–566. 4.

Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, 65(3):369-382. DOI:10.1016/j.yhbeh.2009.01.004.

Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. 1992. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Developmental Dynamics*, 194: 177–192.

Richardson S, Senikas V, Nelson J. 1987. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 65: 1231–1237. 18.

Schindler R, Nilsson E, Skinner ME. 2010. Induction of Ovarian Primordial Follicle Assembly by Connective Tissue Growth Factor CTGF. *PLoS ONE*, 5(9): e12979. doi:10.1371/journal.pone.0012979

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D; Chambon P, Kanno Jun, Yoshikawa H, Kato Shigeaki. 2006. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *PNAS*, 103 (1) 224–229. Doi:10.1073/pnas.0506736102

Steckler T, Manikkam M, Inskeep EK, Padmanabhan V. 2007. Developmental programming: follicular persistence in prenatal testosterone-treated sheep is not programmed by androgenic actions of testosterone. *Endocrinology*, 148(7):3532-40. DOI: 10.1210/en.2007-0339.

Tyndall V, Boyde M, Sharpe R, Welsh M, Drake AJ, McNeilly. 2012. Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepuberal and adult rats. *Reproduction*, 143:21-33.

Walter KA, Allan CM & Handelsman DJ. 2008. Androgen action and the ovary. *Biology of Reproduction*, 78:380-389. (doi:10.1095/biolreprod.107.0640899.

Wolf CJ, Hotchkis A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray EJ. 2002. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: A dose-response study. *Toxicological Sciences*, 65:71-86.

Ankley GT, Johnson RD. 2004. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal* 45: 469-483. [Doi.org/10.1093/ilar.45.4.469](https://doi.org/10.1093/ilar.45.4.469).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL

Este trabajo documenta por primera vez la temporalidad en la expresión de genes hipotalámicos en las primeras 7 horas posteriores al nacimiento, y los cambios que ocurren cuando se modifica el ambiente hormonal, así como las alteraciones irreversibles en la función y la histomorfología gonadal y uterina de ratas adultas, causados por el tratamiento agudo único de tamoxifeno, propionato de testosterona y/o aceite de soya, una hora después del nacimiento de las ratas. Estos cambios pueden estar asociados con la interrupción del curso normal de la diferenciación sexual del hipotálamo debido probablemente a la alta sensibilidad a la acción de los esteroides sexuales durante el llamado periodo crítico de este proceso.

En la rata el estradiol desencadena el proceso de masculinización del área preóptica a través de diferentes mecanismos como sinaptogénesis, supervivencia o muerte celular y neuroprotección. El área preóptica (POA) presenta la expresión más importante para la masculinización. Los niveles altos de expresión en el receptor de estrógeno (*Ers1*) se relaciona con la idea dominante de que en el cerebro la masculinización es inducida por el estradiol (McCarthy., 2010) y los genes que están relacionados con la neuroprotección, como resulta con *Cyp19a1*, *Bcl2* y *G6pd* en los machos.

En el caso de las hembras, los mecanismos neuroprotectores no se encuentran tan elevados al inicio de la hora postratamiento, en el periodo más sensible, dando expresiones relativamente bajas en los genes relacionados con neuroprotección, si consideramos que del núcleo ventromedial, podrían morir a consecuencia de una disminución de estradiol o bien modular la sobrevivencia debido a la falta de estradiol (McCarthy., 2010).

En el caso del núcleo preóptico medial en machos que presentan casi el doble de espinas dendríticas que el de las hembras, en donde se involucra distintos mecanismos, siendo de los más importantes donde la participación del estradiol previene la apoptosis, ocasionado que los machos tengan tres veces más neuronas que hembras (Davis y col., 1996). La muerte celular en las hembras es a través de la vía clásica de la relación de BAX/caspasa-3, ocasionando la muerte celular apoptótica y en caso contrario la presencia de mayor expresión en los niveles de Bcl2 en machos los protegen, sin embargo, el mecanismo de cómo BAX y Bcl2 son regulados aun no es claro (McCarthy, 2010).

Se sabe que la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis se puede iniciar por eventos que se localizan en el interior celular y que pueden provocar en la mitocondria la liberación del citocromo c y de otras moléculas pro-apoptóticas del espacio intermembranal, a pesar de eso, la liberación del citocromo c es ocasionada por la formación del "poro de transición de permeabilidad mitocondrial" (MPTP), que se forma por la interacción entre: un transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en membrana mitocondrial interna, un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana mitocondrial externa (MME) y con la participación de las moléculas denominadas Bax y Bak, aunque también se sabe que participan en la formación de MPTP y para la apoptosis, que se puede ver inducida por los receptores de la muerte con su ligando a nivel transmembranales que serían los receptores de Fas (CD95), TNFR y los receptores de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF), que tienen un dominio de muerte (DD) en la cola citoplásmica. La señalización de dichos receptores puede ser simplificada como la unión del receptor con su respectivo ligando que estimula el reclutamiento de una molécula adaptadora FADD (dominio de la muerte asociado a Fas) o TRADD (dominio de la muerte asociado a TNFR). Dichos adaptadores poseen un dominio DED y uno DD, lo cual le permite unirse al receptor de la muerte por un lado, y por otro a una caspasa iniciadora que contiene un homólogo DED, para el proceso actuar proteínas anti-

apoptóticas que son denominadas FLIP (proteínas inhibidoras de FLICE:enzima convertidora de interleucina-1 β tipo FADD), siendo su principal función la inhibición de la activación de la procaspasa-8 al competir por FADD, ya que estas proteínas también contienen un dominio DED, lo que habla de la temporalidad de los eventos, y de las interacciones que pueden estar asociadas con los factores de estrés, por lo que el comportamiento diferente entre machos y hembras (Figura 3) nos habla de la variabilidad de respuesta de los animales testigos, vehiculo y tratados.

Se ha visto que en condiciones fisiológicas normales, ciertas proteínas de interés han sido implicadas las involucradas en la conversión del araquidonato a la prostaglandina H2 (PGH2), que resulta ser un paso involucrado en la síntesis de prostanoides, que se ha visto expresado de manera constitutiva en tejidos en condiciones fisiológicas, como son: el riñón, endotelio y el cerebro pero en condiciones adversas en patologías como en el cáncer el PTGS2 es un paso clave en la producción de prostaglandina E2 (PGE2), que juega un papel importante en la modulación de la motilidad, la proliferación y la resistencia a la apoptosis. Si bien es cierto que las PTGS2 son responsables de la producción de prostaglandinas inflamatorias, la regulación positiva de está asociada también con un incremento en la adhesión celular, cambios fenotípicos, resistencia a la apoptosis y angiogénesis tumoral (Sostres y col., 2014).

Dentro de los mecanismo de neuroprotección, que se establece como consecuencia del estrés oxidativo mediado a través de especies oxigenadas endógenas y alteraciones por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, se ha establecido que la formación de Especies reactivas del oxígeno (ROS), incluyendo superóxido ($O_2 \cdot^-$), hidrógeno Peróxido (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($HO \cdot$), se establecen en condiciones fisiológicas normales y es aumentada por algunos xenobióticos. La Glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) como enzima citoplasmática, cataliza el primer paso en el derivado de hexafosfato

monofosfato, también conocido como la vía pentosa fosfato. El producto final de esta vía, la ribosa- 5-fosfato, es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y por lo tanto es esencial para el crecimiento celular. Durante la conversión de glucosa-6- Fosfato a 6-fosfogluconato, G6PD genera nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), esencial para la estabilidad de las catalasa, muchas vías biosintéticas reductoras incluyendo la síntesis del colesterol y de ácidos grasos, así como la regeneración de glutatión (GSH) desde su forma oxidada, disulfuro de glutatión (GSSG), catalasa y GSH (a través de la vía de GSH peroxidasa), todas son esenciales para la eliminación de H₂O₂, que si no se desintoxica, puede generar alteraciones en la vía de traducción así como directa e indirectamente la formación de HO •, y por lo tanto, el daño oxidativo a las principales macromoléculas (ADN, proteínas y lípidos), lo que altera de manera negativamente la función celular. La G6PD durante el periodo crítico de la diferenciación hipotalámica previene la muerte celular por los efectos patológicos del estrés oxidativo endógeno así como de los xenobióticos, controlando la formación de especies ROS, que probablemente puedan proteger al cerebro de las consecuencias neurodegenerativas, producidas por la acumulación de macromoléculas dañadas o bien por estrés oxidativo (Jeng y col., 2013).

Se ha visto también que la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (ROS) durante la generación de ATP por la cadena de transporte de electrones (ETC) daña macromoléculas incluyendo ADN mitocondrial (ADNmt). Las moléculas dañadas y la disfunción mitocondrial se acumulan con el tiempo, con el estrés y contribuyen al envejecimiento y muerte celular (Guarente, 2008). Por lo anterior, los estrógenos ejercen efectos de manera directa e indirecta sobre la función mitocondrial en una variedad de tejidos y los efectos neuroprotectores del estrógeno son los más estudiados, sin embargo, los mecanismos por los que los estrógenos logran sus efectos fisiológicos y farmacológicos son complejos y no se elucidan completamente (Simpkins y col., 2010). La capacidad de los estrógenos para regular los genes mitocondriales del ADN nuclear y mitochondrial

(mtDNA) en las células MCF-7 se revisó recientemente y los autores concluyeron que los efectos mitocondriales del estrógeno pueden desempeñar un papel en el cáncer de mama, la función cardiovascular, y diferencias en la neuroprotección (Klinge 2008).

ER α y ER β pueden estar localizados en mitocondrias en una variedad de tejidos, incluyendo ovarios y útero de conejo, células epiteliales de lente humana, espermatozoides, neuronas corticales cerebrales y hipocámpales primarias, cardiomiocitos, así como líneas celulares (HepG2, SaOS-2 y MCF-7). Otros factores de transcripción nucleares, por ejemplo, p53, NF- κ B, AP-1, CREB, wnt, c-src y c-myc, también se han observado en mitocondrias lo que establece la posibilidad de que la interacción ER con estas proteínas en la mitocondria puede afectar la expresión del gen mtDNA u otras funciones transcripcionales activas dentro de las mitocondrias. Un aumento estimulado por E₂ en los niveles de mRNA de los genes codificados por mtDNA, las subunidades I y II de citocromo c oxidasa (COI y COII) fueron inhibidas por ICI 162,673, lo que indica la dependencia de ER. El grupo de Yager y colaboradores (2007) identificó una secuencia de proteína de orientación mitocondrial (mTPS) en ER β aa 220-270 e informó que ER α carece de un mTPS. Otros estudios indican que la interacción de ER β con Tom70 y Hsp70 puede desempeñar un papel en el tráfico mitocondrial de ER β (Simpkins y col., 2008]. El D-loop de mtDNA contiene elementos de control de replicación y transcripción. ER β unido a D-loop EREs en MCF-7 mtDNA in vitro. Recientemente, se informó que ER β se localizaba predominantemente en las mitocondrias de líneas de células epiteliales humanas inmortalizadas "normales" y transformadas con E₂ (MCF-10F) (Chen y col., 2007), lo que podría estar asociado en la expresión disminuida en *Ers1* en testigos y tratadas (Figura 1), no así en los controles sometidos a estrés, donde tendrá que haber modificaciones en la poblaciones neuronales hipotalámicas. Además, se ha informado que ER β cambia de mitocondrias a los núcleos durante la transformación neoplásica inducida por E₂ y que E₂ y el ERN-agonista selectivo

DPN, pero no el ER α -agonista selectivo PPT, indujo la expresión de MtDNA codificados MRC genes y proteínas COI, COII y ND1 (Chen y col., 2007). Sin embargo, los autores no indicaron durante cuánto tiempo las células fueron tratadas con E2 o DPN y, por tanto, si el efecto es primario o secundario, es decir, debido al aumento de NRF - 1, Tfam, TFB1, etc.

Respecto a los machos adultos, los resultados revelaron que durante el periodo crítico de diferenciación sexual del hipotálamo, una sola administración de Tx y SO reduce tanto el peso corporal como el peso testicular, y altera la histomorfología gonadal y la espermatogénesis en ratas adultas. En este experimento, aunque no se midió la concentración de hormonas circulantes, el efecto sobre la ganancia de peso a los 90 días en los animales tratados, es un indicativo de la insuficiente estimulación de la testosterona.

A pesar de que el tratamiento no afectó la cantidad de células de Leydig, es importante señalar que el ambiente edematoso y la dispersión de las células en el espacio intertubular en los animales tratados, así como la posible falta de dispersión en la estimulación de las gonadotropinas, pudo reducir la producción de testosterona. La disrupción en la secreción normal de gonadotropinas (y por lo tanto de testosterona) debido al inadecuado control hipotalámico causado por los tratamientos, podría explicar el bajo número de células de Sertoli, que constituyen la base estructural de la barrera hemato-testicular (Yu-hua y col., 2015) y proveen el soporte para la espermatogénesis. La reducción de FSH y testosterona en los túbulos podría afectar la función de las células de Sertoli y la producción de estrógenos, lo cual es congruente con la reducción observada en el número de células germinales, muy probablemente originada por el aumento de apoptosis en un entorno con vacuolización y edema tubular.

El testículo de mamífero se caracteriza por la síntesis de hormonas esteroides y la producción de espermatozoides (Carreau y col. 2006). Las hormonas

gonadotropinas y la testosterona controlan principalmente el desarrollo testicular y el mantenimiento de la espermatogénesis (Carreau y col. 1999). Los factores locales modulan el efecto sobre estas hormonas, uno de estos factores es el estrógeno, esencial para el mantenimiento del tracto reproductivo en los machos (Carreau y col. 2003).

Los estrógenos se sintetizan en las células de Leydig (Abney, 1999), en las células de Sertoli, y en las espermatídes, tanto en las redondas como en las alargadas (Hesscol y col. 2001; Saunders y col. 2005; Lambard y col. 2005). En todas estas células, la existencia de receptores específicos a estrógenos alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$) sugieren un efecto paracrino y autocrino del estradiol (Carreau y col. 2002; Scobie y col. 2002). Los estrógenos actúan como factores de sobrevivencia en las células germinales (Carreau y col. 2003).

Se ha demostrado que se requiere la enzima P450 aromatasa para la maduración de los espermatozoides y la regulación de los mecanismos de absorción de líquidos en los conductos eferentes (Lambard y col. 2005). En ausencia de receptores a estrógenos, la absorción de líquidos en estos conductos, en la rete testis y en los túbulos seminíferos se reduce (Hess y col. 2000), y se acumula en los testículos, causando daño en el epitelio germinal y alterando el desarrollo espermático y la fertilidad (Hess y col. 2001) como se observó en esta investigación. Esto sugiere que los tratamientos afectan los mecanismos implicados en la acción estrogénica, necesarios para la función testicular normal.

En condiciones fisiológicas, los estrógenos juegan un papel importante en el desarrollo normal de la estructura y la función de los testículos, y del tracto reproductor masculino. En el testículo, los estrógenos dependen de la disponibilidad de los andrógenos para su síntesis; sin embargo, bajo condiciones experimentales, la administración neonatal de sustancias estrogénicas exógenas vía oral, en el alimento o el agua, reduce el número de espermatozoides, la testosterona plasmática y el número de células de Sertoli (Goyal y col. 2003;

Sharpe y col. 2003; Atanossova y col. 2005). En ratas postpuberales, Assinder y col. (2007) reportaron que los machos destetados y alimentados durante 24 días con una dieta alta en fitoestrógenos, mostraron un aumento en la apoptosis de las células germinales, una reducción en los recuentos espermáticos y un aumento del lumen en los túbulos seminíferos, sin aparente implicación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, sino de los efectos paracrinos y autocrinos de los estrógenos en el testículo.

Es sabido que la soya y sus derivados son fuente de isoflavonas, una clase particular de fitoestrógenos que pueden interactuar en las vías de señalización del estrógeno endógeno (Cederroth y col. 2012). Estudios anteriores han demostrado que, durante los periodos críticos del desarrollo, la exposición a fitoestrógeno induce efectos morfológicos y fisiológicos adversos sobre la diferenciación sexual masculina en ratones (Roberts y col. 2000; Wisniewski y col. 2003). Levy y sus colaboradores (1995) reportaron que el tratamiento con genisteína (derivado de la soya) reduce el peso corporal en machos y hembras, la distancia ano-genital al nacimiento en machos, y retrasa el inicio de la pubertad en hembras.

Estos resultados fueron confirmados por Wisniewski y sus colegas (2005), quienes también observaron trastornos de conducta y de fenotipo en ratones macho hijos de madres alimentadas con 5 ó 300 mg de genisteína/kg de peso corporal durante la gestación y la lactancia. A los 21 días después del nacimiento, las crías exhibieron desmasculinización permanente; reducción de células espermáticas, de testosterona y de comportamiento agresivo, así como un aumento en el comportamiento defensivo.

En nuestro estudio, la vacuolización, la disminución de la altura del epitelio germinal y el aumento del espacio intertubular constituyen hallazgos importantes. Otros investigadores, como Pérez-Rivero y sus colegas (2009 y 2014) han reportado previamente estos cambios en los perros y en los murciélagos vampiro

alimentados con dietas ricas en fitoestrógenos (cumestrol). Estas observaciones son compatibles con las de nuestro experimento, pero están asociadas con una sola inyección SC de aceite de soya.

La administración de tamoxifeno durante la etapa perinatal bloquea la interacción de estradiol con su receptor en el hipotálamo e inhibe a la enzima aromatasa (Döhler y col. 1985), necesaria para masculinizar los circuitos neuronales que modulan el comportamiento y la secreción de gonadotropinas, circuitos típicos de los machos en la edad adulta. El Tx induce estrés oxidativo y apoptosis en los espermatozoides del ratón albino, anomalías morfológicas —formación de aductos de ADN—(Padmalatha y col. 2001) y distorsión de los túbulos seminíferos con desprendimiento de células germinales. En ratas macho adultas, el Tx (200, 400 u 800 mg/kg de peso corporal) genera células gigantes multinucleadas (D'Souza 2003) y reducción de la fertilidad (Balasinor y col. 2001; Gill-Sharma 1993).

Se sabe que Tx puede actuar como un antagonista o un agonista de estrógenos en el eje reproductivo de la rata (Bellido y col. 2003), y que el SO puede ser una fuente de fitoestrógenos. En este estudio, ambas sustancias se administraron en la primera hora después del nacimiento de las crías, cerca del momento crítico de la diferenciación sexual del hipotálamo; por lo tanto, los cambios morfológicos observados en los testículos se podrían atribuir a los efectos de los tratamientos sobre los núcleos hipotalámicos que controlan la secreción tónica de las gonadotropinas, con un efecto adicional sobre la esteroidogénesis testicular. El papel de la testosterona en la función testicular y la espermatogénesis está bien documentado. Sin embargo, es importante mencionar que en los modelos de administración de fitoestrógenos de soya en roedores adultos, la interrupción de la función testicular puede ser independiente de las concentraciones circulantes de gonadotropinas y testosterona.

Respecto a las hembras tratadas con TP, a los 90 días exhibieron mayor peso corporal. Esto ha sido reportado previamente por Tyndall y col. (2012), quienes además observaron un mayor peso uterino en ratas, atribuyéndolo al efecto estrogénico por la aromatización de testosterona. En este estudio, solo en el grupo tratado con aceite de soya el peso uterino fue superior al grupo control y al tratado con TP.

Hasta el momento no existe información sobre el efecto del aceite de soya en la reproducción animal. Sin embargo, algunos reportes han señalado los efectos de la proteína de soya en algunos modelos animales. En 2004, Cline y col., reportaron endometritis y alteraciones características de estimulación estrogénica como: alargamiento uterino, queratinización del epitelio vaginal, incremento en la altura del endometrio y metaplasia escamosa, en ratonas ovariectomizadas de 6 semanas de edad, con dietas adicionadas con isoflavonas de soya (genisteína:daidzeína; relación 2:1, 40mg/kg) durante 16 semanas. Nuestros resultados demuestran que una sola dosis sc de aceite de soya (20µl) aplicado a 1 hora post-nacimiento genera algunos cambios similares en el útero de la rata. A pesar de que no se analizó la composición del aceite, se sabe que la soya y sus derivados son una fuente rica de isoflavonas, que pueden unirse y activar a los receptores a estrógenos, principalmente los receptores β (Kuiper y col., 1996). Posiblemente estos receptores fueron activados a nivel cerebral, provocando cambios en los núcleos hipotalámicos y por lo tanto en la secreción normal de gonadotropinas, modificando en la edad adulta el desarrollo folicular y la consecuente estimulación sobre el útero. Los hallazgos importantes en este grupo fueron la dilatación uterina, adelgazamiento (figura B1) del endometrio y atrofia de sus glándulas (figura 5). Aunque estos dos últimos datos no concuerdan con lo reportado en el trabajo de Cline y col. 2004) y sólo el grupo tratado con TP presentó metaplasia escamosa.

Como se mencionó con anterioridad, durante el desarrollo folicular la testosterona es un precursor del E₂. Sin embargo, durante el periodo crítico de diferenciación sexual cerebral, esta hormona puede tener efectos adversos sobre la reproducción. Varios investigadores han reportado que una sola dosis de testosterona o E₂ administrada al primer día después del nacimiento genera síndrome de ovario poliquístico en los animales adultos (Barracough, 1961; Brawer y col., 1978; Alexanderson y col., 2007) e inhibición de la concepción (Ohta y col. 2012) además de un aumento de la tasa de apareamiento en hembras tratadas con dietilestilbestrol (5µg/kg) y reducción en el tamaño de la camada con una dosis baja (0.5µg/kg), a partir de la segunda gestación, lo que ha sugerido una menopausia temprana en estos animales.

En los ovarios del grupo tratado con TP, la presencia de folículos antrales con apariencia quística, desprendimientos importantes de células de la granulosa (CG) y antro folicular de mayor tamaño, denotan la falta del estímulo gonadotrópico para concluir con el proceso de ovulación. La disrupción en la secreción normal de gonadotropinas y por lo tanto en la producción de estradiol, causado por el control hipotalámico inadecuado debido al tratamiento, podría explicar el mayor número de folículos antrales, la ausencia de ovulación y por lo tanto de CLs.

En roedores recién nacidos, los ovocitos presentes en los "nidos" se rodean de células somáticas precursoras de células de la granulosa constituyendo los folículos primordiales (Peters y col. 1975; Hirshfield, 1991; Rajah y col., 1992), los cuales determinan la vida reproductiva de una hembra (Hirshfield, 1994). En este proceso una gran cantidad de ovocitos mueren por apoptosis y las células somáticas se mueven e intercalan entre los ovocitos restantes (Morita and Tilly, 1999; Pepling and Spradling 2001). Aunque algunos estudios han sugerido que el grupo de folículos primordiales es definido y finito (Hirshfield, 1994), otros (Bristol-Gould y col., 2006) han demostrado la posibilidad de inducir *in vitro* el ensamble de folículos primordiales mediante factores de crecimiento como el

CTGF-factor de crecimiento de tejido conectivo-(Schindler y col., 2010) o inhibir el índice apoptótico de los ovocitos (con el uso de progesterona) y con ello favorecer el mantenimiento del pool de folículos primordiales, siendo cruciales los primeros tres días post-nacimiento para este proceso en la rata (Rajah y col, 1992).

Otro experimento realizado en ratones por Bristol-Gould y col., 2006 reportó un incremento (30%) transitorio en la población de folículos primordiales con el uso de activina A, que se normaliza con el inicio de la pubertad. Sin embargo, en este trabajo el efecto permanece aún en la edad adulta.

Aunque aún hay controversia sobre el momento del establecimiento de los folículos primordiales en el ovario, en los animales tratados sólo con aceite de soya se encontró un número mayor de estos folículos. No obstante, hacen falta más estudios para identificar los mecanismos por lo que esto ocurre y las implicaciones sobre la reproducción animal. Toda vez que el número de folículos secundarios también fue mayor, lo que podría suponer sobre estimulación en el desarrollo folicular en una etapa independiente de gonadotropinas, además de persistencia de cuerpos lúteos.

Los folículos primordiales inician su desarrollo gradualmente con el objetivo de llegar a la ovulación, aunque la gran mayoría sufre atresia. En humanos cuando la reserva de folículos se agota, se entra en menopausia (Richardson y col., 1987; Faddy y col., 1992). Posiblemente la sobreestimulación durante el reclutamiento folicular reduzca la vida reproductiva de las hembras al agotarse las reservas de folículos primordiales. Esta posibilidad debe ser explorada.

Los receptores a andrógenos (ARs) se encuentran en el ovocito, en células de la granulosa y células de la teca, principalmente de folículos pequeños. Su expresión se regula a la baja por la hormona estimulante de los folículos (FSH) y por la hormona luteinizante (LH) durante el desarrollo folicular (Drummond y col. 2006,

Walters y col 2008, Tyndall y col. 2012). La FSH estimula la proliferación de células de la granulosa, la conversión de andrógenos a estrógenos y la expresión de receptores a LH (Midgley, 1973; Dorrington y col., 1975). La inhibina secretada por las CG inhibe la secreción de FSH (Matzuk y col., 1992). En los folículos dominantes, la LH estimula la producción de andrógenos en las células de la teca. El pico preovulatorio de LH induce los cambios necesarios para la ovulación. Posteriormente, una vez que se libera el ovocito, las células de la granulosa restantes entran en proceso de luteinización para formar el cuerpo lúteo, un órgano altamente vascularizado cuya finalidad es la producción de progesterona.

La ausencia de ARs reduce el número de folículos antrales e incrementa el índice apoptótico en CG (Hu y col. 2004, Shiina y col. 2006), por lo que reduce la fertilidad (Sen & Hammes, 2010). Por otro lado, el exceso de andrógenos genera mayor cantidad de folículos atrésicos y bajos índices de fertilización y desarrollo de los ovocitos (Billing y col. 2003). En este trabajo solo en los animales tratados con TP se encontró un mayor número de folículos antrales. Sin embargo, tanto en los tratados con SO como con TP estos folículos presentaron desprendimientos de CG, un indicador de atresia. Es posible que los receptores a andrógenos hayan sido afectados debido a los tratamientos.

Datos reportados por Wolf y col. (2002) indican que los tratamientos con TP reducen el orificio vaginal. Sin embargo, Tyndall y col. (2012) señalaron que esta hormona induce apertura vaginal temprana en ratas Sprague Dawley. En nuestro estudio, las ratas tratadas con TP a los 90 días no exhibieron apertura vaginal.

Debido al consumo generalizado del aceite de soya tanto en la alimentación humana como en la de los animales, se recomienda continuar investigando al respecto, ya que esto podría tener repercusiones en la actividad reproductiva.

Estos resultados destacan la importancia de prevenir la exposición a disruptores endocrinos en el medio ambiente durante los periodos críticos de la diferenciación sexual cerebral y abren la posibilidad al desarrollo de nuevos métodos de control de plagas.

REFERENCIAS GENERALES

- Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. 2005. "Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental etiology for polycystic ovary syndrome?". *Hum Reprod Update*. 11:357–374.
- Allen LS, Hines M, Shryne JE, Gorski RA. 1989. Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *J Neurosci*. 9: 497-506.
- Altman J, Bayer S. 1978. Development of the diencephalons in the rat: II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time or origin of its neurons. *J Comp Neurol*. 182:973-994.
- Álvarez, L. 2008. Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Arch. Zootec*. 57 (R): 39-59.
- Amateau SK, McCarthy MM. 2004. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nat Neurosci*. 7, 643 – 650.
- Anne T, Konkle M, Margaret M. McCarthy M. 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinol*. 152:223-235.
- Arnold A, Gorski RA. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 7:413-442.
- Avissar S, Sokolovsky M. 1981. Studies of muscarine receptors in mouse and rat hypothalamus: a comparison of sex and cyclical differences. *Neuroendocrinol*. 32:295-302.
- Babichev V, Shishkina I, Peryshkova T. 1990. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomed Sci*. 189-192.

- Bakker J, Van Ophemert J, Slob A K. 1993. Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav Neurosci.* 107, 480-487.
- Balasinor N, Gill-Sharma MK, Parte P, D'Souza S, Kedia N y col. 2001. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. *Mol Cell End.* 190:159-66.
- Barr G, Gibbons J, Moyer K. 1976. Male-female differences and the influence of neonatal and adult testosterone on intraspecies aggressions in rats. *J Comp Physiol.* 90:1169-1183.
- Barraclough CA. 1961. Production of anovulatory sterile rats by single injection of testosterone propionate. *Endocrinol.* 68:62-67.
- Barraclough C A. 1967. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In: Neuroendocrinology. Martini L, Ganong W F, editors. New York: London Academic Press; 61-99.
- Beach F A. 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in the female mammals. *Horm Behav.* 7:105-138.
- Beato M. Gene regulation by steroid hormone. *Cell* 1989. 56:335-344.
- Beatty W. 1979. Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and activational influences. *Horm Behav.* 12:112-118.
- Bellido C, Martín de las Mulas J, Tena-Sempere M, Aguilar R, Alonso R, Sánchez-Criado JE. 2003. Tamoxifen induces gonadotropin-releasing hormone self-priming through an estrogen-dependent progesterone receptor expression in the gonadotrope of the rat. *Neuroendocrinol.* 77(6):425-435.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud DI, Genissel C, Levallet J. 2002. Reproductive system: Aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol.* 193:137-143.

- Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S, Lambard S. 2006. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 246:65-68.
- Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and the reproductive tract of the male. *Int J Androl.* 22:211-213.
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis GI, Bilinska B, Bourguiva S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: A review. *Reprod Biol Endocrinol.* 35:1-6.
- Casper A and Mark Van Doren. 2006. The control of sexual identity in the Drosophila germline. *Dev.* 133: 2783 -2791.
- Castro VA and McCann S. 1975. Cyclic variations in the increased responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) induced by LHRH. *Endocrinol.* 97:13-9.
- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef SS. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Mol Cell Endocrinol.* 355:192- 200.
- Charmandari E, Tsigos E, and Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 67: 259-284.
- Chen J-Q, Russo PA, Cooke C, Russo IH, Russo J. 2007. ER[beta] shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA) - Mol Cell Res.* 1773:1732–1746
- Chen, Q., Crosby, M., Almasan, A. 2003. Redox regulation of apoptosis before and after cytochrome c release. *Korean J Biol Sc.* 7(1):1-9.
- Chia Y, Roth A, Flavell A, Rakic P. 2000. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci;* 23:291-297.
- Christensen LW, Gorski RA. 1978. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. *Brain Res.* 146:325-340.

- Chrousos, GP, Torpy DJ and P.W. Gold. 1998. Interactions between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 129: 229-240
- Cline J M, Franke AA, Register TC, Golden DL and Adams MR. 2004. Effects of Dietary Isoflavone Aglycones on the Reproductive Tract of Male and Female Mice. *Toxic Pathol.* 32:91–99.
- Davis E, Popper P, Gorski R. 1996. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res.* 734:10-18.
- Dawson JL, Cheung YM, Lau RTS. 1975. Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol Psychol.* 3:213-229.
- De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger CJ, Swain A, Lovell–Badge R, Burgoyne PS, Arnold AP. 2002. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci.* 22:9005–9014.
- Deckwerth TL, Elliot JL., Knudson CM, Johnson EM, Snider WD, Korsmeyer SJ. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron.* 1996. 17:401-411.
- Dewing P., Tao Shi., Horvath S., Vilain E. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Mol Brain Res.* 2003. 118:82-90.
- Díaz-Horta O, Kamagate A, Herchuelz A, Van Eylen F. 2002. NA/CA exchanger overexpression induces endoplasmic reticulum-related apoptosis and caspase-12 activation in insulin releasing BRIN-BD11 cells. *Diabetes.* 51, 1815-1824.
- Dobson, H. and R.F. Smith. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci.*, 60-61: 743-752.
- Dobson, H., J.E. Tebble, R.F. Smith and W.R. Ward. 2001. Is stress really all that important? *Theriogenology*, 55: 65-73
- Döhler K, Hines M, Coquelin A, Davis F, Shryne J, Gorski R A. 1984. Pre-and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on

differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res.* 302:291-295.

- Döhler K, Hines M, Coquelin A, Davis F, Shryne J, Sickmöler P, y col. 1986. Pre- and posnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinol.* 42:443-448.
- Döhler K, Srivastava S, Shryne J, Jarzab B, Sipos A, Gorski R A. 1984. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by posnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinol.* 38:297-301.
- Döhler KD, Hines M, Coquelin A, Davis F, Shryne JE, Sickmöler PM y col. 1985. Pre- and posnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinol.* 42:443-448.
- Dörner G, Hinnz G. 1967. Homosexuality of neonatally castrated male rats following androgen substitution in adulthood. *Ger Med Mon.* 12:281-283.
- Dörner G, Staudt J. 1968. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinol.* 3:136-140.
- Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrino.* 4:16-26.
- Ehrhardt A, Baker S. 1974. Fetal androgens, human central nervous system differentiation, and behavior sex differences. In: Friedman RC, Richard RM, Vande Wiele RL, editors. Sex differences in behavior. Wiley, New York; 33-51.
- Fleming A & Vilain E. 2004. The endless quest for sex determination genes. *Clin Genet.* 67 15–25.
- Furr BJA, Jordan VC. 1984. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther.* 25:127-205.

- Gill-Sharma MK, Gopalkrishnan K, Balasinor N, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. 1993. Effects of tamoxifen on the fertility of male rats. *J. Reprod. Fertil.* 99:395-402.
- Goldstein L A, Kurz E M, Sengelaub D R. 1990. Androgen regulation of dendritic growth and retraction in the development of a sexually dimorphic spinal nucleus. *J Neurosci.* 10:935-946.
- Gonen N, Quinn A, O'Neill H, Koopman P., and Lovell-Badge R. 2017. Normal levels of Sox9 Expression in the developing mouse testis depend on the TES/TESCO enhancer, but this does not act alone. *PLoS Genet.* 13(1): e1006520.
- González-García M., García I., Ding L., O'Shea S., Boise LH., Thompson CB., Núñez G. 1995. bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:4304-4308.
- Gorski R A, Harlan R E, Jacobson C D, Southam A M. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol.* 193:529-539.
- Gorski R, Warner J. 1965. Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinol.* 76:226-239.
- Gorski R. 1978. Evidence for morphological sex differences within the medial preoptic area for the rat brain. *Brain Res.* 148:333-346.
- Gorski R. 1985. Sexual dimorphism of the brain. *J. Anim. Sci.* 61 1001-1004.
- Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. 2003. Neo- natal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod.* 68:2081-2091.
- Green P, Simpkins J. 2000. Neuroprotective effects of estrogens. Potential mechanisms of action. *Int. J Dev Neurosci.* 18:347-358.
- Guarente L. 2008. Mitochondria--A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins?. *Cell*; 132:171–176

- Herrera GH, Rosado GA, Vergara OM, Salcedo VM, Miliar GA, Heuze de IY y col. 2013. Genetic expression associated to cell cycle, apoptosis, synaptogenesis and cell differentiation during sex differentiation in rats. *Rev Mex Cienc Pecu.* 4(3):289-304.
- Hirshefield A. 1994. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol Reprod*, 50: 421–428.
- Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. 2003. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. *Eur J Cancer Prev.* 12: 93-100.
- Iguchi T, Hirokawa M. 1986. Changes in the male genital organs of mice exposed neonatally to tamoxifen. *Proc Jpn Acad.* 62:157-160.
- Jeng W., Loniewska MM, Wells PG. 2013. Brain Glucose-6-phosphate dehydrogenase protects against endogenous oxidative DNA damage and neurodegeneration in aged mice. *ACS Chem Neurosci.* 4, 1123–1132
- Jost A, Vigier, Prepin J and Perchellet JP. 1973. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Prag Horm Res.* 29: 1-41.
- Karolczak M, Beyer C. 1998. Developmental sex differences in estrogen receptor -B-mRNA expression in the mouse hypothalamus/preoptic region. *Reprod Neuroendocrinol.* 68:229-234.
- Kuiper G, Enmark E, Peito-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:5925-5930.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe H, Van der Saag PT, Van der Burg B and Gustafsson JA. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptors β . *Endocrinol*, 139:863-870.
- Lauber M. 1996. Ontogeny of 5 alpha-reductase (type 1) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: early presence in germinal zones. *Endocrinol.* 137:2718-2730.

- Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL Jr. 1995. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 208(1):60-66.
- Liu X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
- Liu Y, Salamone J, Sachs B D. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J Neurosci.* 1997. 17:5245-5253.
- Loffler KA & Koopman P. 2002. Charting the course of ovarian development in vertebrates. *International Journal of Developmental Biology.* 46 503–510.
- Lu, O., Harrington, E.O., Rounds, S. 2005. Apoptosis and lung injury. *Keio J Med.* 54 (4):184-9.
- Macnab MW, Tallarida RJ, Joseph R. 1984. An evaluation of tamoxifen as a partial agonist by classical receptor theory – an explanation of the dual action of tamoxifen. *Eur J Pharmacol.* 103:321-326.
- Marshall Graves JA. 2000. Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis – a feminist view. *Biol Reprod.* 63:667–676.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Su J-GJ, Hsueh AJW, Bradley A. α inhibin is a tumor-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*, 360:3313-319.
- McCarthy M, 2010. How it's made: organizational effects of hormones on the developing brain. *J Neuroendocrinol.* 7: 736–742.
- McCarthy MM, Christopher L. Wright, and Jaclyn M. Schwarz. 2009, New tricks by an old dogma: Mechanisms of the Organizational/Activational Hypothesis of steroid-mediated sexual differentiation of brain and behavior, NIH-PA Author Manuscript, Published in final edited form as: *Horm Behav.* 55(5): 655–665.
- McCarthy MM. 2016. Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. *Dialogues Clin Neurosci.*18(4):361-372.

- McEwen B, Parsons B. 1982. Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 22:555-598.
- McEwen, B.S., Alves, S. E. 1999. Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endoc Rev.* 20: 279–307.
- Midgley AR. 1973. Autoradiographic analysis of gonadotropin binding to rat ovarian tissue sections. *Adv Exp Med Biol.* 36:365-378.
- Mittwoch U. 2000. Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Genet Metab.* 71 405–410.
- Mooney S, Miller M. 2000. Expression of bcl-2, bax y caspase 3 in the brain of the developing rat. *Dev Brain Res.* 123:103-117.
- Mor G, Kohen F, García-Velasco J, Nilsen J, Brown W, Naftolin F. 2000. Regulation of Fas Ligand expression in breast cancer cells by estrogen: Functional differences between estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 73.185-194.
- Morelli Meisha A and Cohen Paula E. 2005. Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reprod.* 130 761–781.
- Murakami S, Ari Y. 1989. Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neurosc Lett.* 102:185-190.
- Neil J, MacLuski N, Naftolin F. 1981. Differentiation of the central nervous system. *Scienc.* 211:1294-1302.
- Nielsen J, Mor G, Naftolin F. 2000. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J Neurobiol.* 43:64-78.
- Nishizuka M, Sumida H, Kano Y, Arai Y. 1993. Formation of neurons in the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area of the rat: effects of prenatal treatment with testosterone propionate. *J Neuroendocrinol.* 5:569-573.

- Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata T, Ono H. 2012. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low - dose diethylstilbestrol. *Reprod toxicol.* 34: 323-330.
- Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 14:453-501.
- Orensanz L, Guillamón A, Ambrosio E, Segovia S, Aznara M. 1983. Sex differences in alpha-adrenergic receptors in the rat brain. *Neurosci Lett.* 30:275-278.
- Padmalatha RS, Vijayalaxmi KK. 2001. Tamoxifen citrate induced sperm shape abnormalities in the in vivo mouse. *Mutat Res.* 492:1-6.
- Park SY and Jameson JL. Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinol.* 2005. 146 1035–1042.
- Patrone C, Pollio G, Vegeto E, Enmark E, Curtis I, Gustafsson J, y col. 2000. Estradiol induced differential neuronal phenotypes by activating estrogen receptor α or β . *Endocrinol.* 141:1839-1845.
- Pelletier G, Liao N, Follea N, Govindan M. 1988. Mapping of estrogen receptor-producing cells in the rat brain by in vitro hybridization. *Neurosci Lett.* 9:23-38.
- Perez-Rivero JJ, Martinez MJJ, Perez MM, Aguilar SA, Garcia SMD Serrano H. 2009. Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. *Vet Res Commun.* 33:87-95.
- Pérez-Rivero JJ, Pérez MM, Aguilar SA. 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route. *J Appl Anim Res.* 42(2):208-212.
- Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M. 1975. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil.* 45: 559–566. 4.
- Pfaff D, Schwartz-Giblin S. 1988. Cellular mechanisms of female reproductive behaviors. In: E. Knobil, J. Neil, editors. The physiology of reproduction. *New York, Raven Press, Ltd;* 1487-1568.

- Pfaff DW. 1980. Estrogens and Brain Function. Neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior. New York, Heidelberg, Berlin Springer-Verlag; 123-268.
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinol.* 65:369–382. (PubMed: 14432658)
- Pleiffer C. 1936. Sexual Differences of the hypophysis and their determination by the gonad. *Am J Anat.* 58:195-225.
- Raisman G, Field PM. 1973. Sexual dimorphism in the neuropil area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res.* 54:1-29.
- Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. 1992. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Devl Dynam.* 194: 177–192.
- Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C and Bedecarra's P. 2003. AMH/MIS: what we know about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinol.* 211 21–31.
- Richardson S, Senikas V, Nelson J. 1987. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* 65: 1231–1237. 18.
- Rivier C, Rivest S. 1991. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod.* 45:523–532.
- Roberts D, Veeramachaneni DN, Schlaff WD, Awoniyi CA. 2000. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine.* 13(3):281-286.
- Roberts EK, Padmanabhan V, Lee TM. 2008. Differential effects of prenatal testosterone timing and duration on phenotypic and behavioral masculinization and defeminization of female sheep. *Biol Reprod.* 79: 43–50.

- Robinson SM, Fos TO, Dikkes P, Pearlstein RA. 1986. Sex differences on the shape of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and suprachiasmatic nucleus of the rat: 3-D computer reconstructions and morphometrics. *Brain Res.* 371:380-384.
- Rocca B. 2006. Targeting PGE2 Receptor Subtypes Rather Than Cyclooxygenases: A Bridge Over Troubled Water?. *Molec Inter* 6:68-73.
- Rudel T., Bokoch GM. 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-1574.
- Schneeberger M, Claret M. 2012. Recent insights into the role of hypothalamic AMPK signaling cascade upon metabolic control. *Front Neurosci.* 6:185.
- Segovia S, Perez-Laso C, Guillamon A. 1991. Early posnatal diazepam exposure alters sex differences in the rat brain. *Brain Res Bull.* 26:899-904.
- Sharpe RM, Rivas A, Walker M, McKinnell C, Fisher JS. 2003. Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *Int J Androl.* 26:26-36.
- Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D; Chambon P, Kanno Jun, Yoshikawa H, Kato Shigeaki. 2006. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *PNAS.* 103 (1) 224–229.
- Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Lett Nat.* 399:483-487.
- Simerly R. 2002. Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Ann. Rev. Neurosci.* 25:507-536.
- Simpkins JW, Yi KD, Yang S-H, Dykens JA. 2010. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochim Biophys Acta (BBA) - General Subjects.* 1800:1113–1120.

- Sostres C., Gargallo CJ, Lanas A. 2014. Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 5(1): 40-49
- Swanson H, Van Der Werff J. 1965. The early androgen syndrome; effects of prenatal testosterone propionate. *Acta Endocrinol (Copenh).* 50:379-390.
- Taguchi N. 1987. Reproductive tract lesions in the male mice treated neonatally with tamoxifen. *Biol Reprod.* 37:113-116.
- Temple J, Fugger H, Li X, Shetty S, Gustafsson J, Rissman E. Estrogen receptor β regulates sexually dimorphic neural responses to estradiol. *Endocrinol* 2001. 142:510-513.
- Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. 2002. Stress and reproduction: central mechanisms and sex differences in non-rodent species. *Stress* 5:83–100.
- Tobet S. 2002. Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation. *Eur J Neurosci.* 16:373-376.
- Tyndall V, Boyde M, Sharpe R, Welsh M, Drake AJ, McNeilly. 2012. Effect of androgen treatment during foetal and/or neonatal life on ovarian function in prepuberal and adult rats. *Reprod.* 143:21-33.
- Weisz J, Gunsalus P. 1973. Estrogen levels immature rats. True spurious-ovarian or adrenal. *Endocrinol.* 93:57-65.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 87(1):1-28.
- Willingham, M.C. 1999. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 47(9):1101-10.
- Wilson CA., Davies DC. 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reprod.* 133: 331–359.
- Wisniewski AB, Cernetich A, Gearhart JP, Klein SL. 2005. Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behaviour in male mice. *Physiol Behav.* 84:327-334.

- Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP. 2003. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *J Urol.* 169(4):1582-1586.
- Wolf CJ, Hotchkis A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray EJ. 2002. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: A dose-response study. *Toxicol Sci.* 65:71-86.
- Yager JD, Chen JQ. 2007. Mitochondrial estrogen receptors – new insights into specific functions. *Trends Endocrinol Metab.* 18:89–91.
- Yokosuka M, Okamura H, Hayashi S. 1997. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. *J Comp Neurol.* 389:81-93.
- Yonehara K., Suzuki M., Yamanouchi K., Nishihara M. 2003. Expression analyses of sex steroid-regulated genes in neonatal rat hypothalamus. *J Reprod Dev.* 49: 547-52.
- Yu-hua L, Fei D, Fen Y, Xiao-Yu Z, Hong-jie P, Yang L *et al.* 2015. Pubertal exposure to bisphenol A affects the reproduction of male mice and sex ratio of offspring. *J Reprod Contracep.* 26(1):14-21.
- Zacks, D.N., Zheng, Q.D., Han, Y., Bakhru, R., Miller, J.W. 2004. FAS-mediated apoptosis and Its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45(12):4563-9.
- Zhou Y, Shughrue P, Dorsa D. 1995. Estrogen receptor protein is differentially regulated in the preoptic area of the brain and in the uterus during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinol.* 61:276-283.